

白芍传统品种原植物遗传多样性及亲缘关系分析

陈丙奎, 杭悦宇^①, 周义锋, 郭可跃, 黄春洪, 李 正

江苏省植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014
中国科学院

摘要: 为探讨白芍原植物各居群间的遗传多样性及亲缘关系, 本实验应用 RAPD 技术, 使用 40 条随机引物对 10 个白芍原植物居群的叶片总 DNA 进行 PCR 扩增。结果表明: 白芍 10 个原植物居群间具有较丰富的遗传多样性, 多态率达 63.64%。由结合线 $L=0.7975$ 可将 10 个居群划分为 6 组, 原植物为芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 的 6 个居群中有 4 个居群集中在第 3 组, 显示了种内遗传关系的相似性, 其中川白芍 (芍药) 花色有变, 同时雄蕊有部分瓣化的现象, 与野生种 (韩城芍药) 有较远的遗传关系; 山东菏泽居群雄蕊全部瓣化, 种质可能来自于观赏芍药突变体, 在遗传关系上与芍药的其他居群有一定的距离。原植物为毛果芍药 [*P. lactiflora* var. *trichocarpa* (Bunge) Stern] 的 4 个居群中, 杭白芍粉红花生居群和白花居群独立成一组, 与形态分类的结果一致。芍药及其变种毛果芍药的遗传关系非常近, 但是有交叉。因此形态分类和遗传关系应综合考虑, 作为种下分类单位的确定也应慎重。

关键词: 白芍; 居群; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: S567.021; Q347 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2003)02-0017-05

Genetic diversity and relationship of different populations of original plants of Radix Paeonia Alba

CHEN Bing-luan, HANG Yue-yu^①, ZHOU Yi-feng, GUO Ke-yue, HUANG Chun-hong, LI Zheng (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(2): 17-21

Abstract: RAPD is used to study the genetic diversity and relationship of plant populations of Radix Paeonia Alba, in which 40 random primers are used. There are rich genetic diversities among 10 different populations (the polymorphic ratio is 63.67%). Based on the combining line ($L=0.7975$), ten populations can be classified into 6 groups. The 4 populations in 6 *Paeonia lactiflora* Pall. populations are intensively clustered in section 3, which reveals a high genetic identify. The population of Chuanbaishao (*P. lactiflora*) in Zhongjiang, Sichuan Province is outgrouped by different flower color and partially petaloid stamens, it shows a long genetic distance between the cultivar and wild in sect. 3. The population of *P. lactiflora* from Heze, Shandong Province, as the descendant of a probable mutation of the decorative cultivars, is characterized with completely petaloid stamens and separated from others in heredity. Among the 4 populations of *P. lactiflora* var. *trichocarpa* (Bunge) Stern, the white and pink flower populations of Hangbaishao from Pan'an, Zhejiang Province are clustered into a separate section, which is consistent with the result based on morphological classification. *P. lactiflora* has a close relationship with its variety *P. lactiflora* var. *trichocarpa*. We should comprehensively deliberate on the classification of units infraspecific and take a consideration based on morphology and genetic distance.

Key words: Radix Paeonia Alba; population; genetic diversity; RAPD

白芍为我国著名的传统中药,《中华人民共和国药典》(2000 版)规定其植物来源为毛茛科 (Ranunculaceae) 植物芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.)。我国的白芍历来有 3 大传统品种,即产区为安徽亳州的亳白芍、浙江东阳等地的杭白芍以及四川中江等地的川白芍,另外在山东、陕西、江苏和河南等地也有白芍产出。对于其原植物,金昌东等认为,我国白芍原植物主要来源于芍药的变种毛果芍药 [*P.*

lactiflora Pall. var. *trichocarpa* (Bunge) Stern]。作者 2001 年在白芍花期对安徽亳州、浙江东阳、四川中江、山东菏泽、陕西韩城和江苏东海等地进行了实地

收稿日期: 2003-02-20

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2000032); 连云港康缘制药有限公司横向合作项目

作者简介: 陈丙奎 (1976-), 女, 瑶族, 湖南江华人, 硕士生, 从事药用植物资源方面的研究。

^① 通讯作者 corresponding author. hangyueyu@21cn.com

调查、标本及活植物采集,结果表明:我国白芍主产地的原植物为芍药及毛果芍药,同时每个产地的各个即原植物居群有稳定的种内变异类型(另文发表)。从目前的情况看,白芍的种质有的为原产地道地;有的是不同时期的引种品;有的是同地不同种;有的基本上还是野生植物,因此原植物种的分类界定比较混乱,遗传物质基础也有较大程度的变异。

应用分子生物学的方法对芍药属进行系统分类已有多篇报道^[1-3],但主要为种间关系的讨论。周红涛等^[4]应用 RAPD 的方法对 11 个居群的 43 个单株的芍药进行居群间遗传分化的研究,但实验将 43 株芍药都视同 1 种,未涉及到以花色为特征的明显的种内变异。

PAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)方法是运用聚合酶链式反应原理,以随机设计的寡核苷酸引物扩增总 DNA 的一些片段、检测核苷酸变异的一种方法,近年来这种方法已被广泛应用于植物种

内不同居群间亲缘关系的研究^[5,6]。本项目应用 PAPD 方法对中国白芍较有代表性的 10 个原植物居群进行比较研究,以探讨白芍种质各居群间的变异程度及亲缘关系,达到种质整理的目的,并结合其有效成分的含量^[7]、染色体核型(另文发表)等实验,试图对中国传统中药白芍的原植物种质进行系统的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用实验材料见表 1。陕西韩城材料为 1999 年 11 月引种,其余均为 2001 年 5 月引种,种植于江苏省·中国科学院植物研究所种质圃内。经王希冀高工、杭悦宇研究员和陈丙鑫鉴定,凭证标本存于江苏省·中国科学院植物研究所标本馆(NAS)。

表 1 白芍各居群原植物及产地

Table 1 Raw plant and location of populations of original plants of *Radix Paeonia Alba*

材料 Materials	种植或采集地 Resource	花色 Flower color	品种 Variety	原植物 Raw plant
川白芍 Chuanbaishao	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	粉红 Pink	-	芍药 <i>Paeonia lactiflora</i>
		白 White	-	毛果芍药 <i>P. lactiflora</i> var. <i>trichocarpa</i>
亳白芍 Bobaishao	安徽亳州 Bozhou, Anhui	红 Red	线条 Xiantiao	芍药 <i>P. lactiflora</i>
		红 Red	蒲棒 Pubang	芍药 <i>P. lactiflora</i>
杭白芍 Hangbaishao	浙江磐安 Pan'an, Zhejiang	红 Red	-	毛果芍药 <i>P. lactiflora</i> var. <i>trichocarpa</i>
		粉红 Pink	-	毛果芍药 <i>P. lactiflora</i> var. <i>trichocarpa</i>
		白 White	-	毛果芍药 <i>P. lactiflora</i> var. <i>trichocarpa</i>
东海白芍 Baishao	江苏东海 Donghai, Jiangsu	红 Red	-	芍药 <i>P. lactiflora</i>
菏泽白芍 Baishao	山东菏泽 Heze, Shangdong	红 Red	-	芍药 <i>P. lactiflora</i>
韩城白芍 Baishao	陕西韩城 Hancheng, Shaanxi	红 Red	-	芍药 <i>P. lactiflora</i>

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 参照 Rogers 等^[8]用 CTAB 法提取总 DNA,本文进行了方法优化,其步骤为:嫩叶片(去粗叶脉,约 3~4 g)→加液 N₂ 研磨成细粉→加 1 倍体积的预热为 65℃ 的 2×CTAB 提取液[CTAB2%, Tris-HCl (pH 8.0) 0.1 mol/L, NaCl 1.4 mol/L, EDTA (pH 8.0) 20 mmol/L, PVP 2%, β-巯基乙醇 1%]→65℃ 保温 1 h→加等体积的氯仿-异戊醇[V(氯仿):V(异戊醇)=24:1]于摇床上振荡 1 h,使混匀→10 000 r/min 室温下离心 10 min→取上清液→加 3/2 倍体积异丙醇→静置→钩出沉淀用 70% 乙醇洗涤(如色素多则于摇床上振荡洗涤)→沉淀挥干酒精后溶于适量的

TE 缓冲液中→加适量(10 mg/mL)的 RNase 于 37℃ 处理 30~60 min→加等体积的氯仿-异戊醇[V(氯仿):V(异戊醇)=24:1]轻柔混匀→11 500 r/min 15℃ 离心 10 min→取上清液,加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积预冷(-20℃)的无水乙醇→钩出 DNA→70% 乙醇洗涤→倒净乙醇→挥干酒精后溶于适量的 TE 缓冲液中→4℃ 备用。所得 DNA 于 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳进行检测,电泳缓冲液为 1×TAE。

1.2.2 RAPD 扩增 总体积为 25 μL,其中水 14.3 μL,10×PCR Buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,5 U/μL Taq 酶 0.2 μL,10 ng/μL 的引物 1.5 μL,25 ng/μL DNA 溶液 3.0 μL。扩增程序

为94℃预变性3 min后,45个循环:94.5℃变性45 s,35.6℃复性1 min,72℃延伸2 min,最后1个循环完成之后,72℃再延伸7 min,冷却至10℃取出,用1.4%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.2.3 数据分析 电泳图谱中的每1条带(DNA片段)均为1个分子标记(Marker),并代表1个引物结合点。根据各分子标记的有无及其迁移率统计得到所有位点的二元数据,无带记为0,有带记为1,用NTSY-PC软件中Dice的方法计算样品间的遗传相似

系数,并画出聚类图。

2 实验结果

2.1 引物的筛选结果

选取DNA样本,试用上海生物工程技术服务有限公司生产的92个引物,选扩增条带信号强,背景干净的40个引物做RAPD的正式实验(见表2)。

表2 用于白芍各居群RAPD实验的引物序列及扩增结果

Table 2 Primers produced RAPD polymorphic bands and the result of amplification of original plant populations of *Radix Paeonia Alba*

引物 Primer	序列 Sequences	总带数 Total bands	多态带数 Polymorphic bands	共有带数 Monomorphic bands	引物 Primer	序列 Sequences	总带数 Total bands	多态带数 Polymorphic bands	共有带数 Monomorphic bands
S1049	ACGGCACGCA	6	2	4	S1090	AAGGCCCTC	6	4	2
S1050	GTTACCGCGA	4	3	1	S1091	GTCACGTCT	8	5	3
S1051	GAACCGTGCC	6	2	4	S1092	CCCAGGCTAC	12	7	5
S1052	CAGTCCCGT	10	9	1	S1094	TCGCTCCGTT	5	4	2
S1055	GAATCCGGCA	5	4	1	S1095	AGGGGACTCC	5	2	3
S1058	GGCTAGGTGG	7	5	2	S1100	AGGAGTCGGA	7	4	3
S1063	GGTCTACCA	4	2	2	S1110	CAGACCGACC	4	3	1
S1064	AGGGTCGGTC	4	3	1	S1114	TGGTTGCGGA	3	1	2
S1065	GATGGCAGTC	6	4	2	S1116	TGGCGGTTT	4	3	1
S1072	AGTGTAGCCC	5	3	2	S1117	GCTAACGTCC	4	3	1
S1076	CTGCGTGCTC	8	3	5	S1118	ACGGGACTCT	4	2	2
S1077	CAGCGGTCAC	7	3	4	S1120	ACCAACCAGG	4	2	2
S1079	TCCGAGCGAG	9	8	1	S1123	AGCCAGGCTG	4	2	2
S1081	TGTACGAGG	6	3	3	S1127	TCGCTGCGGA	6	4	2
S1083	CCCACCCITG	6	3	3	S1128	AAGGCTGCTC	9	8	1
S1085	GACTGCGCCA	7	4	3	S1130	CTGTGTGCTC	3	2	1
S1086	AAGCGTCCTC	7	5	2	S1131	GTCCATGCAG	5	2	3
S1087	CCGTCCATCC	8	5	3	S1134	AGCGGGTAA	9	8	1
S1088	GTCGCCCTCA	5	3	2	S1135	TGATCCCGCT	5	4	1
S1089	CAGCGAGTAG	10	6	4	S1137	TCAGCACAGG	5	3	2
					Total		242	154	188

2.2 DNA扩增结果

40个随机引物对白芍10个居群59个个体进行扩增,共扩增出242个片段,平均每个引物6.05个片段,其中154个片段具多态(占63.64%)(图1),说明白芍的栽培居群间保存着丰富的遗传多样性。

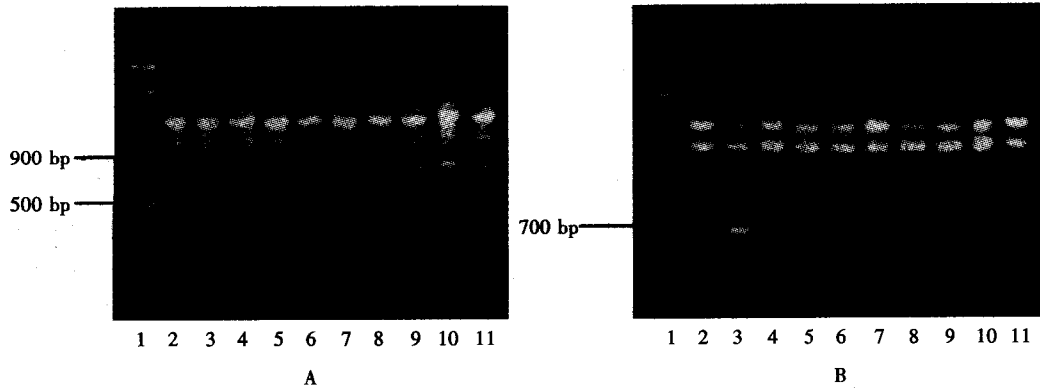
2.3 白芍不同居群间的遗传关系分析

根据扩增结果进行统计分析,计算Nei&Li相似系数(相似系数矩阵见表3),并得聚类图(见图2)。

据聚类图可知:本实验所分析的10个居群中陕西韩城红花居群与亳白芍蒲棒居群间的遗传相似系数最大(0.888),江苏东海红花居群与亳白芍红花居

群的遗传距离较远,菏泽居群与其他居群的遗传距离最远。据钟扬等^[9]计算结合线的方法:把每次聚合的水平值 U^k 排列后,求出 $\Delta U_k = U^{k+1} - U^k$,发现最大的 ΔU_k 值(此处为1次跳变),则结合线取在该跳变值的中点: $L = (U^{k+1} + U^k)/2$ 。本实验的结合线为: $L = (0.824 + 0.771)/2 = 0.7975$ 。

由结合线 $L = 0.7975$ 可将白芍原植物10个居群划分为6组:第一组包括杭白芍白花和粉红花居群(毛果芍药);第二组为东海居群(芍药);第三组原植物均为芍药,包括韩城居群、亳白芍蒲棒居群、亳白芍线条居群和川白芍粉红花居群;第四组为川白



1. Marker; 2. 杭白芍白花居群 Hangbaishao, white flower, Pan'an in Zhejiang Province; 3. 韩城居群 Baishao, Hancheng in Shaanxi Province; 4. 杭白芍红花居群 Hangbaishao, red flower, Pan'an in Zhejiang Province; 5. 亳白芍红花蒲棒居群 Bobaishao, Pubang, red flower, Bozhou in Anhui Province; 6. 东海居群 Baishao, Donghai in Jiangsu Province; 7. 菏泽居群 Baishao, Heze in Shandong Province; 8. 亳白芍红花线条居群 Bobaishao, Xiantiao, red flower, Bozhou in Anhui Province; 9. 川白芍粉红花居群 Chuanbaishao, pink flower, Zhongjiang in Sichuan Province; 10. 川白芍白花居群 Chuanbaishao, white flower, Zhongjiang in Sichuan Province; 11. 杭白芍粉红花居群 Hangbaishao, pink flower, Pan'an in Zhejiang Province. 3,5,6,7,8,9: 芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.; 2,4,10,11: 毛果芍药 *P. lactiflora* var. *trichocarpa* (Bunge) Stern

图 1 白芍原植物 RAPD 实验中引物 S1134(A)和 S1135(B)的扩增情况

Fig. 1 Bands produced by Primer S1134 (A) and S1135 (B) in RAPD of original plants of *Radix Paeonia Alba*

表 3 白芍原植物各居群 PCR 扩增结果的相似系数表

Table 3 Similarity coefficient of all populations of *Radix Paeonia Alba*

居群 ¹⁾ Population ¹⁾	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000	0.702	0.736	0.736	0.740	0.769	0.785	0.690	0.669	0.764
2	0.702	1.000	0.843	0.744	0.756	0.702	0.669	0.707	0.752	0.715
3	0.736	0.843	1.000	0.719	0.756	0.744	0.702	0.682	0.752	0.748
4	0.736	0.744	0.719	1.000	0.822	0.752	0.736	0.665	0.744	0.773
5	0.740	0.756	0.756	0.822	1.000	0.847	0.789	0.678	0.756	0.835
6	0.769	0.702	0.744	0.752	0.847	1.000	0.868	0.665	0.744	0.872
7	0.785	0.669	0.702	0.736	0.789	0.868	1.000	0.674	0.686	0.888
8	0.690	0.707	0.682	0.665	0.678	0.665	0.674	1.000	0.723	0.686
9	0.669	0.752	0.752	0.744	0.756	0.744	0.686	0.723	1.000	0.723
10	0.764	0.715	0.748	0.773	0.835	0.872	0.888	0.686	0.723	1.000

¹⁾ 1,2,3: 分别为杭白芍红花、粉红花和白花居群 Red, pink and white flower populations of Hangbaishao respectively, Pan'an in Zhejiang Province; 4, 5: 分别为川白芍白花和粉红花居群 White and pink flower populations of Chuanbaishao respectively, Zhongjiang in Sichuan Province; 6,7: 分别为亳白芍线条和蒲棒居群 Xiantiao and Pubang populations of Bobaishao respectively, Bozhou in Anhui Province; 8: 菏泽居群 Baishao, Heze in Shandong Province; 9: 东海居群 Baishao, Donghai in Jiangsu Province; 10: 韩城居群 Baishao, Hancheng in Shaanxi Province. 1,2,3,4: 毛果芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.; 5,6,7,8,9,10: 芍药 *P. lactiflora* Pall. var. *trichocarpa* (Bunge) Stern

芍白花居群(毛果芍药);第五组为杭白芍红花居群(毛果芍药);第六组为菏泽居群(芍药)。

3 讨论

3.1 芍药栽培群体的遗传多样性

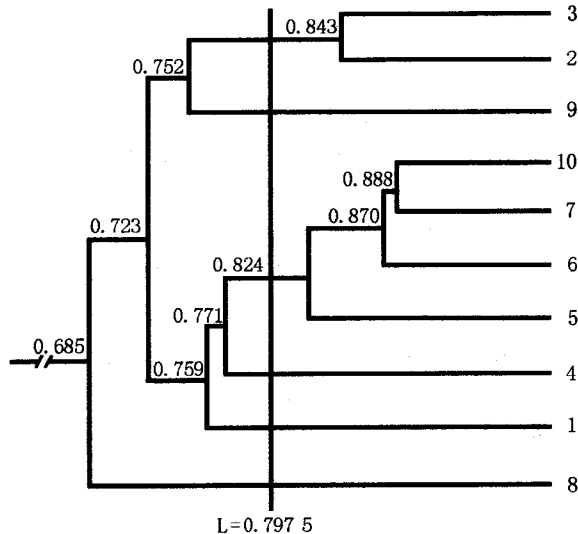
用 RAPD 的分子标记对我国主要栽培白芍原植物各居群间遗传多样性初步评估,多态率达 63.64%,证明在现有的主要栽培白芍原植物中存在较丰富的遗传多样性,这些遗传变异构成了选育白

芍优良品种的物质基础。

3.2 不同居群间的遗传关系

按照聚类图的结果,原植物为芍药的居群主要集中在第 3 组,即为近于野生的韩城居群和相近的亳白芍 2 个品种居群和川白芍粉红花居群,他们的花色为红色系列(川白芍为粉红花),后 3 个居群均为白芍主品种,在栽培地的野生转家化历史已经达数百年。这个聚类结果显示了作为一个种在遗传关系上的相似,由于川白芍花色有变、同时雄蕊有明显的部分瓣化,尽管遗传表达不会受生态环境即分布

区域的影响,但是产生了突变和表达选择,因此显示了川白芍与野生种在本组内有较远的遗传关系。亳州的2个居群尽管品种不同,但是显示了最为接近的遗传关系,说明地域性对同种植物的遗传关系同样有重要意义。



1,2,3: 分别为杭白芍红花、粉红和白花居群 Red, pink and white flower populations of Hangbaishao respectively, Pan'an in Zhejiang Province; 4,5: 分别为川白芍白花和粉红花居群 White and pink flower populations of Chuanbaishao respectively, Zhongjiang in Sichuan Province; 6,7: 分别为亳白芍线条和蒲棒居群 Xiantiao and Pubang populations of Bobaishao respectively, Bozhou in Anhui Province; 8: 菏泽居群 Baishao, Heze in Shandong Province; 9: 东海居群 Baishao, Donghai in Jiangsu Province; 10: 韩城居群 Baishao, Hancheng in Shaanxi Province. 1,2,3,4: 毛果芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.; 5,6,7,8,9,10: 芍药 *P. lactiflora* Pall. var. *trichocarpa* (Bunge) Stern

图2 白芍原植物各居群的 RAPD 结果聚类图
Fig. 2 Clustering diagram of RAPD of original plant populations of *Radix Paeonia Alba*

原植物同样是芍药的东海居群(第2组)和菏泽居群(第6组)显示了相对独立的遗传关系。据调查,东海居群样本是40多年前从安徽亳州引进,但聚类结果与目前亳州栽培的白芍显示了较远的遗传距离,因此,对这一组的分析就存在了一些疑问,原因可能为二:一是目前东海的居群经过40多年的栽培管理,出现记录误差;二是亳州目前的栽培种质与40年前的栽培种质不尽相同,因此,对这一组的分析不能妄下结论。菏泽居群与原变种相比植物外部形态发生了很大的变异,即雄蕊全部瓣化,菏泽不仅是药用白芍的产地也是观赏芍药的产地,尽管本实验所采样品取自于用作药用的白芍,但由于雄蕊瓣化是观赏植物品种突变体筛选的一个途径,因此菏泽的药用白芍种质可能来自于观赏芍药突变体品种,与其他原植物为芍药的居群有一定的遗传距离就不

难解释了。

原植物为毛果芍药的4个居群中,杭白芍粉红花居群和白花居群独立成一组(第1组),这与形态分类的结果一致。杭白芍的另一个红花居群另成一组(第5组),这个结果与染色体C-带的实验结果一致(另文发表),同时杭白芍红花居群尽管独立成组,但和川白芍白花居群及芍药居群关系较近,提供了作为种及变种的一个认定依据。

3.3 关于芍药的分类界定

从上述实验结果可看出:芍药及其变种毛果芍药的遗传关系非常近而且有交叉。毛果芍药的分类界定依据是形态特征,与原变种相比,心皮被毛。但根据作者的研究和观察,芍药(或毛果芍药)作为一个种(或变种)在花色上已经具有了稳定的差异,由于花的特征是遗传的重要指征,因此,这一形态特征提示了有新变种的可能,尚需进一步研究。当然,雄蕊瓣化的特征可能是园艺突变体筛选的结果。

芍药是个复杂的植物种类,野生、栽培、药用和观赏各种类型并存,因此,形态分类和遗传关系综合考虑,作为种下分类单位的确定也应慎重。

参考文献:

- [1] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(15): 6813-6817.
- [2] Zhang D, Sang T. Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies (*Paeonia*, *Paeoniaceae*) by fluorescent in situ hybridization: Implications for biogeography and concerted evolution [J]. *Amer J Bot*, 1999, 86(5): 735-740.
- [3] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*) [J]. *Amer J Bot*, 1997, 84: 1120-1136.
- [4] 周红涛, 胡世林, 郭宝林, 等. 芍药野生与栽培群体的遗传变异研究[J]. *药学学报*, 2002, 37(5): 383-388.
- [5] 汪小全, 邹喻平, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. *植物学报*, 1996, 38(12): 954-962.
- [6] 黄璐琦. 分子生物学[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 37.
- [7] 陈丙奎, 杭悦宇, 周义锋, 等. 收获期芍药根中芍药甙含量动态变化[J]. *植物资源与环境学报*, 2002, 11(2): 25-28.
- [8] Rogers S O, Bendich J. Extraction of DNA from plant tissues [J]. *Plant Mol. Biol. Manual*, 1988, A6: 1.
- [9] 钟扬, 陈家宽, 黄德世. 数量分类的方法与程序(第一版)[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1990. 73.