

广东省十种卷柏属植物 RAPD 初步分析

余艳¹, 崔国华², 李忠超^{1,3*}, 韦霄^{1,3}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 广州白云山制药股份有限公司中心
药物研究所, 广州 510515; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 采用 RAPD 标记对卷柏属 10 种植物进行了分类鉴定、种间亲缘关系及遗传多样性的初步分析。结果显示: 10 个 RAPD 引物很好地区分了 10 个种, 每个种均有 2~12 个种单态特征位点; UPGMA 聚类树与有关文献表型分类结果不尽一致; 卷柏属不同种具有不同的遗传多样性水平。

关键词: 卷柏属; RAPD; 中药鉴定; 亲缘关系; 遗传多样性

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)01-0048-05

Preliminary studies of RAPD markers for ten *Selaginella* species from Guangdong Province

YU Yan¹, CUI Guo-Hua², LI Zhong-Chao^{1,3*}, WEI Xiao^{1,3}

(1. *South China Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China*; 2. *Pharmaceutical Research Center, Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510515, China*;
3. *Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) method was developed for the specific authentication, affinity and genetic diversity studies of ten *Selaginella* species from Guangdong Province. 2~12 mono-specific loci generated by 10 RAPD primers were found for each species respectively. The UPGMA dendrogram based on the Nei's genetic distance was not completely consistent with conclusions from morphology. And different species demonstrate distinct genetic diversity.

Key words: *Selaginella*; RAPD; authentication; affinity; genetic diversity

传统的生药鉴定方法均基于生物体遗传表现型, 不仅受到遗传因素的影响, 而且与药材生长发育阶段、环境条件、人类活动如引种驯化、加工炮制等密切相关, 具有主观性强、重复性和稳定性差等缺点, 在鉴定药用植物种子种苗纯度及雌雄、近缘生药品种、名贵易混生药、道地性药材、野生与栽培药材、单方复方制剂成分等方面受到很大限制。分子生药学(Molecular Pharmacognosy)的发展为生药的正本清源及质量监测提供了新的手段和方法。其中 RAPD 标记因其操作简便、DNA 用量少、PCR 引物无种属限制、高速高效、费用低等特点, 在中药鉴定

研究种下水平的 DNA 指纹图谱构建、真伪鉴定、亲缘关系、遗传多样性及药材道地性研究等诸方面都得到应用(黄璐琦, 2000; 张太平等, 2000)。

卷柏属(*Selaginella* Beauv.) 是一年或多年生草本蕨类植物, 全世界 700 多种, 我国约 50 种, 产于全国各地, 其中 20 多种为药用植物, 具有活血化淤、清热解毒、消炎抗癌等功效, 被用于治疗癌症、肺炎、风寒咳嗽等症。卷柏属植物由于植株矮小, 分类性状不明显, 是分类较为困难的一个属, 在制药生产过程中容易混淆。但由于不同种所含化学成分不同, 疗效也有所不同(何薇等, 2000), 因此正确鉴定非常

收稿日期: 2005-03-14 修回日期: 2005-10-20

基金项目: 广东省科技项目基金(A301020102) [Supported by Science Commission of Guangdong Province (A301020102)]

作者简介: 余艳(1976-), 女, 四川眉山人, 硕士, 助理工程师, 从事植物学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: lzc120@scbg.ac.cn)

重要。虽然在微形态和 HPCE 指纹图谱鉴定和分类方面已有工作开展(肖新月等, 2001; 常崇艳等, 1999; 王钢力等, 2002), 但在分子水平上的研究还未见报道。

本文利用 RAPD 标记, 对广东省卷柏属 10 种植物进行分子标记鉴定和分类, 为卷柏属药材 DNA 指纹图谱的构建奠定基础, 并初步探讨其种间亲缘关系和遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

在广东省采集 10 种卷柏植物, 每种采集 12~18 不等个体, 其中 1 种由于只采集到营养器官标本, 未能鉴定到种和命名(表 1)。新鲜叶片在野外

用硅胶干燥, 保存至 DNA 提取, 凭证标本保存于中科院华南植物园标本馆(IBSC)。

1.2 总 DNA 提取

叶片用液氮研磨, 改良 CTAB 法提取(余艳等, 2003)。

1.3 引物筛选和 RAPD-PCR 反应

从 100 个生工 S-系列 RAPD 引物中筛选出 10 条位点清晰、重复性良好的引物对所有个体进行 PCR 扩增(表 2)。20 微升 PCR 反应组分为: 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L dNTPs, 200 nmol/L 引物, 1.5 单位 Taq 酶, 20 ng 总 DNA; 对照用双蒸水代替总 DNA。在 PTC-200(MJ research)热循环仪上扩增程序为: 94 °C, 5 min, 1 个循环; 94 °C, 1 min, 35 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 45 个循环; 最后 72 °C 延伸 7

表 1 材料情况

Table 1 Species sampling location and voucher

种名 Species	采集地点 Location	代码 Code	凭证标本 Voucher	个体数 Individuals	种特征单态位点数 No. of mono-specific loci	种特征多态位点数 No. of polymorphic specific loci
单籽卷柏 <i>Selaginella monospora</i>	电白	S1	叶育石 7199	15	7	1
粗叶卷柏 <i>S. trachyphylla</i>	阳春	S2	7200	15	4	0
剑叶卷柏 <i>S. xipholepis</i>	电白	S3	7206	15	8	1
二型卷柏 <i>S. flagellifera</i>	电白	S4	7207	15	2	0
江南卷柏 <i>S. moellendorffii</i>	电白	S5	7208	15	12	3
黑顶卷柏 <i>S. picta</i>	电白	S6	7209	15	5	1
深绿卷柏 <i>S. doederlenii</i>	阳春	S7	7231	15	2	0
翠云草 <i>S. uncinata</i>	乐昌	S8	7234	15	6	0
? <i>S. spl</i>	梅州	S9	8116	18	2	1
兖州卷柏 <i>S. involvens</i>	信宜	S10	7856	12	3	0

注: “?”未鉴定到种。Note: “?”Not identified to species.

min。扩增产物于 1.8% 琼脂糖凝胶、0.5 × TBE 缓冲液 3~4 V/cm 场强下电泳 3 h, 经 EB 染色 30 min, 水洗 10 min, 紫外灯下观察, 照相(LabWorks Software Version 3.0; UVP, Upland, CA 91786, USA)。

1.4 结果记录和数据分析

以 100 bp 的 Marker 作为分子量标准, 在某一个位点上, 明确无误的位点记为“1”并估测分子量大小, 模糊位点和无位点记为“0”, 检出每种的多态位点(包括种特征单态位点、种特征多态位点和多态位点), 并计算种水平和属水平多态位点数和多态位点百分率; 在属水平所有位点 1/0 数据矩阵基础上, 用 Popgene 分析软件计算出各种间的 Nei 氏(1972)遗传距离和遗传相似性矩阵(Yeh 等, 1999), 在遗传距离的基础上, 采用非加权配对算术平均法(UPG-

MA), 绘出各种亲缘关系聚类图。

2 结果

10 个引物在 150 个个体共扩增出 279 个位点, 分子量大小在 1 580~150 bp 之间, 其中 51 (18.28%) 个位点为种特征单态位点, 具有物种特异性, 有鉴定物种的作用; 还有 7 个种特征多态位点, 具有一定的鉴定物种作用(表 1、2)。

各引物扩增的位点数从 24~34 不等, 平均 27.9 个; 各引物在种内扩增的位点数从 2(S106-S2) 到 19(S155-S3), 差别较大, 从另一个方面说明引物在种间具有较大的选择差异性; 其中 S163, S122, S124, S141, S106, S157 和 S190 在种间具有很好的区分性(图 1, 表 2)。种内位点数从 65(S10)~96

(S5), 平均 81.9, 保证了计算结果的可靠性。

Nei 氏遗传距离(D)在种间变化从 0.231 51(S9 vs. *S. involvens*) 到 0.640 6(*S. flagellifera* vs. *S. moellendorffii*) (表 3), 显示种间具有较大的物种差异。10 个物种在距离 0.45 处分为两支(图 2)。在属水平所有位点的遗传多样性水平从 1.43% (*S.*

flagellifera) 到 9.68% (*S. uncinata*), 平均 6.17%, 而种水平的遗传多样性则从 5.26% (*S. flagellifera*) 到 32.10% (*S. uncinata*), 平均为 20.74%, 虽然种、属两个水平的最低和最高所属物种一致, 但其他 8 个物种遗传多样性水平在两个水平的顺序由于种内总位点数不同而有较大变化(表 2)。

表 2 RAPD 引物和它们的扩增位点数及每一个种的扩增位点数和单态种特征位点
Table 2 RAPD primers and their amplified numbers and mono-specific loci within each species

引物 Primer	序列 Sequence	位点数 No. of loci	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S106	ACGCATCGCA	24	4(580)*	2	8(950, 250)	8	8(1250)	6	6	12(1200, 590)	6	3
S115	AATGGCGCAG	24	10	9	6	6	10	5(950)	5	6	8	7(880)
S122	GAGGATCCCT	34	7	7	13(1200, 180)	12(980, 150)	10(280)	10(580)	9	10	10(1450)	7
S124	GGTGATCAGG	29	5(1400)	5	11(1350, 1100)	7	9(1530, 620)	6	6(400)	4	12(250, 200)	4
S141	CCCAAGGTCC	24	10(280)	6(450)	7	6	9(500, 200)	8(1550, 1500)	4	6	4	3
S142	GGTGCGGGAA	31	13(1000)	13	8	8	13	11	7	8	15	11
S155	ACGCACAACC	28	16	18(280)	19	7	8	16	13	10	15	11
S157	CTACTGCCGT	29	13(1560, 480)	11(1050, 950)	9	10	12(350)	8	9	8	6	7(380, 280)
S163	CAGAAGCCCA	29	6(260)	4	7(950, 200)	7	8(780, 220)	8(150)	8(1400)	7(1050)	9(320)	4
S190	ACCGTTCCAG	27	7	10	5	5	9(950, 900,180)	9	8	5(580)	7	8
多态位点数 No. of polymorphic loci			24	23	10	4	12	23	21	27	19	9
种内总位点数 No. of loci within species			91	85	76	76	96	87	75	84	84	65
种内多态位点百分比(%) Percentage of interspecific polymorphic loci			26.4	27.1	13.2	5.26	12.5	26.4	28.0	32.1	22.6	13.8
属内多态位点百分比(%) Percentage of intergeneric polymorphic loci			8.60	8.24	3.58	1.43	4.31	8.24	7.53	9.68	6.81	3.23

注: * 单态种特征位点。Note: * Mono-specific loci molecular weight.

表 3 10 个种之间的 Nei's(1972)遗传一致度(上)和遗传距离(下)
Table 3 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among ten species

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	—	0.7179	0.6173	0.6218	0.6210	0.6331	0.6860	0.6296	0.5673	0.6109
S2	0.3314	—	0.6711	0.6201	0.6633	0.6324	0.6930	0.6372	0.6270	0.6712
S3	0.4823	0.3989	—	0.5984	0.6374	0.6161	0.6457	0.6097	0.5944	0.6071
S4	0.4751	0.4778	0.5134	—	0.5270	0.6233	0.6861	0.7154	0.6917	0.7128
S5	0.4764	0.4106	0.4504	0.6406	—	0.6087	0.6107	0.6058	0.6206	0.6110
S6	0.4571	0.4582	0.4844	0.4727	0.4964	—	0.7121	0.6328	0.6157	0.6581
S7	0.3769	0.3667	0.4374	0.3768	0.4931	0.3396	—	0.7195	0.6668	0.6808
S8	0.4627	0.4507	0.4949	0.3349	0.5013	0.4576	0.3292	—	0.6621	0.6934
S9	0.5669	0.4668	0.5202	0.3686	0.4770	0.4851	0.4052	0.4123	—	0.8065
S10	0.4929	0.3986	0.4990	0.3385	0.4927	0.4184	0.3844	0.3662	0.23151	—

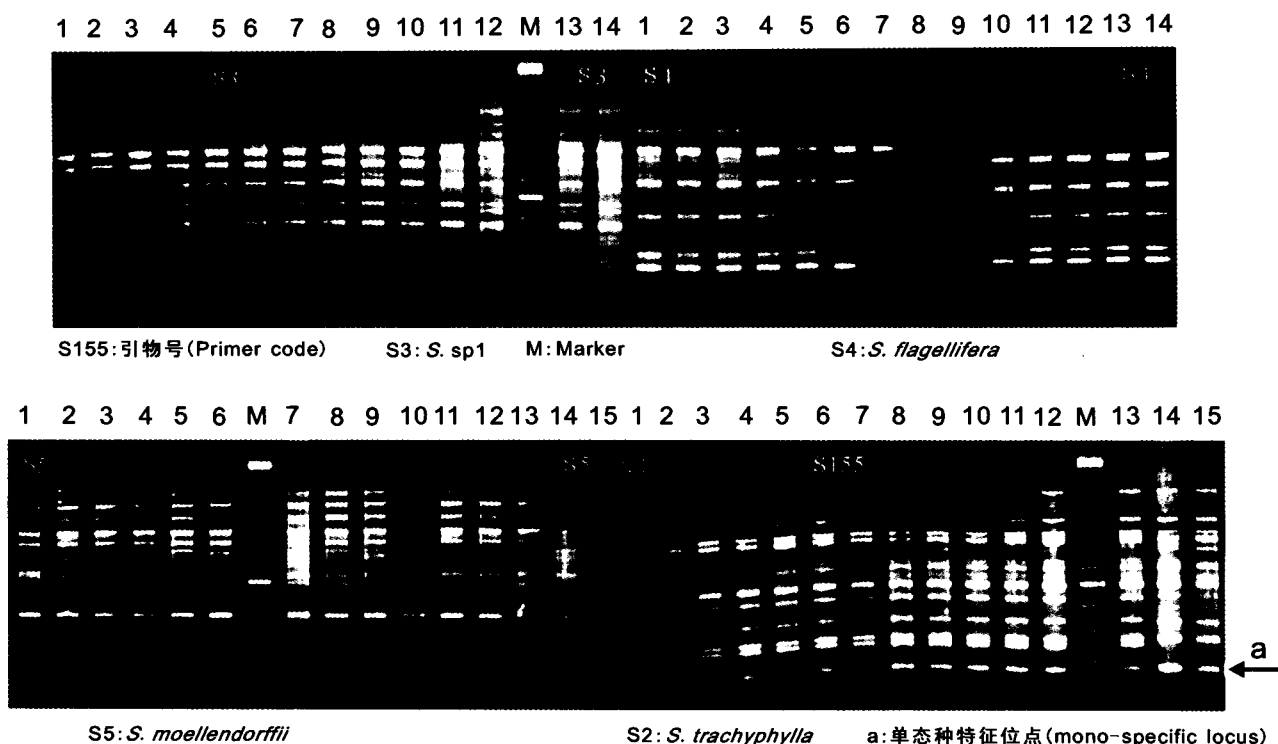


图 1 卷柏属植物在 RAPD 标记位点上的物种特征位点

Fig. 1 Specific locus among *Selaginella* species based on RAPD loci

S1: *S. monospora*; S2: *S. trachyphylla*; S3: *S. xipholepis*; S4: *S. flagellifera*; S5: *S. moellendorffii*; S6: *S. picta*; S7: *S. doederleinii*; S8: *S. uncinata*; S9: *S. sp1*; S10: *S. involvens*; M: Marker; a: Mono-specific locus.

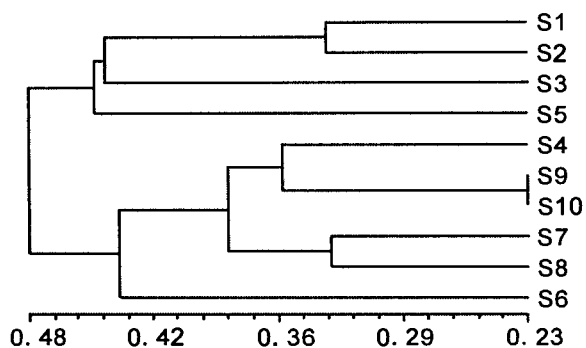


图 2 10 个种之间的遗传距离 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram based on the Nei's genetic distance among ten *Selaginella* species

3 讨论

RAPD 标记在物种鉴定和系统学上的应用, 早期有着不同的看法, 主要集中在位点的可重复性和同源性上。经国内外科学工作者验证, 严格标准化

实验条件, 重复性是完全可以保证的; 而且近缘种共迁移位点多是同源的 (邹喻萃等, 2001)。目前一般认为 RAPD 标记主要用于种内不同居群间和种间亲缘关系研究。如果与已知样品的 DNA 同时扩增, 上述两个问题就能得到很好解决。

肖新月等 (2001) 和常崇艳等 (1999) 应用扫描电子显微镜对 13 种卷柏属植物的大孢子和 10 种卷柏属植物的叶的显微结构及大小孢子囊的排列方式进行观察, 认为这些特征可作为卷柏种类鉴别和药材识别真伪的重要依据。由于卷柏属药用植物含有大量具有广泛药理活性的双黄酮类等化合物, 在化学成分、功能主治等方面不尽相同。王钢力等 (2002) 采用 HPLC 的 MECC 的分离模式, 对 18 个卷柏属植物样品的乙酸乙酯提取物进行了测定, 认为被测样品的黄酮类成分既有共性也存在差别, 这种差别也对于药材品种的鉴别有着一定的意义。

本研究利用 10 个 RAPD 引物对 10 种卷柏属 150 个植株进行的扩增, 种水平的多态位点率从 5.26% (*S. flagellifera*) 到 32.10% (*S. uncinata*),

平均 20.74%，反映了物种内部个体之间的遗传变异。为了准确地寻找出每个物种的特征性位点，我们对每个种 12~18 个个体进行了检测，将种内特征位点划分为单态和多态两种，其中种内单态特征位点有可能较好地代表一个种的分子特征，作为区分和鉴定植物的依据。在本研究的 10 种卷柏植物中，每个种均有明确无误的种内单态特征位点，最少 2 个单态特征位点 (*S. flagellifera*-S122-980bp、150bp; *S. doederlenii*-S124-400bp、S163-1400; S9-S122-1450bp、S163-320)，最长达 12 个单态特征位点 (*S. moellendorffii*)，为卷柏属植物从 DNA 分子水平中药鉴定与分类提供了基础。

虽然本属植物染色体基数不定，但它们在形态上具有高度的一致性(李正理等, 1983; 王培善等, 2001)。有关本属种间关系的研究报道不多, 而且, 不同作者从不同角度进行的分类亲缘关系结果不一致。如周厚高等(1999)编制的检索表首先把单子卷柏区分出来, 然后是二型卷柏和翠云草, 江南卷柏和兖州卷柏关系较近, 黑顶卷柏则被最后鉴别出来。王培善等(2001)则最先鉴别出二型卷柏, 然后兖州卷柏和江南卷柏及黑顶卷柏关系较近, 粗叶卷柏和深绿卷柏关系较近, 与单子卷柏较远, 而翠云草在它们之后。本研究显示, S9 与兖州卷柏遗传距离最小, 它们与二型卷柏首先聚在一起; 在遗传距离 0.44 处与深绿卷柏、翠云草和黑顶卷柏聚为一支, 而单籽卷柏、粗叶卷柏和江南卷柏聚为另一支, 与上述文献结果都有所不同, 原因有待进一步综合形态、细胞和分子等层次的研究查明。同时, 它们之间的关系与它们所具有的单态特征位点数目多寡并不相关, 而是建立在共迁移同源位点的多少上。

当然, 由于不同批次、不同厂家试剂和实验条件的限制, 特定具体的 RAPD 标记位点产物的长久稳定保持, 目前在时间和空间上还有一定困难。另外, 本研究的取样范围局限于广东省, 为了企业对卷柏属药材鉴定的方便和精确应用, 还应扩大取材范围, 把 RAPD 种单态特征位点转化为 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) 标记。而

且鉴于卷柏属的药用价值和在维管植物分类和演化研究的重要地位(李正理等, 1983), 对卷柏属植物进一步深入和全面的研究是很有必要的。

参考文献:

- 王培善, 王筱英. 2001. 贵州蕨类植物志[M]. 贵阳: 贵州科技出版社: 621-641
- 李正理, 张新英, 李荣放, 等. 1983. 维管植物比较形态学[M]. 北京: 科学出版社
- 黄璐琦. 2000. 分子生药学[M]. 北京: 北京药科大学出版社: 5
- 邹喻苹, 葛颂, 王小东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社: 49, 263-266
- Chang CY (常崇艳), Xiao XY (肖新月), Chen XD (陈晓端). 1999. Micromorphological character of ten species of *Selaginella* (卷柏属 10 种卷柏微形态学特征比较)[J]. *J Beijing Normal Univ; Nat Sci* (北京师范大学学报: 自然科学版), 35(3): 403-407
- He W (何薇), Zeng ZP (曾祖平), Wang YH (王永红). 2000. Summary on studies of medicinal *Selaginella* (药用卷柏的研究概况)[J]. *Chin Trad Herb Drug* (中草药), 31: 954-956
- Wang GL (王钢力), Dai Z (戴忠), Lu J (鲁静), et al. 2002. HPCE fingerprints on 11 species of plants for medicinal use of *Selaginella* (11 种卷柏属药用植物 HPCE 指纹图谱的研究)[J]. *Chin Trad Pat Med* (中成药), 24(7): 489-491
- Xiao XY (肖新月), Lin RC (林瑞超), Chang CY (常崇艳), et al. 2001. The comparative studies on megaspores of thirteen species in *Selaginella* (13 种卷柏属植物大孢子形态学研究)[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 21(4): 286-290
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. POPGENE. Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31[M]. Edmonton University of Alberta
- Yu Y (余艳), Chen HS (陈海山), Ge XJ (葛学军). 2003. Optimization of experiment conditions and primer screening with ISSR markers (简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选)[J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 11(1): 15-20
- Zhang TP (张太平), Li D (李丹). 2000. Primers screening for the study on pummelo germplasm with RAPD markers (柚类种质资源 RAPD 标记研究的引物筛选)[J]. *Guihaia* (广西植物), 20(4): 313-318
- Zhou HG (周厚高), Huang YY (黄玉源), Xie YL (谢义林), et al. 1999. The study on genus *Selaginella* Beauv from Guangxi, China (广西卷柏属植物研究)[J]. *J Guangxi Agric Biol Sci* (广西农业生物科学), 18(Supl): 137-141