

黄花蒿种质资源的 RAPD 分析

郑丽屏¹, 王剑文^{2*}, 谭仁祥³

(1. 苏州大学城市科学学院 园艺系, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123;

3. 南京大学功能生物分子研究所, 江苏 南京 210093)

摘要:目的 研究青蒿素高产的黄花蒿植株的遗传多样性特征。方法 结合青蒿素量的测定, 应用 RAPD 技术对 10 个产地黄花蒿进行遗传多样性分析。结果 发现 RAPD 多态位点为 53.6%, 证明在黄花蒿野生群体中存在较丰富的遗传多样性。UPGMA 分析表明: 在黄花蒿中可能至少存在具有遗传分化的 4 个分支, 黄花蒿遗传分化与青蒿素量的变化及地理分布有一定的相关性。结论 黄花蒿具有明显的遗传分化, 这些遗传分化是黄花蒿种质资源筛选的关键, 是青蒿素“高量育种”和生物技术开发的基础。

关键词: 黄花蒿; 青蒿素; RAPD

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)04-0602-04

RAPD Analysis of germplasm resource in *Artemisia annua*

ZHENG Li-ping¹, WANG Jian-wen², TAN Ren-xiang³

(1. Department of Horticulture, School of Urbanology, Soochow University, Suzhou 215123, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China; 3. Institute of Functional Biomolecules, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity of higher artemisinin-yielding *Artemisia annua*.

Methods With the chemical investigation of artemisinin contents, RAPD analyses of selected plants from ten various habitats in China were carried out using arbitrary primers. **Results** The RAPD data clearly indicated the genetic diversity level in *A. annua* was relatively high with 53.6% polymorphic sites. UPGMA Analyses of RAPD and phytochemical trait data showed that the wide phytochemical diversity was included within the genetic diversity being present in at least four geographical regions. **Conclusion** Artemisinin has obvious inherited differentiation that further support the prospects for selection and breeding of superior artemisinin containing lines.

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinin; RAPD

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 为菊科蒿属植物, 是传统的清热、抗疟中草药。1972 年, 我国中医研究院从黄花蒿中分离出新型倍半萜内酯——青蒿素 (artemisinin), 青蒿素已成为世界卫生组织推荐的高效抗疟药品^[1,2]。目前, 世界青蒿素药物生产主要依靠我国从黄花蒿中提取, 其产量受到地理环境和季节的限制, 难以满足市场需求^[3]。黄花蒿的优良品种筛选是栽培生产和生物技术生产的基础, 分析各地黄花蒿的遗传多样性及相互关系, 将对黄花蒿资源开发、保护以及新品种培育都有重要意义。应用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术^[4], 在 DNA 水平上结合青蒿素量分析, 探讨我国黄花蒿主产地野生群体的遗传分化程度, 分析青蒿

素在本种中的分布规律以及与 DNA 分子特征的联系性, 为黄花蒿的栽培生产和育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料: 2000 年 7 月采集各地野生黄花蒿, 株高约 50 cm, 随机选取 10 株植株, 取用中部成熟叶片。采集地分别为各市郊荒地, 分布如下: 山东烟台 (YT, 样品代号, 下同)、陕西杨陵 (YL)、北京 (BJ)、湖北襄樊 (XF)、江苏南京 (NJ)、安徽滁州 (CZ)、重庆 (CQ)、云南昆明 (KM)、贵州贵阳 (GY)、福建厦门 (XM)。

1.2 DNA 的提取分离: 根据顾红雅等^[5]的方法, 应用 SDS (十二烷基磺酸钠) 提取叶片 DNA, 在 DNA 提取液中添加具有抗氧化和稳定作用的 1%

收稿日期: 2006-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30470191); 江苏省高校自然科学基金项目 (05KJB360120); 苏州大学医学发展基金项目资助 (EE132514)

作者简介: 郑丽屏 (1965—), 副研究员, 现从事植物花色、抗性活性成分次生代谢生物技术研究。E-mail: lpzheng@suda.edu.cn

* 通讯作者 王剑文 Tel: (0512) 61124708 E-mail: jwwang@suda.edu.cn

非可溶性聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、30 mmol/L 抗坏血酸,并提高提取液中的 β -巯基乙醇浓度 (2 mol/L) 以排除杂质的干扰。

1.3 RAPD 分析

1.3.1 扩增反应条件及程序:DNA 扩增在 PTC-200 型 PCR 仪上进行,反应条件经比较和优化确定为:25 μ L 的反应液内含总 DNA 模板为 50 ng、引物 10 pmol、0.2 mmol/L dNTP (Promega 公司)、0.5 U *Taq* DNA 聚合酶 (华美生物工程公司),5 个循环的预变性:每一个循环设置 94 $^{\circ}$ C、1 min; 35 $^{\circ}$ C、2 min; 72 $^{\circ}$ C、2 min。40 个变性—退火—延伸循环:94 $^{\circ}$ C、30 s; 35 $^{\circ}$ C、1 min; 72 $^{\circ}$ C、2 min。然后 72 $^{\circ}$ C、5 min。最后在 4 $^{\circ}$ C 保温。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (0.5 μ g/mL 溴乙锭),美国 GDS7500 凝胶成像系统中紫外显色照相。

1.3.2 引物筛选:首先筛选了 Operon Technologies Inc. (美国) 生产的 A、B、C 组的部分共 60 个引物。选扩增条带较多、信号强、背景干净、扩增产物大小在 150~2 000 bp 的引物做正式实验。实验使用的引物为 OPA-02、06、10、OPB-02、03、10、11、OPC-02、04、08。引物序列见表 1。

表 1 10 个随机扩增引物及 RAPD 标记数

Table 1 Sequence of ten primers and RAPD makers in *A. annua* from various habitats

引物	序列	总带数	多态性带数
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	6	3
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	6	4
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	7	2
OPB-02	5'-TGATCCCTGG-3'	5	3
OPB-03	5'-CATCCCCCTG-3'	9	5
OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'	8	5
OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'	8	6
OPC-02	5'-GTGAGGCGTC-3'	7	2
OPC-04	5'-CCGCATCTAC-3'	7	4
OPC-08	5'-TGGACCGGTG-3'	6	3
Total	10	69	37

1.3.3 数据处理方法:对不同地区个体所扩增 DNA 条带量化为 1 或 0 (条带存在为 1,条带不存在为 0),在相同实验条件下,迁移率相同的条带视为同源位点。不同个体的相关性系数利用公式 $SI = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$ 计算^[6],其中 A 和 B 为两个个体, N_A 为 A 个体扩增的条带数, N_B 为 B 个体扩增的条带数, N_{AB} 为个体 A 和 B 扩增的总条带数。用非加权配对平均聚类分析 (unweighted pairing group method using arithmetic averages, UPGMA) 和最短距离法将相似性系数矩阵转换为树状图。

1.4 黄花蒿叶片青蒿素量分析

1.4.1 青蒿素的提取:黄花蒿叶片于 50 $^{\circ}$ C 烘干,研成细粉,称取 0.500 g,加石油醚 (30~60 $^{\circ}$ C) 30 mL,在超声波浴中提取 30 min,滤过,蒸干石油醚。残渣用 2 mL 乙醇溶解,3 000 $\times$ g 离心 10 min,上清液滤入 10 mL 量瓶中,乙醇定容,用于青蒿素的测定。

1.4.2 青蒿素的测定:取提取液 200 μ L 于 10 mL 试管中,加 800 μ L 乙醇、4 mL 0.2% NaOH 溶液,摇匀。于 50 $^{\circ}$ C 水浴中反应 30 min。流水中冷却至室温后,取出 0.5 mL 反应液于 1.5 mL 离心管中,加入 100 μ L 乙醇、400 μ L 0.16 mol/L 醋酸,混匀,3 000 $\times$ g 离心 10 min,上清液用于测定。按照同样方法制备青蒿素对照品溶液,对照品质量浓度分别为 0.4、8、12、16、20、24 μ g/mL,青蒿素对照品由本实验室提取、分离,并经波谱鉴定^[7]。青蒿素测定参照 Zhao 等^[8]的 HPLC 法,液相色谱测定条件:色谱柱为 Hypersil BDS C_{18} 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm),流动相为甲醇-0.01 mol/L NaAc/HAc 缓冲液 (pH=7.0) (40:60),体积流量为 1.0 mL/min。高压液相色谱仪为 Waters 600E HPLC 系统。紫外检测器波长设在 260 nm。注射体积 10 μ L。在上述条件下,青蒿素的出峰时间大约在 10.3 min。同一地区取来自 10 株的叶片样品测定,数值为平均值 $\pm$ 标准差。

2 结果

2.1 不同地区黄花蒿叶中青蒿素量分析:不同地区黄花蒿叶中青蒿素量的变化见图 1,就所分析的 10 个地区样品而言,青蒿素量在各地区中差异较明显,青蒿素量在地区间相差达 4 倍。青蒿素量较高的样品 (>7.0 mg/g),分别出现于 3 个地区中 (重庆、昆明、贵阳),其中重庆的黄花蒿叶片中青蒿素量达最高值 (74.5 mg/g)。我国北方地区如山东烟台、陕西杨陵黄花蒿叶片青蒿素量较低 (1.86、3.62 mg/g)。中部及东南部地区的黄花蒿叶片青蒿素量介于其间。青蒿素高产的黄花蒿与其他地区的黄花蒿在形态上有一定区别,具有较长的节间和较粗的茎秆。就总体来说高纬度、低海拔地区节间较短、茎秆较细的黄花蒿叶片中青蒿素量较低。

2.2 RAPD 分析

2.2.1 随机扩增能力和多态性分析:本试验共选用 60 个随机引物进行 PCR 扩增,其中 46 个引物能产生多态性,占供试引物的 76.7%,其多态性随引物的不同而表现出差异。从中筛选出谱带清晰并呈多态的引物 10 个,并对这 10 个引物的扩增结果进行了统计分析 (表 1)。共产生了 69 条扩增产物,不同

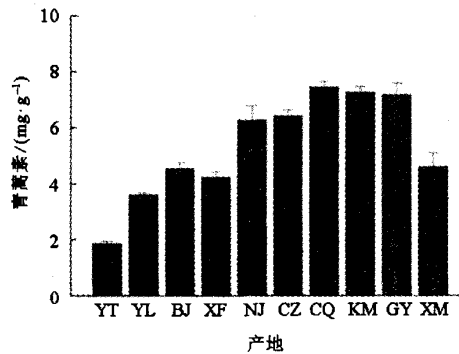


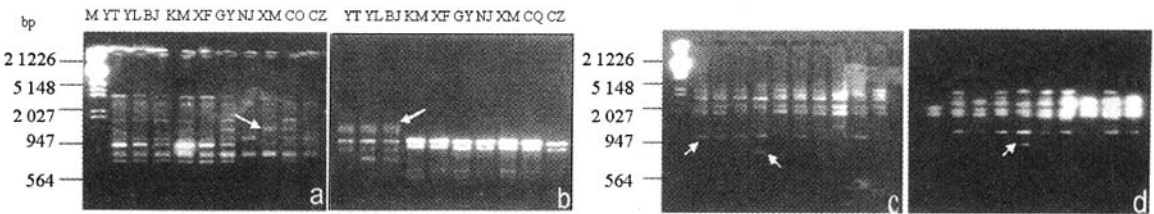
图 1 不同地区黄花蒿叶中青蒿素的量
Fig. 1 Artemisinin in leaves of *A. annua* from various habitats

引物的扩增带数变幅从 5 条到 9 条不等,平均每个引物可扩增 7 条。69 条扩增产物中有 32 条在各产地黄花蒿之间无多态性,37 条(53.6%)有多态性,每个引物扩增的多态带不等,从 2 条到 6 条变化,平均为 3.7 条。这表明不同产地黄花蒿物种间具有多态性,遗传多样性较丰富。

2.2.2 与青蒿素的量相关的 RAPD 分析:由于 RAPD 是一种显性标记,通常 RAPD 分析中一条带就代表基因组一个位点的产物。在笔者实验的 RAPD 标记中,多数产地样品都具有区别与其他地区个体的扩增条带(图 2)。在 OPB-11 引物扩增图中(图 2-a),1500bp 特征带仅出现在青蒿素量高

的地区(重庆、昆明、贵阳)及厦门地区的样品中。青蒿素量低的地区如山东烟台、陕西杨陵、北京产地的黄花蒿基因组通过引物 OPB-03 的扩增也获得 1 580 bp 的特征带(图 2-b),在青蒿素量高的地区(重庆、昆明、贵阳)和量低的地区(烟台、杨陵、北京)的黄花蒿中,OPB-03 引物扩增图表明样品具有 1 100 bp 特征带(图 2-c),昆明和襄樊的黄花蒿还各有一条 750 bp(图 2-c)和 800 bp(图 2-d)的特征带。这些特征带可能与青蒿素的形成有一定的关系,可进一步筛选作为黄花蒿优良种质筛选的分子标记。

不同地区黄花蒿除了具有不同的特征带外,各产地样品间的遗传相似性也不同,通过对样品共 69 个基因位点的检测,用 Nei 和 Li 的遗传相似系数建立了不同地区黄花蒿的遗传关系(表 2)。青蒿素量高的地区(重庆、昆明、贵阳)的黄花蒿间的 SI 值为 0.945~0.982,青蒿素量低的我国北方地区如山东烟台、陕西杨陵、北京产地个体黄花蒿间的 SI 值为 0.909~0.964,说明地区内黄花蒿具有较高的遗传相似性。而在青蒿素量不同的两大地区(北方和西南区),SI 值为 0.673~0.782,西南区和东部地区(南京、滁州、厦门)黄花蒿间的 SI 值为 0.709~0.764,显示出地区间的遗传分化。RAPD 扩增结果的 UPGMA 聚类分析也表明(图 3):在黄花蒿中可能至少存在 4 类具有遗传分化的植株系,重庆、昆



a-OPB-11 b-OPA-06 c-OPB-03 d-OPB-10 M-λDNA/Eco RI, Hind Ⅲ 分子量标记
a-OPB-11 b-OPA-06 c-OPB-03 d-OPB-10 M-λDNA/Eco RI, Hind Ⅲ molecular marker

图 2 随机引物在不同产地黄花蒿基因组中的扩增图谱

Fig. 2 Fingerprints of ten *A. annua* samples from various habitats with four primers

表 2 不同地区黄花蒿的遗传相似系数 (SI)

Table 2 Coefficients of genetic similarity of *A. annua* from various habitats based on RAPD data

样 品	YT	YL	BJ	KM	XF	GY	NJ	XM	CQ	CZ
YT	1.000									
YL	0.964	1.000								
BJ	0.909	0.909	1.000							
KM	0.764	0.764	0.709	1.000						
XF	0.800	0.836	0.782	0.782	1.000					
GY	0.727	0.727	0.673	0.745	0.745	1.000				
NJ	0.836	0.836	0.782	0.745	0.855	0.745	1.000			
XM	0.873	0.873	0.855	0.745	0.855	0.709	0.891	1.000		
CQ	0.782	0.782	0.727	0.982	0.800	0.945	0.764	0.764	1.000	
CZ	0.855	0.855	0.800	0.727	0.800	0.764	0.909	0.909	0.745	1.000

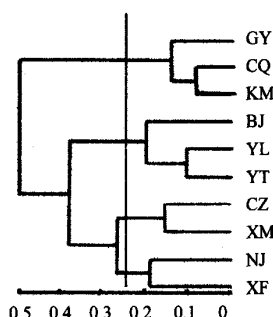


图3 不同产地黄花蒿 RAPD 标记资料的遗传距离聚类图谱

Fig. 3 Dendrogram generated of *A. annua* from ten various habitats based on RAPD data

明、贵阳地区的黄花蒿遗传距离较小,聚为一类,和分析的其他地区个体存在较大的遗传差异。北京、杨陵、烟台的聚类在一起。滁州、厦门和南京、襄樊各自聚成一类。可见黄花蒿遗传分化与青蒿素量的变化及地理分布基本相似。

3 讨论

黄花蒿广泛分布于我国各地,多生长于海拔400 m 以下的丘陵平地、山坡、林缘及荒地。青蒿素的量明显受生长期中各种环境因素如营养条件、光温变化和外源激素等的影响^[9],随产地不同差异极大。钟凤林等^[10]报道了重庆酉阳、福建厦门、湖北咸宁、北京通县的黄花蒿中青蒿素量的差异(0.097%~1.2%)。本实验表明,青蒿素量在各地黄花蒿中差异较明显。西南地区(重庆、昆明、贵阳)黄花蒿青蒿素量较高,我国北方地区如山东烟台、陕西杨陵黄花蒿叶片青蒿素量较低,中部及东南部地区的黄花蒿青蒿素量介于其间。传统生药学上“道地药材”的生物学内涵是同种居群间的植物化学成分上的不同^[11],所谓“道地药材”的形成应是基因型与环境之间互作的产物。当一个种具有较广的分布区时,它的各个不同地区的居群往往具有不同的基因型,或称为地方性特化基因型(local specialized genotype),而这些基因型是由于不同的生态和地理的条件长期选择作用塑造而成,是产生“道地药材”的遗传本质^[12]。笔者首次通过 RAPD 技术比较了分布于我国的黄花蒿不同居群之间在遗传物质上的变化,RAPD 位点多态性及各居群中特征谱带的出现都表明:我国黄花蒿群体中具有较丰富的遗传多

样性,这些遗传分化是黄花蒿种质资源筛选的关键,是青蒿素“高产育种”和生物技术开发的基础。本实验通过对黄花蒿各居群间的相似系数和遗传距离的分析,给出了各地黄花蒿之间的聚类关系图,结果说明,黄花蒿长期受不同地区的气候、土壤等各种生态环境的影响,形成不同的遗传分化。在所研究的样本中,大体可以分为4类具有遗传分化的植株系。黄花蒿遗传分化与青蒿素量变化及地理分布上基本对应。西南地区黄花蒿青蒿素高量变异是以该地区黄花蒿的遗传分化为基础的。在栽培、选育和生物技术应用上应优先选择这一地区的黄花蒿种质,以达到“有效成分”高产的目的。

References:

- [1] The Cooperation Research Group on Artemisinin Structure. A novel sesquiterpene lactone-artemisinin [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1977, 22: 142-145.
- [2] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China [J]. *Science*, 1985, 228: 1049-1054.
- [3] Luo X D, Shen C C. The chemistry, pharmacology and clinical applications of Qinghaosu (artemisinin) and its derivatives [J]. *Med Res Rev*, 1987, 7: 29-52.
- [4] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213-7218.
- [5] Gu H Y, Qu L J, Ming X T, et al. *Plant Gene and Molecular Manipulation* (植物基因与分子操作) [M]. Beijing: Peking University Press, 1995.
- [6] Nei M, Li W A. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 5269-5273.
- [7] Tang H Q, Hu J, Yang L, et al. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species [J]. *Planta Med*, 2000, 66: 391-393.
- [8] Zhao S S, Zeng M Y. Spektrometrische hochdruck-flüssigkeits-chromatographische (HPLC) untersuchungen zur analytik von Qinghaosu [J]. *Planta Med*, 1985, 51: 233-237.
- [9] Wang S G, Liang Y. The ecological and physiological character of *Artemisia annua* and its comprehensive utilization [J]. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2003, 22: 47-49.
- [10] Zhong F L, Chen H R, Chen M. The optimum collection period, plant parts and desiccation method for *Artemisia annua* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22: 405-406.
- [11] Zheng J S. The forming and development of orthodox TCM (I) [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1990, 13: 43-45.
- [12] Huang L Q, Yang B, Wang Min, et al. The study on some problems in the developing on the resources of medicinal plants in China [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24: 70-73.