

不同种源太子参的 RAPD 分析

朱艳¹, 秦民坚^{1,①}, 杭悦宇², 郑晓清¹

[1. 中国药科大学中药资源教研室, 江苏南京 210038;

2. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014]

摘要: 应用 RAPD 标记方法分析了 15 个太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.] 种源间的遗传多样性和亲缘关系。10 条随机引物共扩增出 65 条带, 其中多态性条带 37 条, 多态性条带百分率达 56.9%。用聚类分析方法可将 15 个太子参种源分为 4 类; 地理分布越近, 太子参种源间的遗传差异越小。来源于安徽宣城的太子参种源遗传变异明显, 辽宁凤城的野生太子参与山东地区的太子参栽培种源间的亲缘关系较近, 与江苏各地太子参种源的亲缘关系则较远, 这些种源均可作为育种材料。自然环境, 尤其是生态环境的变化, 对太子参的遗传变异有一定的影响。

关键词: 太子参; DNA 随机扩增多态性; 亲缘关系

中图分类号: R931.5; S567.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2007)03-0019-04

RAPD analysis on *Pseudostellaria heterophylla* from different provenances ZHU Yan¹, QIN Minjian^{1,①}, HANG Yue-yu², ZHENG Xiao-qing¹ (1. Department of Traditional Chinese Medicine Material Resources, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(3): 19-22

Abstract: Genetic diversity and phylogenetic relationship of fifteen provenances of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. are analyzed by RAPD technique. The results show that 65 bands are amplified by ten random primers, and there are 37 polymorphic bands which account for 56.9% of total bands. Fifteen provenances of *P. heterophylla* are divided into 4 groups according to cluster analysis result of RAPD bands. The closer the geographic distances of *P. heterophylla* provenances, the less their genetic differences. The provenance from Xuancheng of Anhui Province has evident genetic variation, and the wild provenance from Fengcheng of Liaoning Province has a close phylogenetic relationship with that from Shandong Province while has a far phylogenetic relationship with that from Jiangsu Province, so these provenances can be considered as breeding materials. The natural environment, especially local ecological conditions, also shows some influences on genetic variations among different provenances of *P. heterophylla*.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.; RAPD; phylogenetic relationship

太子参为石竹科植物孩儿参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.] 的干燥块根, 具有益气生津, 补肺健脾之功效。近年来, 太子参不但在治疗肝炎、糖尿病、冠心病、心绞痛、继发性再生障碍性贫血、白细胞减少症、甲亢及淋巴结核等疑难病症方面有重要作用^[1], 而且还能用于保健食品及化妆品的研制开发, 因此市场需求量急剧增加, 种植面积也不断扩大。

江苏是太子参的道地产区, 近年来, 由于太子参野生资源日渐减少, 山东、安徽、福建和贵州等地也

开始人工栽培太子参。由于栽培环境与野生状态不同, 因此, 太子参块根在形态上发生了部分变异, 表现为栽培品种较粗壮, 而野生品种则较细小。根据前期研究结果, 在对不同产地太子参品质进行比较

收稿日期: 2006-11-24

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2005206) 和中国药科大学基金资助项目 (B0608)

作者简介: 朱艳 (1972-), 女, 江苏吴江人, 硕士, 助理研究员, 主要从事药用植物种质资源保存和生物技术等方面的研究。

① 通信作者 E-mail: minjianqin@sohu.com

分析^[2]的基础上,作者认为在 DNA 分子水平上对太子参药材道地性的生物学基础进行探讨,并确立最佳生产地,对太子参优质药材的评价具有十分重要的意义。

DNA 随机扩增多态性(RAPD)是分子遗传标记技术之一,具有简单、快速和灵敏度高等特点,而且不需要预先知道目的基因的碱基顺序,仅需微量样品即可产生丰富的 DNA 多态性^[3,4],已被成功用于植物遗传多样性检测、基因定位和品系鉴定等领域。笔者对来源于江苏、山东、安徽、福建、辽宁及贵州等主要产区(包括野生和栽培)的太子参种源进行了 RAPD 分析,研究各产地不同种源间的遗传关系,为将 RAPD 标记转变为 SCAR 标记奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 15 个太子参种源包括野生种源和栽培种源。其中,野生种源来源于江苏南京紫金山(Zy)、江苏镇江宝华山(By)、江苏句容茅山(My)、江苏南京老山(La)和辽宁凤城(Ln),栽培种源来源于江苏溧阳(Ly)、江苏宜兴(Yy)、江苏句容汤山(Ty)、福建柘荣(Z1、Z2、Fj)、贵州施秉(Gz)、安徽宣城(Ah)、山东文登(Sw)和山东临沂(Sl),经中国药科大学秦民坚教授鉴定,凭证标本存于中国药科大学中药资源教研室。于 2002 年 7 月至 2005 年 6 月分别采集上述 15 个种源太子参的新鲜叶片或块根, -20 ℃ 保存、备用。

所用仪器有梯度 PCR 仪(Eppendorf Mastercycler Gradient, Germany); 5417R 高速冷冻离心机(Germany); DY 604S 稳压稳流电泳仪(南京新校园生物技术研究所在)和 Gel Doc 2000 凝胶成像系统(Bio-Rad)。实验用琼脂糖和 Taq DNA 聚合酶购自南京生兴生物技术有限公司; PVP 为 Amresco 公司生产; 10 bp 引物和 β -巯基乙醇购自上海生工生物技术有限公司; 其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取 太子参总 DNA 提取采用 CTAB 法^[5], 并略加改动。取适量样品(叶片或块根), 液氮速冻后研磨成细粉, 转移至 2.0 mL 聚丙烯离心管中, 加入 1.5 mL 预热的 DNA 提取缓冲液(含质量分数 2% 的 CTAB、100 mmol · L⁻¹ Tris -

HCl、20 mmol · L⁻¹ EDTA 及 1.4 mol · L⁻¹ NaCl), 65 ℃ 水浴保温 40 ~ 90 min, 8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。吸取上清液, 加入等体积氯仿-异戊醇(V:V, 24:1)萃取液, 轻轻颠倒混匀, 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 小心吸取上清液, 重复萃取 2 ~ 3 次, 直至蛋白质除尽。加入 0.7 倍体积预冷的异丙醇, -20 ℃ 静置 1 h; 4 ℃、12 000 r · min⁻¹ 离心 20 min; 弃上清液, 用 300 μ L 体积分数 70% 的乙醇漂洗沉淀 2 次, 4 ℃、12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液。室温风干, 50 μ L 双蒸水溶解 DNA。

1.2.2 RAPD 扩增反应 RAPD 反应体系总体积为 25 μ L, 反应体系包括 2.5 μ L 10 × PCR buffer、2.0 μ L 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂、2.0 μ L 2.5 mmol · L⁻¹ dNTPs、1.0 μ L 10 mmol · L⁻¹ 引物、0.2 μ L Taq DNA 聚合酶、5 ~ 10 ng DNA 模板, 双蒸水补足至 25 μ L。

扩增程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 然后进行 40 个循环反应, 反应条件为 94 ℃ 变性 1 min, 36 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 2 min; 最后于 72 ℃ 延伸 10 min。

扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 电泳缓冲液为 1 × TAE 溶液, 紫外光下检测电泳结果并拍照。

1.3 数据处理

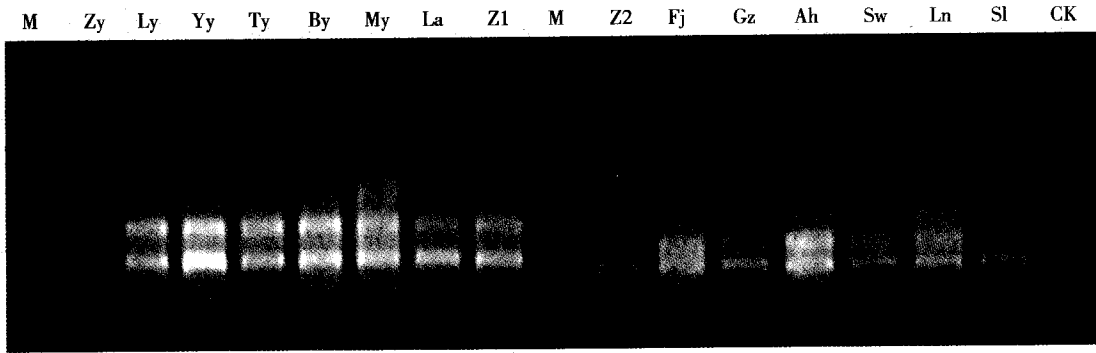
对重复性好且清晰的条带进行统计和分析。以 DNA Marker DL2000 作为分子量标记, 比较反应产物在凝胶上的迁移率, 将迁移率相同的条带视为同源位点, 得到 [1, 0] 数据矩阵(有条带计为“1”, 无条带计为“0”), 用 SPSS10.0 分析软件中的 Jaccard 方法计算各种源间的相似系数, 并用 Within groups linkage 聚类方法进行分析, 建立各种源间的亲缘关系树状图。

2 结果和分析

2.1 RAPD 扩增结果分析

随机选择 1 个样品用 40 条 10 bp 随机引物进行引物初筛, 从 40 个引物中筛选出谱带清晰且多态性较好的引物, 再选择 6 个样品对初筛出的随机引物进行复筛, 最终筛选出 10 个反应稳定且多态性较好的随机引物用于太子参种源间的 RAPD 分析, 其中引物 S8 的扩增结果见图 1。

10 条 RAPD 随机引物对 15 个太子参种源的扩增结果见表 1。由表 1 可见, 10 条 RAPD 随机引物



M: 分子量标记 Marker; CK: 空白对照 Black control; Zy: 江苏南京紫金山 Zijinshan in Nanjing, Jiangsu Province; Ly: 江苏溧阳 Liyang, Jiangsu Province; Yy: 江苏宜兴 Yixing, Jiangsu Province; Ty: 江苏句容汤山 Tangshan in Jurong, Jiangsu Province; By: 江苏镇江宝华山 Baohuashan in Zhenjiang, Jiangsu Province; My: 江苏句容茅山 Maoshan in Jurong, Jiangsu Province; La: 江苏南京老山 Laoshan in Nanjing, Jiangsu Province; Z1: 柘参1号, 福建柘荣 Zhesen No. 1 from Zherong, Fujian Province; Z2: 柘参2号, 福建柘荣 Zhesen No. 2 from Zherong, Fujian Province; Fj: 福建柘荣 Zherong, Fujian Province; Gz: 贵州施秉 Shibing, Guizhou Province; Ah: 安徽宣城 Xuancheng, Anhui Province; Sw: 山东文登 Wendeng, Shandong Province; Ln: 辽宁凤城 Fengcheng, Liaoning Province; Sl: 山东临沂 Linyi, Shandong Province.

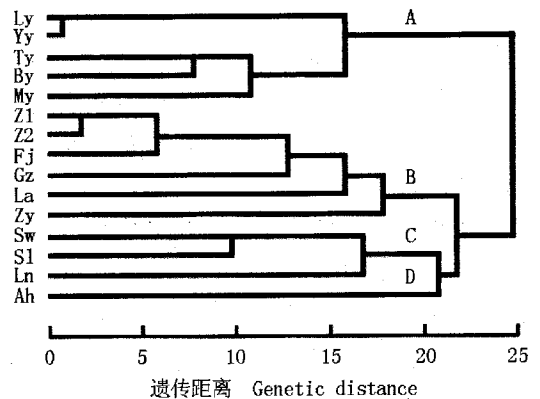
图1 引物 S8 对 15 个太子参种源的 RAPD 扩增图谱

Fig. 1 The RAPD pattern of fifteen provenances of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. amplified by primer S8

表1 用于 15 个太子参种源 RAPD 分析的引物序列及扩增结果
Table 1 The primer sequences and amplification results of RAPD analysis of fifteen provenances of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.

引物 Primer	5'→3'序列 5'→3' sequence	扩增总带数 Total number of band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性条带 百分率/% Percentage of polymorphic band
S1	CCTTGACCCA	7	4	57.1
S8	GTGACGTAGG	6	5	83.3
S12	CCTTGACCCA	5	3	60.0
S13	GAAGCCAGCC	6	3	50.0
S28	GTTTCGCTCC	6	3	50.0
S227	GTCCACACGG	6	4	57.1
S276	CAGCACCCAC	7	3	42.8
S433	AGCGTCACTC	7	4	57.1
P8	CAGGCCCTTC	7	3	42.8
P9	GTGACGTAGG	8	5	62.5
Total		65	37	56.9

南京紫金山(Zy)6个种源聚为一类(B类);山东文登(Sw)、山东临沂(Sl)和辽宁凤城(Ln)3个种源聚为一类(C类);安徽宣城(Ah)种源单独成为一类(D类)。



共扩增出 65 条带,其中多态性条带 37 条,占扩增条带总数的 56.9%,扩增产物多集中在 200 ~ 2 000 bp。

2.2 聚类分析结果

基于太子参不同种源间 RAPD 扩增结果所得的聚类分析树状图见图 2。取 $\lambda = 18.5$, 15 个太子参种源被分成 4 类,江苏溧阳(Ly)、江苏宜兴(Yy)、江苏句容汤山(Ty)、江苏镇江宝华山(By)和江苏句容茅山(My)5 个种源聚为一类(A类);福建柘荣(Z1、Z2、Fj)、贵州施秉(Gz)、江苏南京老山(La)和江苏

Zy: 江苏南京紫金山 Zijinshan in Nanjing, Jiangsu Province; Ly: 江苏溧阳 Liyang, Jiangsu Province; Yy: 江苏宜兴 Yixing, Jiangsu Province; Ty: 江苏句容汤山 Tangshan in Jurong, Jiangsu Province; By: 江苏镇江宝华山 Baohuashan in Zhenjiang, Jiangsu Province; My: 江苏句容茅山 Maoshan in Jurong, Jiangsu Province; La: 江苏南京老山 Laoshan in Nanjing, Jiangsu Province; Z1: 柘参1号, 福建柘荣 Zhesen No. 1 from Zherong, Fujian Province; Z2: 柘参2号, 福建柘荣 Zhesen No. 2 from Zherong, Fujian Province; Fj: 福建柘荣 Zherong, Fujian Province; Gz: 贵州施秉 Shibing, Guizhou Province; Ah: 安徽宣城 Xuancheng, Anhui Province; Sw: 山东文登 Wendeng, Shandong Province; Ln: 辽宁凤城 Fengcheng, Liaoning Province; Sl: 山东临沂 Linyi, Shandong Province.

图2 基于 RAPD 分析的 15 个太子参种源的聚类图
Fig. 2 The dendrogram of fifteen provenances of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. based on RAPD analysis

3 讨 论

研究表明,绝大多数地理分布距离近的太子参种源在聚类图中的距离也较近,说明这些种源间的遗传背景差异较小。来自福建柘荣的种源 Z1 和 Z2(柘参 1 号和 2 号)与另一个来自福建柘荣的种源(Fj)聚在一起,并且 Z1 和 Z2 之间的遗传距离小于它们与种源 Fj 间的遗传距离,表明柘参 1 号和 2 号之间的亲缘关系较近;来自山东临沂和山东文登的种源被聚在一起,说明两者的遗传差异很小,来自山东文登的种源(‘抗毒 1 号’)应该是由当地品种培育出的杂交新品种;来自江苏的种源,除南京紫金山和老山种源外,其余全部聚为一类(A类)。

研究还发现,生态条件,特别是小生境对太子参的遗传差异影响较大。来自江苏南京紫金山和老山的野生种源没有与其他江苏种源一起被聚到 A 类,这可能与种源间小生境的不同有关。来自南京紫金山和老山的太子参海拔分布较高,叶片浓绿色,主茎节间紫色,块根数量少;而来自镇江宝华山、句容茅山和汤山(野生变家种)的太子参种源海拔分布较低,叶片浅绿色,主茎节间淡紫色,块根数量较多,这些特征与余国奠^[6]的研究结果一致。另外,来自南京紫金山和老山的野生种源与福建柘荣和贵州施秉的种源聚为一类(B类),这些产地的太子参种源均生长在海拔较高之处。

安徽宣城种源被单独聚为一类(D类),辽宁凤城种源与山东文登和山东临沂的种源被聚为一类(C类),这与不同产地太子参 ITS 序列的研究结果^[7]基本一致,说明安徽宣城的太子参变异非常明显,辽宁

凤城的野生太子参与山东的栽培种源间的亲缘关系较近,而与江苏产太子参的亲缘关系较远,上述产地太子参均可作为育种材料加以利用。

由于太子参 RAPD 多态性的聚类分析结果与太子参的地理分布相吻合,而同一地理分布范围内,产地生态环境条件不同,太子参的遗传背景又存在不同程度的差异,为从分子生物学角度研究太子参药材的道地性提供了新的启示。

对不同产地太子参有效成分含量的比较研究结果^[2]表明,江苏溧阳产太子参的多糖含量较高,福建柘荣产太子参的总皂苷含量较高,在不同产地的太子参中,这 2 种有效成分含量的高低有变异,因此,可通过杂交、引进优良种质及选育新优良品系的方法提高太子参药材的品质。

参考文献:

- [1] 林光美. 太子参研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(6): 15-17.
- [2] 秦民坚, 余永邦, 黄文哲, 等. 不同产地太子参的品质分析[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(5): 29-32.
- [3] Welsh J, Moglewomd M. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 7213-7218.
- [4] Willia J G K, Kubelik A R, Livar K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 6531-6535.
- [5] Clark M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉译. 北京: 高等教育出版社, 1998. 3-7.
- [6] 余国奠, 刘学平, 龚祝南, 等. 南京老山地区孩儿参(太子参)居群变异体的形态学与生态学特征研究[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(1): 5-8.
- [7] 余永邦, 秦民坚, 梁之桃, 等. 不同产区太子参的 rDNA ITS 区序列的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 1-5.