



ISSR 标记研究云南产牛奶菜属几种 药用植物的亲缘关系

管志斌, 张丽霞, 宋美芳, 李海涛, 张忠廉*

(中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 云南分所, 云南 景洪 666100)

[摘要] 目的:分析常用傣药“傣百解”原植物等 9 种云南产牛奶菜属植物种间亲缘关系。方法:应用 ISSR 分子标记技术。结果:从 60 个 ISSR 引物中筛选出 25 个引物用于试验,共扩增出 391 个条带,每个引物检测到的位点为 8~21,平均每个引物扩增出 15.6 个位点;种间遗传相似系数(GS)在 0.667 5~0.821 0;9 种牛奶菜属植物间,傣百解 *Marsdenia auricularis* sp. nov. ined. 为通光散 *M. tenacissima* 的近缘种,云南牛奶菜 *M. balansae* 与海枫屯 *M. officinalis* 间的亲缘关系最近。结论:ISSR 结果支持傣百解为牛奶菜属植物,且与通光散近缘,牛奶菜属多种民族药和民间药值得深入研究。

[关键词] 牛奶菜;傣百解;ISSR;亲缘关系

牛奶菜属 *Marsdenia* R. Br., 中国分布有 22 种 5 变种,分布于华东、华中及西南各省区,其中云南省境内分布有 16 种,2 变种^[1]。该属植物傣百解 *M. auricularis* sp. nov. ined.、通光散 *M. tenacissima*、蓝叶藤 *M. tinctoria*、大叶牛奶菜 *M. koi*、海枫屯 *M. officinalis* 等为傣药或民间常用药,大多具有清热解毒、止咳平喘、祛风化湿、强壮筋骨等疗效^[2-3],其中常用傣药“傣百解”,傣名“雅解先打”,傣医药临床应用普遍,为国药准字品种“雅解片”、“百解胶囊”等的主要组方药材,该药具有清热解毒,消肿止痛等功效,用于咽喉肿痛、口舌生疮、疔疖疱疹、肺热咳嗽、胃脘痛,肺、气管、食道、胃癌变,小便热痛等,还可用于清除因饮食不洁、用药不当而致的各种不良反应^[3-4];但该药材及原植物基础研究缺乏,本论文通过研究傣百解原植物 *M. auricularis* 及其他 8 种产于云南的牛奶菜属植物的亲缘关系,确定出傣百解的近缘物种,并为“傣百解”等傣药的进一步研究奠定基础,为傣药的鉴别和资源利用提供理论依据。

1 材料

实验所用的 10 份材料于野外采集后经本所李海

涛副研究员鉴定,收集当年生新鲜嫩叶,经硅胶快速干燥后带回实验室内 -20 °C 低温保存,以备实验所需。具体材料编号、拉丁名及缩写代码情况见表 1。

表 1 10 份供试材料序号及缩写代码表
Table 1 Ten materials used for test

序号	缩写	种名	拉丁名
1	DY	大叶牛奶菜	<i>Marsdenia koi</i>
2	LG	裂冠牛奶菜	<i>M. incisa</i>
3	TGS	通光散	<i>M. tenacissima</i>
4	QH	球花牛奶菜	<i>M. globifera</i>
5	YN	云南牛奶菜	<i>M. balansae</i>
6	DBJ1	傣百解	<i>M. auricularis</i>
7	LYT	蓝叶藤	<i>M. tinctoria</i>
8	DBJ2	傣百解	<i>M. auricularis</i>
9	YT	圆头牛奶菜	<i>M. isaiana</i>
10	HFT	海枫屯	<i>M. officinalis</i>

DNA 提取试剂盒, Tiangen(DP305); ISSR 引物, 上海生工生物技术有限公司合成; *rTaq* DNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司, DR001B)包括: TaKaRa *Taq* DNA 聚合酶(5 U · μL⁻¹), 10 × Buffer (Mg²⁺ free), dNTP mixture(各 2.5 mmol · L⁻¹), MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹); Marker, 北京鼎国生物技术有限公司(B031); 其他试剂均为分析纯。

扩增仪(biometra professional standard), 电泳仪(Biometra 公司), 凝胶成像系统(Uvitec 公司)

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取 供试材料经灭菌水清洗

[稿件编号] 20120416007

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(YZYN-10-02); 西双版纳州三项经费专项(2011107)

[通信作者] * 张忠廉, Tel: 15924692393, E-mail: zzl0605@163.com

[作者简介] 管志斌, 助理研究员, 研究方向为热带药用植物资源及植物保护, E-mail: zbguan@yahoo.com.cn



后晒干,将嫩叶剪成碎块状后经液氮充分研磨,按照 DNA 快速提取试剂盒所提供方法提取基因组 DNA。所提 DNA 样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,经适当稀释后 -20 ℃ 保存备用。

2.2 PCR 反应 ISSR 反应体系(20 μL):Mg²⁺ 1.5 mmol · L⁻¹,dNTP 0.2 mmol · L⁻¹,引物 0.2 μmol · L⁻¹,Taq DNA 聚合酶 1 U,PCR buffer 2 μL 和模板 DNA 20 ~ 50 ng,加 dd H₂O 至 20 μL。

PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 4 min;30 个循环:94 ℃ 变性 45 s,50 ~ 55 ℃ (因引物序列不同退火温度不同)退火 45 s,72 ℃ 延伸 2 min;循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min。各取 PCR 反应液 5.0 μL,加 1.0 μL 缓冲液,在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,电压 100 V,电泳 90 min,经溴化乙锭(EB)染色后在凝胶成像仪上观察并照相记录。

2.3 引物筛选 ISSR 引物序列按照加拿大哥伦比亚大学生物技术实验室的引物序列设计,由上海生物工程技术有限公司合成,共 60 个引物。从 60 个 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多样性好、重复性高的 ISSR 引物用于样品的遗传多样性分析,每个选定的引物重复扩增 2 次。每条引物退火温度在 50 ~ 55 ℃ 进行单独摸索,使之达到最佳扩增效果。

2.4 数据统计 利用所筛选出的引物扩增所有样品,实验结果均需扩增和电泳 2 次。针对某一同源带(同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带)有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,生成 0,1 二态性数据矩阵。统计多态性位点百分率(PPB);根据 Nei's 遗传距离(gene distance, GD)及遗传相似系数(gene similarity, GS),采用 NTSYS-pc 2.1 分析软件的 UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)法进行系统聚类分析,构建系统聚类图。

3 结果与分析

3.1 引物筛选及扩增结果 对 60 个 ISSR 引物进行筛选,共筛选出 25 个扩增条带较多、谱带清晰、多态性较好的引物用于 ISSR-PCR 分析,具体引物名称、序列及其 PCR 反应体系的退火温度见表 2,用筛选出的引物对 10 份供试材料进行 PCR 扩增,并对扩增片段进行统计分析。结果显示,25 个引物共扩增出 391 个位点,且每个位点均为多态性位点,即多态性位点百分率达 100%。由此可知牛奶菜属植物间丰富的遗传多样性;所扩增位点,其碱基数均在 100 ~ 2 500 bp,每个引物检测到的位点为 8 ~ 21,平均每个引物扩增出 15.6 个位点。引物 UBC841 的扩增图谱,见图 1。

表 2 筛选出的 25 个 ISSR 引物序列及其退火温度

Table 2 Twenty-five ISSR primer sequence and their annealing temperature

No.	引物序列	退火温度/℃	No.	引物序列	退火温度/℃	No.	引物序列	退火温度/℃
UBC807	(AG) ₈ T	52	UBC808	(AG) ₈ C	54	UBC809	(AG) ₈ G	54
UBC812	(GA) ₈ A	52	UBC814	(CT) ₈ A	52	UBC815	(CT) ₈ G	54
UBC817	(CA) ₈ A	52	UBC818	(CA) ₈ G	54	UBC820	(GT) ₈ C	54
UBC823	(TC) ₈ C	54	UBC827	(AC) ₈ G	54	UBC830	(TG) ₈ G	54
UBC834	(AG) ₈ YT	53	UBC835	(AG) ₈ YC	55	UBC840	(GA) ₈ YT	53
UBC841	(AG) ₈ YC	55	UBC842	(GA) ₈ YG	55	UBC844	(CT) ₈ RC	55
UBC848	(CA) ₈ RG	55	UBC849	(GT) ₈ YA	53	UBC851	(GT) ₈ YG	55
UBC855	(AC) ₈ YT	53	UBC856	(AC) ₈ YA	53	UBC859	(TG) ₈ RG	55
UBC860	(TG) ₈ RA	53						

3.2 亲缘关系分析 利用 NTSYS-pc 2.1 分析软件的 UPGMA 法对 10 份供试材料进行亲缘关系分析,构建聚类图,所得结果见图 2。利用 NTSYS 软件计算出 10 份牛奶菜属材料间遗传相似系数(GS),得到供试材料相似性矩阵,9 种植物间相似系数范围为 0.667 5 ~ 0.821 0。由聚类图可知,所分析的 9 种牛奶菜属植物间,傣百解 2 个样品非常相似,并与通光散先聚,后分别与球花牛奶菜、

圆头牛奶菜聚在一起,说明其亲缘关系较近;云南牛奶菜与海风屯间的相似系数最大,达 0.821 0,说明其亲缘关系最近,而大叶牛奶菜和球花牛奶菜与其他物种关系较远。

4 讨论

通过本实验所构建的 9 种牛奶菜属植物亲缘关系聚类图可知,傣百解和通光散的亲缘关系最近,从形态学上,傣百解与通光散也十分相似。傣百解原

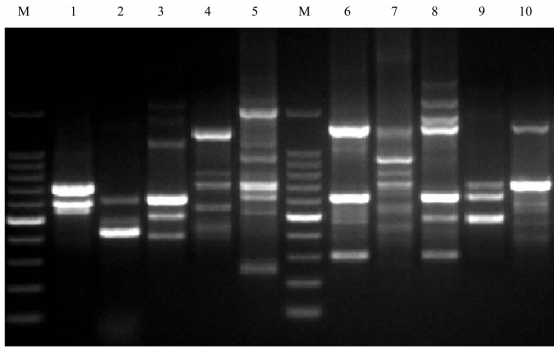


图 1 引物 UBC841 的 ISSR-PCR 扩增
Fig. 1 Amplification result of ISSR-PCR with primer UBC841

植物经形态学研究与文献记录该物种来源于萝藦科南山藤属植物苦绳 *Dregea sinensis* 不符^[3-4], 应该为牛奶菜属的新物种。本论文的结果和形态学的研究吻合, 支持傣百解原植物为通光散的近缘种。

本研究组的化学成分研究结果表明傣百解和通光散具有相似的化学成分组成, 提示 2 种植物具有药效相关性, 这 2 个物种是较常用民族药和民间药, 今后将开展较为深入的研究。

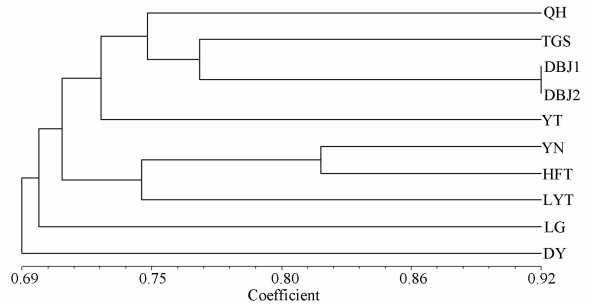


图 2 以 Nei's 遗传距离构建的牛奶菜属植物 ISSR 聚类图 (样品简写见表 1)

Fig. 2 ISSR dendrogram of plants in *Marsdenia* based on Nei's genetic distance

[参考文献]

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 63 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 442.
[2] 中国药材公司. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 98.
[3] 林艳芳, 依专, 赵应红. 中国傣医药彩色图谱 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 2003: 397.
[4] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准. 傣族药. 第 1 册 [M]. 昆明: 云南美术出版社, 2005: 190.

Genetic relationship on several medicinal plants in *Marsdenia* from Yunnan in ISSR marker

GUAN Zhibin, ZHANG Lixia, SONG Meifang, LI Haitao, ZHANG Zhonglian*

(Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong 666100, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the genetic relationship of 9 *Marsdenia* species from Yunnan, especially the traditional Dai medicine "Dai Bai Jie" (*M. auricularis*). **Method:** Applying the inter-simple sequence repeats (ISSR) markers technology. **Result:** Twenty-five primers were screened out of 60 ISSR random primers and produced 391 bands totally, every primer produce 8-21 bands and the mean number was 15.6. The range of the GS (genetic similarity) value was 0.667 5-0.821 0. In 9 *Marsdenia* species, *M. auricularis* is a relative of *M. tenacissima*. *M. balansae* and *M. officinalis* have the closest genetic relationship. **Conclusion:** It is supported by ISSR that the *M. auricularis* which is sib species of *M. tenacissima*, and the folk medicine of *Marsdenia* are worthy deep investigation and study.

[Key words] *Marsdenia*; *Marsdenia auricularis*; ISSR; genetic relationship

doi:10.4268/cjcm20121109

[责任编辑 吕冬梅]