

山茱萸不同栽培品种的 RAPD 分析

陈随清^{1,2}, 王利丽¹, 冀春茹¹

(1. 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2. 郑州大学基础医学院 博士后流动站, 河南 郑州 450052)

摘要:目的 分析山茱萸不同栽培品种之间的遗传关系, 为山茱萸品种选育提供依据。方法 采用改良后的 CTAB 法从山茱萸叶片中提取总 DNA, 进行 RAPD 分析; 采用 SPSS10.0 软件计算 DICE 遗传相似性系数, Between-groups linkage 方法聚类, 构建亲缘关系树系图。结果 共筛选出 22 个 10 个碱基随机引物用于 PCR 扩增, 12 个样品获得了 133 条带, 其中多态性条带 75 条, 占 56.39%。聚类分析结果表明: 纺锤形果型自成一类, 短梨形果型与短圆柱形果型聚为一类, 其余几种较长大的果型聚为一类, 反映了栽培过程中人为选择的后果。结论 实验结果与山茱萸栽培品种的生物特性和区域分布基本一致; RAPD 分析可作为对山茱萸品种选育的辅助手段。

关键词: 山茱萸; 栽培品种; RAPD

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)03-0430-03

RAPD Analysis on different cultivars of *Cornus officinalis*

CHEN Sui-qing^{1,2}, WANG Li-li¹, JI Chun-ru¹

(1. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Postdoctor Program Station, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To analyze the genetic relationship among the different cultivars of *Cornus officinalis* and provide some foundation for heredity breeding. **Methods** A modified method of extracting total DNA from the leaves of *C. officinalis* was selected by improving the traditional method-CTAB, the total DNA was analyzed by RAPD; the genetic similarity correlation was calculated by SPSS 10.0 DICE method, cluster analyses were carried out using Between-groups linkage method, and the genetic dendrogram was established. **Results** Random primers (22 10-bp) were selected to be used for the PCR, a total of 133 bands were amplified by 12 samples, among which 75 bands were polymorphic, accounting for 56.39%. The cluster analysis indicated that: spindleform itself was one group, short pear-shape and short cylinderform clustered together, the rest longer types clustered together, which reflected the result of artificial selection in the course of cultivating. **Conclusion** The result keeps accordance with the biologic character and territorial distribution of *C. officinalis* cultivars; RAPD analysis is an assistant mean for seed breeding of *C. officinalis*.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; cultivars; RAPD

山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 为我国常用中药材, 俗名山萸肉、萸肉、药枣、枣皮, 具有补益肝肾、涩精固脱的功效。主要分布于我国的河南、浙江、陕西等省, 四川、安徽、山东亦有分布。山茱萸在长期的应用和栽培过程中, 种内产生很大变异, 出现较多栽培品种, 主要表现在这些品种的果实从形状、大小、颜色、质量到产量、干果肉(药材)得率等具有较大的差异, 即它们的经济价值是明显不同的^[1]。笔者分别到河南的西峡县、内乡县、栾川县, 浙

江的临安市、淳安市, 陕西的周至县、佛坪县等地进行了调查研究, 发现山茱萸种内性状变异现象在国内主要产区普遍存在, 各品种的性状是稳定的, 具有遗传性。

本实验从山茱萸 7 个农家品种 12 个样品干燥叶中成功地提取出了 DNA, 通过对 200 个上海生工 S 系列引物进行试验, 筛选出 22 个随机引物进行了 RAPD 分析, 以探讨不同品种间的亲缘关系, 并初步构建了 7 个农家品种的 RAPD 指纹数据库, 为山

收稿日期: 2005-05-09

基金项目: 河南省杰出青年基金项目(0412000700); 河南省高校杰出科研人才创新工程基金项目(2004KYCX007)

作者简介: 陈随清(1965—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药规范化种植及质量标准研究, 发表论文 30 余篇, 参编著作 5 部。

Tel: (0371)65680002 Fax: (0371)65962546 E-mail: suiqingchen@sohu.com

茺葇种质资源保护和品种鉴别提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料: 山茺茺叶分别采于河南的西峡县、内乡县、栾川县, 浙江的临安市、淳安市, 陕西的周至县、佛坪县等地, 经笔者鉴定, 材料名称及产地见表 1。采集无病虫害的新鲜叶片, 硅胶快速干燥, 备用。

表 1 供试样品材料

Table 1 Plant materials tested

编号	样品名称	产地	采集时间
1	纺锤形果型	河南西峡县	2003-10-10
2	椭圆形果型	河南西峡县	2003-10-10
3	椭圆形果型	河南内乡县	2003-10-10
4	长梨形果型	陕西周至县	2003-10-16
5	长圆柱形果型	浙江临安市	2003-09-28
6	圆柱形果型	河南栾川县	2003-10-10
7	长圆柱形果型	河南栾川县	2003-10-10
8	圆柱形果型	陕西佛坪县	2003-10-16
9	短梨形果型	陕西佛坪县	2003-10-16
10	短梨形果型	陕西周至县	2003-10-16
11	短圆柱形果型	河南内乡县	2003-10-10
12	短圆柱形果型	浙江淳安市	2003-09-28

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取: 取同一产地同一品种 5~10 株的植物叶片 (变色硅胶快速干燥), 混合后称取 1 g, 经液氮处理提取基因组 DNA。总 DNA 的提取采用改良后的 CTAB 法^[2]。

1.2.2 引物筛选: 实验用了 200 个上海生工公司生产的 S 系列引物进行了研究筛选, 从中选出了 22 个条带清晰、重现性好、多态性强的引物, 进行全部样品的 PCR 扩增。筛选出的 22 个随机引物及碱基序列见表 2。

表 2 扩增所用的 22 个引物及其序列

Table 2 Primers (22) and their sequences amplified

引物	序列	引物	序列
S28	GTGACGTAGG	S201	GGGCCACTCA
S37	GACCGCTTGT	S207	GGCAGGCTGT
S38	AGGTGACCGT	S211	TTCCCCGCGA
S43	GTGCGCGTCA	S214	AATGCCGCAG
S45	TGAGCGGACA	S275	ACACCGGAAC
S99	GTGAGGGCAA	S277	GTCTGGGTT
S115	AATGGCGCAG	S333	GACTAAGCCC
S118	GAATCGGCCA	S354	CACCCGGATG
S121	ACGGATCCTG	S367	AGCGAGCAAG
S157	CTACTGCCGT	S382	TGGGCGTCAA
S198	CTGGCGAACT	S393	ACCGCCTGCT

1.2.3 PCR 反应: 反应体系为 25 μ L; 其中 20 pmol/L 引物 2 μ L, 核 DNA 约 30~40 ng/ μ L 2 μ L, 1 U/ μ L Taq 酶 2 μ L, dNTPs 各 2.5 mmol/L 1.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, ddH₂O 13 μ L。

扩增程序: 预变性 94 $^{\circ}$ C、8 min; 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C、1 min, 38 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1.5 min; 后延伸 72 $^{\circ}$ C、5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

检测: 取 5 μ L 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上用 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液电泳, 0.5 ng/mL 溴化乙锭染色, 紫外检测, 凝胶电泳图像分析系统拍照, 见图 1。

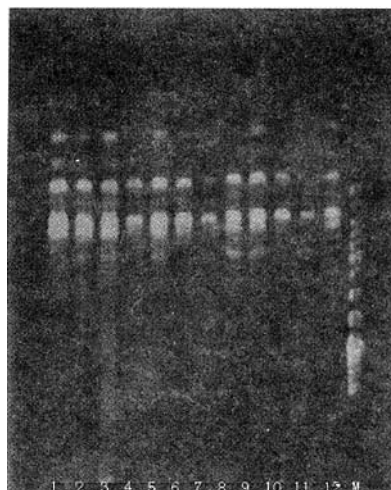


图 1 引物 S115 对不同山茺茺样品的扩增结果 (图上的数据为个体编号)

Fig. 1 RAPD Amplified products generated by Primer S115 to *C. officinalis* samples (data in figure are numbers of individual samples)

1.3 数据处理: 通过对 200 个引物进行筛选, 最终选出条带清晰、多态性明显, 扩增产物相对分子质量在 100~2 000 bp 的随机引物进行 PCR 扩增, 检测计算有效位点数, 将迁移率相同的电泳条带作为同原位点处理, 强带计为 1, 弱带或无带计为 0, 得到每一引物不同谱带与材料的 1、0 化数据矩阵, 进行统计分析。计算遗传系数 $F[F = 2N_{AB}/(N_A + N_B)]$; N_A 、 N_B 分别代表基因型 (或个体) A 和 B 所具有的条带数, N_{AB} 则表示 A、B 两个基因型共有的条带数] 和遗传距离 $D(D = 1 - F)$, 利用 SPSS10.0 软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 多态性及相似性分析: 实验用了 200 个上海生工公司生产的 S 系列引物进行了研究筛选, 从中选出了 22 个条带清晰、重现性好、多态性强的引物, 进行全部样品的 PCR 扩增, 总计扩增出 133 条带, 其中多态性谱带 75 条, 多态性比率为 56.39%。从遗传距离分析结果看, 种下不同农家品种的遗传距离比较接近, 为 0.065~0.279。

总体比较而言,不同品种之间的遗传距离大于同一品种不同基因型(个体)之间的遗传距离,如:椭圆形果型 2 号与 3 号、短梨形果型 9 号与 10 号、短圆柱形果型 11 号与 12 号之间分别为 0.065、0.091、0.074;1 号(纺锤形果型)与 2 号(椭圆形果型)之间为 0.140,见表 3。

表 3 各样品之间的遗传距离数据表

Table 3 Genetic distance among *C. officinalis* samples

样 品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2	0.140										
3	0.140	0.065									
4	0.249	0.172	0.140								
5	0.217	0.132	0.132	0.131							
6	0.120	0.101	0.101	0.183	0.103						
7	0.227	0.146	0.146	0.154	0.127	0.147					
8	0.209	0.125	0.104	0.134	0.137	0.137	0.111				
9	0.153	0.132	0.110	0.239	0.187	0.176	0.178	0.137			
10	0.185	0.196	0.164	0.257	0.227	0.196	0.186	0.157	0.091		
11	0.194	0.152	0.141	0.233	0.194	0.184	0.165	0.166	0.122	0.102	
12	0.159	0.160	0.160	0.279	0.237	0.204	0.194	0.196	0.106	0.097	0.074

2.2 聚类分析:聚类分析的方法是建立某种距离分析的基础上,依样品群体相似程度的大小使群体间形成一树状关系,并借以研究样品群体的相似性和遗传关系。本实验以各样本之间的遗传距离为聚类统计变量,采用 SPSS10.00 软件进行聚类分析,绘成树状图,如图 2。从图中可以看出,纺锤形果型自成一类,短梨形果型与短圆柱形果型聚为一类,其余几种成一大类。

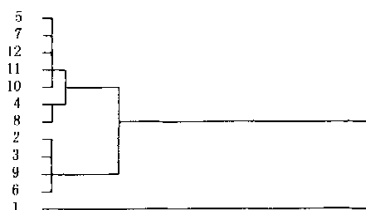


图 2 用遗传相似系数聚类分析产生的树状图

Fig. 2 Dendrogram of *C. officinalis* samples with genetic similarity analysis

3 讨论

3.1 现代研究证明:山茱萸中含有多种成分,如有机酸类、环烯醚萜苷类、鞣质类、多糖、氨基酸、维生素及矿物质等^[3]。为了评价不同品种山茱萸的质量,笔者曾以熊果酸、马钱苷、总多糖、总鞣质、水溶性浸出物和醇溶性浸出物的量为指标,利用灰色模式识别法进行综合品质评价,并结合药效学评价结果及农业经济指标,筛选出椭圆形、圆柱形、长梨形果型的山茱萸为优良栽培品种^[4]。

3.2 实验结果和山茱萸的生长和分布基本一致,从纺锤形果型山茱萸生长习性看更近于野生种;果小,每果序 1~3 个果,挂果稀少,产量低,植株抗病力弱、抗逆性差。同时,从树状图也可以看出各栽培品种之间的遗传关系,纺锤形果型与果形短小的短梨形果型和短圆柱形果型又聚为一大类,亲缘关系较近;其余几种果形较长大的品种椭圆形果型、圆柱形果型、长圆柱形果型、长梨形果型聚为一大类,品种有一定混杂。这是在长期的栽培过程中人为选择的结果,经济效益的驱使,药农总是选择果大的类型;由于缺少品种的纯化选育,加上异地品种的交流混栽,造成品种的混杂。

3.3 目前对这些农家品种的比较鉴定的研究大多停留在表现型水平^[5~7],而无法知道各变异类型之间的遗传关系。山茱萸是木本植物,从幼苗到开始挂果需要 6~8 年的时间,故以果实的性状对山茱萸的品种进行鉴别、筛选与纯化是非常困难的,长期以来药农盲目引种栽培,在主产地山茱萸的品种相当混杂,严重影响了药农的经济利益和山茱萸药材的质量。利用现代分子生物学技术对各农家品种进行 RAPD(random amplified polymorphic DNA 随机扩增多态性 DNA)分析,分析其遗传分化和遗传多样性,建立 DNA 遗传图谱,从 DNA 分子水平上建立筛选纯化山茱萸优良品种的快速、准确的科学方法,为山茱萸的种质鉴定提供线索,为山茱萸的栽培和育种提供理论依据。

References:

- [1] Chen S Q, Dong C M, Zhang Y D, et al. The survey of cultivated variety of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2002, 25(5): 305.
- [2] Chen S Q, Wang L L, Duan L L, et al. Study on method of extracting Total DNA from the leaves of *Cornus officinalis* [J]. *J Henan Coll Tradit Chin Med* (河南中医学院学报), 2004(2): 54.
- [3] Pan Y, Wang T S. Summary of the studies of the chemical composition of dogwood fruit [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1998, 14(1): 61.
- [4] Chen S Q. Study on the germplasm resources of *Cornus officinalis* and quality evaluation of different cultivated varieties of it. [A]. *Doctoral Dissertation of Beijing University of Traditional Chinese Medicine* (北京中医药大学博士研究生学位论文) [D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2003.
- [5] Shi G Z, Liu J, Li L P, et al. Quality evaluation of local cultivars of *Cornus officinalis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1989, 20(3): 36.
- [6] Liu P H, Zhou J, Wang X J. Primary study on categorization and selecting out good strains for *Cornus officinalis* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1993, 16(7): 9.
- [7] Li Z J, Zeng Y R, Qian Q. Primary investigation on intraspecific morphological variation of *Cornus officinalis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1984, 15(12): 23.