

不同金银花种源间遗传关系的 RAPD 分析

向增旭^①, 郭巧生

(南京农业大学园艺学院中药材研究所, 江苏 南京 210095)

摘要: 利用 RAPD 分析技术对金银花(*Lonicera japonica* Thunb.) 6 个种源的遗传多样性及遗传关系进行了研究。结果表明, 23 个引物共扩增出 105 条 DNA 片段, 其中, 多态性片段 83 条, 占扩增总数的 79.05%。聚类分析结果表明, 金银花的 6 个种源可聚为 2 大类, 产自山东平邑、湖南隆回和江苏南京的野生金银花种源遗传距离较近, 聚为一类; 来自河南封丘的 2 个野生种源和来自河南密县的 1 个栽培种源聚为一类。不同金银花种源间的遗传关系与地理分布有一定的相关性。

关键词: 金银花; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q949.95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2007)02-0057-03

Analysis on genetic relationship of different provenances of *Lonicera japonica* with RAPD technique XIANG Zeng-xu^①, GUO Qiao-sheng (Institute of Traditional Chinese Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(2): 57-59

Abstract: The genetic diversity and genetic relationship of six provenances of *Lonicera japonica* Thunb. were studied with RAPD technique. The results showed that 105 bands were amplified by 23 primers, there were 83 polymorphic bands which was 79.05% of total bands. According to cluster analysis result of RAPD bands, the six provenances of *L. japonica* were classified into two groups. One group included three wild provenances from Pingyi in Shandong Province, Longhui in Hu'nan Province and Nanjing in Jiangsu Province; the another group included two wild provenances and one cultivated provenance from Fengqiu and Mixian in He'nan Province respectively. It is concluded that the genetic relationship of different provenances of *L. japonica* relates to geological distribution.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb.; RAPD; genetic diversity; cluster analysis

金银花是忍冬科 (Caprifoliaceae) 植物忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.) 的干燥花蕾, 为常用中药材, 有清热解毒之功效。金银花具有抗病毒、解热、增强免疫力、止血、利尿和降低胆固醇等作用^[1]。中国有忍冬科植物 98 种, 在全国各省各地形区均有分布, 尤以西南地区种类最多, 可供药用的种类达 47 种, 其中作为金银花药材原植物的有忍冬 (*L. japonica* Thunb.)、菰腺忍冬 (*L. hypoiglauca* Miq.)、山银花 (*L. confuse* DC.) 和毛花柱忍冬 (*L. dasystyla* Rehd.)^[2], 以山东平邑和河南封丘为道地产区^[3]。随着应用范围的扩大和需求量的增加, 金银花野生资源逐渐减少, 人工栽培已成为金银花药材的主要来源, 山东、河南及湖南等省均有大面积金银花栽培种植基地^[4]。不同种源金银花在株型、枝条和叶片形态及化学成分含量等方面均存在较大差异^[5-7], 种内遗传变异十分显著。目前, 在分子水平上有关不同金银花种源间的遗传背景和亲缘关系的

研究尚未见报道。笔者利用 RAPD 技术对 6 个金银花种源进行遗传多样性分析, 旨在探讨不同金银花种源间的亲缘关系, 为金银花的引种栽培、资源保护和选种育种提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试金银花种源分别为采自山东平邑流域镇、湖南隆回县、江苏南京市及河南封丘杨许镇和封丘县城郊的 5 个野生种源和 1 个引自河南密县的栽培种源, 栽种于中国药科大学药用植物园内。

收稿日期: 2006-08-31

作者简介: 向增旭 (1972-), 男, 甘肃张掖人, 博士, 讲师, 主要从事中药材资源评价、遗传育种及生物技术研究。

^① 通讯作者 E-mail: zxxiang@njau.edu.cn

1.2 仪器和试剂

所用仪器有 Biometra T1 Thermocycler 型 PCR 仪、Sigma 3K 18 型高速冷冻离心机、DYY-III 33A 型水平电泳槽、Amersham Pharmacia Biotech 凝胶成像系统、Amersham Pharmacia Biotech EPS30 型电泳仪、紫外分光光度计和核酸蛋白测定仪。

实验用琼脂糖、引物、RNaseA、*Taq* DNA 聚合酶及 dNTPs 均购自南京生兴生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 每个种源选取 20 株个体,采集幼嫩枝叶,混匀后称取 3 g,液氮中粉碎,参照 CTAB 区室法^[8]提取基因组 DNA。

1.3.2 引物选择 选取长 10 bp 的寡核苷酸随机引物 78 个,对 6 个种源的 DNA 进行预扩增,从中筛选出重复性好且多态性高的引物 23 个,用于金银花基因组 DNA 的扩增。

1.3.3 PCR 反应 用筛选到的 23 个随机引物进行 PCR 扩增。反应体系总体积为 20 μL ,包括 2.0 μL 10 \times PCR Buffer, 1.6 μL Mg^{2+} , 0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶(5 U $\cdot\text{mL}^{-1}$), 2 μL 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, 1.6 μL dNTPs(各 2.5 mmol $\cdot\text{mL}^{-1}$), 1 μL 模板 DNA, 11.6 μL 灭菌双蒸水。

扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 然后于 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增结束后将反

应产物置于 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.4 电泳 取 10 μL PCR 产物,加 1 μL 溴酚蓝,电泳。电泳缓冲液为 1 \times TAE,以 5 V $\cdot\text{cm}^{-1}$ 的速度电泳约 1 h。电泳结束后,将凝胶置于凝胶成像系统上观察拍照。

1.4 数据分析和处理

将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”,同一位置没有条带记为“0”,由此生成原始矩阵。统计每个引物扩增出的总条带数和其中的多态性条带数。用 NYSYS 分析软件中的 SM 方法计算任意 2 个种源间的遗传相似系数(SI),并根据公式 $DS = 1 - SI$ 计算遗传距离(DS)。采用 UPGMA 聚类分析方法建立不同种源间的遗传关系树状图。

2 结果和分析

2.1 扩增产物的多态性分析

通过对 78 个引物的筛选,获得 23 个重复性好且多态性较高的引物,用这些引物对 6 个金银花种源的 DNA 进行 PCR 扩增,扩增结果见表 1。由表 1 可见,23 个引物共扩增出 105 条带,其中多态性条带 83 条,占扩增条带总数的 79.05%。每个引物可以扩增出 2~7 条多态性条带,表明不同金银花种源间具有较高的遗传多态性,变异较大。

表 1 不同金银花种源间 RAPD 扩增的引物序列及其扩增结果

Table 1 Sequences of primers and amplified results of RAPD analysis of six provenances of *Lonicera japonica* Thunb.

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	扩增条带数 Total number of amplified band	多态性条带数 Number of polymorphic band	引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	扩增条带数 Total number of amplified band	多态性条带数 Number of polymorphic band
I07	CAGCCACAAG	7	7	P19	GGGAAGGACA	4	3
U05	TTGGCGGCCT	5	2	AH1	TCCGCAACCA	4	3
Y07	AGAGCCGTCA	5	3	W05	GGCGGATAAG	4	3
A3	AGTCAGGCAC	7	3	T05	GGGTTGGCA	4	3
W09	CTGACCGAGT	6	4	AW09	ACTGGGTCGG	4	2
W20	YGYGCCAGCA	4	3	B08	GTCCACACGG	5	5
C02	GTGAGGGGTC	4	4	S09	TCCTGGTCCC	4	4
AN3	AGCCAGGCTG	5	5	X01	CTGGGCAGGA	6	4
AY1	GTCCACCTCT	4	4	S03	CAGAGTCCC	4	3
C11	AAAGTGGCGG	3	3	G04	AGCCTGTCTG	5	5
E11	GAGTCTCAGG	4	3	Y15	AGTCGCCCTT	4	4
A07	GAAACGGGTG	3	3				

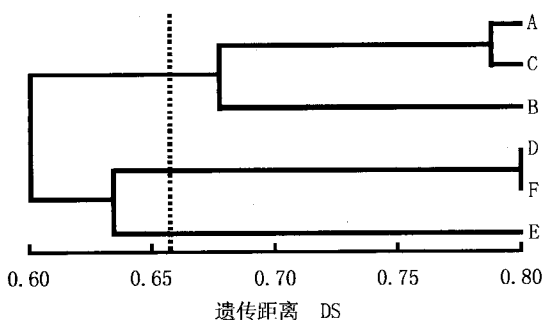
2.2 不同种源间的遗传距离及聚类分析

用 SM 方法计算 6 个金银花种源间的遗传相似系数(表 2),并进一步计算不同金银花种源间的遗传距离,依据遗传距离进行 UPGMA 聚类分析,从而获得 6 个不同金银花种源间的 RAPD 系统聚类图(图 1)。从表 2 和图 1 可以看出,当 $\lambda=0.630$ 时,可将 6 个金银花种源聚为 2 类,山东平邑、湖南隆回及江苏南京种源聚为一类;来自河南的 3 个种源(包括河南封丘的 2 个野生种源和河南密县的 1 个栽培种源)聚为一类。当 $\lambda=0.658$ 时,可将 6 个金银花种源分为 3 类,山东平邑、湖南隆回及江苏南京种源聚为一类;河南封丘的 2 个野生种源聚为一类;河南密县的栽培种源单独聚为一类。

表 2 基于 RAPD 分析的 6 个金银花种源间的遗传相似性系数¹⁾
Table 2 Similarity coefficients based on RAPD analysis of six provenances of *Lonicera japonica* Thunb.¹⁾

种源 Provenance	不同种源的相似性系数 Similarity coefficient of different provenances					
	A	B	C	D	E	F
A	1.000 0					
B	0.693 6	1.000 0				
C	0.747 7	0.639 6	1.000 0			
D	0.567 5	0.603 6	0.639 6	1.000 0		
E	0.648 6	0.594 5	0.558 5	0.576 5	1.000 0	
F	0.612 6	0.594 5	0.666 6	0.756 7	0.693 6	1.000 0

¹⁾ A: 山东平邑流域镇 Liuyu Town in Pingyi, Shandong Province; B: 江苏南京市 Nanjing City, Jiangsu Province; C: 湖南隆回县 Longhui County, Hu'nan Province; D: 河南封丘县杨许寨 Yangxuzhai Village in Fengqiu County, He'nan Province; E: 河南密县(栽培) Mixian County, He'nan Province(cultivated); F: 河南封丘县城郊 Suburbs of Fengqiu County, He'nan Province.



A: 山东平邑流域镇 Liuyu Town in Pingyi, Shandong Province; B: 江苏南京市 Nanjing City, Jiangsu Province; C: 湖南隆回县 Longhui County, Hu'nan Province; D: 河南封丘县杨许寨 Yangxuzhai Village in Fengqiu County, He'nan Province; E: 河南密县(栽培) Mixian County, He'nan Province(cultivated); F: 河南封丘县城郊 Suburbs of Fengqiu County, He'nan Province.

图 1 6 个金银花种源的聚类图

Fig. 1 Dendrogram of six provenances of *Lonicera japonica* Thunb.

3 讨 论

不同金银花种源间的 RAPD 条带存在不同程度的差异,说明不同种源金银花具有丰富的遗传多样性。6 个金银花种源间的遗传多态性为 79.05%,遗传多样性较高,表明金银花各种源间存在较大的遗传差异,为进一步培育新品种提供了遗传基础。

作者在金银花道地产区山东平邑进行资源调查时发现,湖南隆回与山东平邑间有较为频繁的金银花种苗交换活动,因此,山东平邑和湖南隆回的金银花种源聚为一类可能与两地之间的互相引种有关。UPGMA 聚类图显示,来自河南的 3 个种源聚为一类,说明金银花不同种源间的遗传关系与地理分布有一定的相关性;同时,河南密县的栽培种源与河南封丘的 2 个野生种源间也存在一定的遗传差异。

研究表明,金银花种源间的遗传背景较为复杂,与地理分布有一定的相关性。利用分子生物学方法从分子水平揭示金银花种源间遗传关系的远近,不仅可为金银花的系统选育和引种栽培提供理论依据,还可为进一步研究金银花种质资源的起源和进化提供参考资料。

参考文献:

- [1] 周荣汉. 中药资源学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
- [2] 石 钺, 石任兵, 陆蕴如. 我国药用金银花资源、化学成分及药理研究进展[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(11): 724-728.
- [3] 郭巧生. 药用植物栽培学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [4] 张重义, 李 萍. 金银花药材的综合研究[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(3): 58-62.
- [5] 邢俊波. 生物多样性与中药金银花质量的关系[D]. 南京: 中国药科大学, 2001.
- [6] 钱关泽, 宋兴民, 张金保, 等. 金银花茎的比较解剖研究[J]. 聊城师院学报(自然科学版), 1998, 11(3): 65-66.
- [7] 武 焯, 黎晓敏, 熊仲良, 等. 山东和河南及重庆产金银花中绿原酸含量的研究[J]. 西南农业大学学报, 2006, 28(3): 436-438.
- [8] 于燕莉, 石俊英. RAPD 技术在金银花品种鉴定中的应用[J]. 中药材, 2000, 23(11): 678-679.