

贵州3种车前草的随机扩增多态性DNA(RAPD)亲缘关系分析

谭萍^{1,*} 李煜¹ 赵饮虹²

¹六盘水师范专科学校生物系, 贵州水城 553004; ²中国生物技术发展中心, 北京100081

RAPD Analysis on the Phylogenetic Relationship Among 3 Species of *Plantago* in Guizhou Province

TAN Ping^{1,*}, LI Yu¹, ZHAO Yin-Hong²

¹Department of Biology, Liupanshui Teacher's College, Shuicheng, Guizhou 553004, China; ²China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100081, China

摘要 利用随机扩增多态性DNA(RAPD)技术对贵州车前草的3个种进行了分析,建立了它们的指纹图谱。从60个随机引物中筛选出的9个引物共产生94条DNA片段,大小分布在0.1~0.2 kb之间,其中71个条带具有遗传多态性,约占总数的75.53%。平均每个引物扩增的DNA带数为10.44条。应用NTSYSpc软件进行聚类,将聚类结果转化为3种车前草之间的遗传关系树形图。结果显示,车前和平车前首先聚类,其Dice相似性系数为0.76,在三者中它们的亲缘关系较近;而大车前与它们的遗传相似性系数为0.56,亲缘关系较远。

关键词 车前草; RAPD; 亲缘关系

车前草为车前草科车前草属植物,是民间常用的药草,其干品具有清热、利尿、明目、止咳、化痰及治疗便秘等功效,临床上常用于治疗水肿、淋病、肺热咳嗽等症^[1],尤长于清热解毒,治疗痈肿疮毒、急性泄痢等,近年来又发现对治疗高血压有较好的作用。常见的车前草药品大多为大车前、车前和平车前的混合干品,我们对上述3种车前草进行了随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)分析,探索它们相互之间的遗传多样性和分类关系,目的在于为车前草的进一步研发提供依据。

材料与方法

3种车前草——大车前(*Plantago major* Linn.)、车前(*P. asiatica* Linn.)、平车前(*P. depressa* Willd.)均采自贵州六盘水师范专科学校后山上。

DNA提取采用北京鼎国生物技术公司的植物基因组DNA提取试剂盒,操作步骤参照其说明书。

DNA按下列程序扩增^[2]: 94℃ 2 min 预变性, 94℃变性 30 s, 36℃复性 30 s, 72℃延伸 80 s, 42个循环; 4℃保温。仪器为PE-9600 DNA扩增仪。在25 μL PCR反应体系中,含10×PCR缓冲液(含Mg²⁺) 2.5 μL、DNA模板(25~50 ng·μL⁻¹) 1 μL、dNTPs(10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL、10 bp引物

(8 pmol·μL⁻¹) 1 μL、Taq DNA聚合酶(2 U·μL⁻¹) 0.5 μL、水。用此反应体系筛选合适引物,对样品进行RAPD PCR扩增反应(引物序列见表1)。电泳图谱中每一条DNA片段均代表了引物与模板DNA互补的一对结合位点,可记为1个分子标记。将RAPD图谱的条带用“0”和“1”形式记录,有为“1”,无为“0”。将所有RAPD图谱记录数据录入NTSYS2.1,采用Dice系数(S0)法对3个样品的RAPD条带进行计算,得到Dice相似系数矩阵,进行聚类分析^[3]。

实验结果

1 RAPD扩增

从40个引物中筛选出9个能产生可重复DNA片段的引物,用以对3份材料进行RAPD扩增^[4]。在供试材料中共获得94条扩增产物,产生出的DNA片段大小分布在0.1~2.0 kb之间,其中71个条带具有遗传多态性,约占总数的75.53%,平均每个引物扩增的DNA带数为10.44条(表1)。图1为不同引物对3种车前草的扩增反应结果。

2 车前草的聚类结果

由94个RAPD标记获得的Dice相似性系数显

收稿 2004-09-13 修定 2004-12-14

✉-mail: pingtan9365@sina.com.cn, Tel: 0858-8984616

表1 9个有效引物在3种车前草材料上的扩增

引物	序列(5'~3')	总扩增带数	多态性带数	多态性带数比率%
A11	CAATCGCCGT	11	5	45
A8	GTGACGTAGG	11	8	76
H2	TCGGACGTGA	12	11	91
H7	CTGCATCGTG	7	7	100
H12	ACGCGCATGT	12	8	66
H13	GACGCCACAC	12	8	66
A1	CAGGCCCTTC	8	7	87
H11	CTTCCGCAGT	13	9	69
H14	ACCAGGTTGG	8	8	100

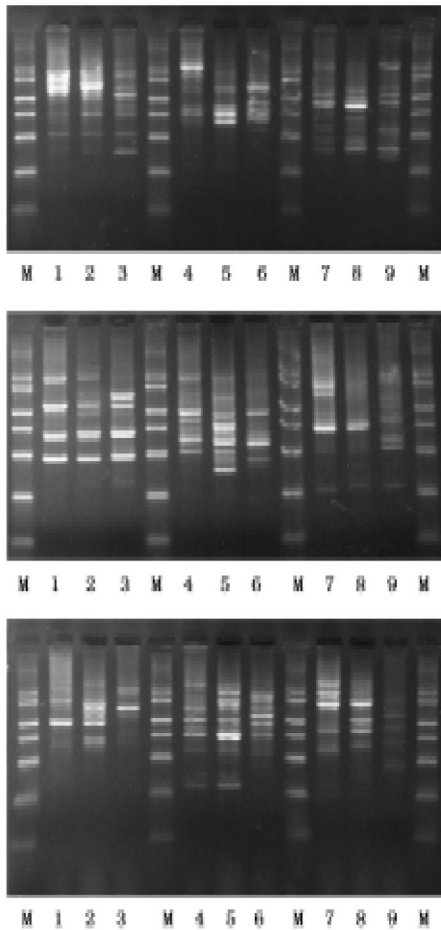


图1 3种车前草的DNA指纹图谱

1、4、7: 平车前; 2、5、8: 车前; 3、6、9: 大车前; M: DNA Marker (从下到上依次为: 100、250、500、750、1000、1600、2000 bp)。1~9所用引物依次为: A11、A8、H2、H7、H12、H13、A1、H11、H14。

示, 3种车前草样品的遗传相似系数分布在0.56~0.76之间, 平车前和车前首先聚类, 相似性系数达0.76, 大车前和它们的遗传相似系数为0.56(图2)。

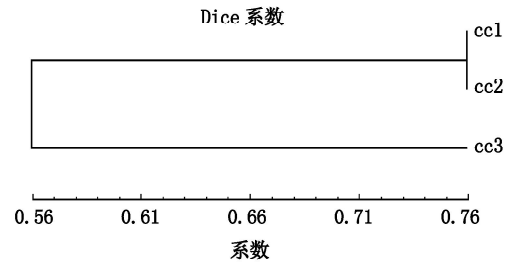


图2 3种车前草的DNA多态性聚类分析

cc1: 平车前; cc2: 车前; cc3: 大车前。图下部的标尺指3种车前草的聚类水平, 即它们的遗传相似程度。

讨论

从上可见, RAPD分析的结果与形态学的观察一致。平车前和车前在形态上比较接近: 叶柄均较短, 植株矮小, 叶片形状多样; 而大车前的叶柄较长, 植株相对较高, 叶片椭圆形, 全缘^[5]。在我们的另一个实验中发现大车前叶片中黄酮的含量远远高于车前和平车前叶片中的黄酮含量。这说明平车前和车前的遗传距离较近, 而大车前和它们的亲缘关系较远。若要全面准确地了解车前草间的遗传差异, 还需对更多种类的车前草作进一步的研究。

参考文献

- 中国科学院植物研究所编. 中国高等植物图鉴. 北京: 科学出版社, 1985. 180~181
- 刘杰, 莫结胜, 刘公社等. 向日葵种质资源的随机扩增多态性DNA(RAPD)研究. 植物学报, 2001, 43(2):151~157
- 倪念春, 何兴全, 许介眉. 对宽叶韭种内分化的随机扩增多态DNA的分析. 四川大学学报, 2002, 39(5):943~945
- 郭红, 魏育明, 郑有良等. 应用RAPD技术对新疆布顿大麦遗传多样性的研究. 四川大学学报, 2002, 39(4):758~762
- 贵州植物志编辑委员会. 贵州植物志(第4卷). 成都: 四川民族出版社, 1989. 675~680