

表 3 菊花不同栽培品种的指纹特征

Table 3 Fingerprint characteristics of different cultivars of *Flos Chrysanthemi*

样 品	α							
福田白菊	<u>0.956</u>	<u>1.042</u>	(1.127)	<u>1.231</u> *	1.254	<u>1.314</u>	(1.330)	(1.412)
桐乡杭菊	<u>0.956</u>	<u>1.042</u>	1.127	<u>1.231</u>	(1.254)	1.314	(1.330)	(1.412)
盐城杭菊		<u>1.042</u>	1.127	<u>1.231</u> *			1.330	<u>1.412</u> *
贡 菊						<u>1.314</u>	<u>1.330</u> *	1.412 (1.891) <u>1.990</u>
湖北金菊			(1.231)			<u>1.314</u>	1.330	<u>1.412</u> <u>1.891</u> *
神农香菊						<u>1.314</u>	1.330	<u>1.412</u> *
								<u>1.891</u> *
								<u>1.990</u> *

下列线加 * 表示 10 强峰, 下划线表示 10 强峰或次强峰(相对峰面积大于 0.90%), 括号表示部分样品有这一特征峰

Underline and * indicate peaks are among ten largest peaks in area; Underline indicates ten largest peaks or near to ten largest peaks (their relative peak area > 0.90%); brackets indicate that only a part of this cultivar have specific peak

与菊花有明显的区别, 也有共同点。神农香菊作为野菊花的变种, 与野菊花的指纹数据差异较大, 其保留时间重叠率为 40%, 而与菊花类指纹数据较为接近, 与贡菊、杭菊(桐乡)、福田河白菊的重叠率分别为 85%、69% 和 71%, 但其尾部峰形又呈现野菊花的趋势。

3.5 由表 2, 3 可见, 图谱数据呈现明显的分类学特征: 其中杭菊系列的 3 种菊花(福田河白菊、桐乡杭菊、盐城杭菊)有较大的相似性, 他们的共有峰和强度较高的峰集中在谱图较前面的高极性部分(0.956~1.314); 而贡菊和湖北金菊的共有峰集中在谱图靠后面的低极性部分(1.314~1.900), 其中湖北金菊继承了神农香菊的品质, 其 α 值为 1.990 的峰为第一或第二强峰, 说明它们含有较大比例的芳香成分。虽然由于各品种菊花的样本太少, 难以非常准确地总

结各自的独特指纹特征, 但各样品图谱准确反映了各品种在地域和亲缘关系上的联系和区别。

综上所述, 菊花不同栽培品种同一指纹峰的相对保留值(α 值)的 RSD 小于 1% (仅 1# 共有峰的 RSD = 1.3%), 图谱具有较高的稳定性和可比性; 每一品种又有较多的 10 强峰和次强峰, 峰形也有较大的相似性; 同时图谱数据也反映了菊花各品种在地域和亲缘关系上的区别和联系, 并能与其他同属近缘植物区别开。因此, 该方法可以用于构建福田河白菊、湖北金菊、杭菊、贡菊等不同产地菊花的指纹图谱。由于菊花含有大量黄酮和色素, 易氧化, 同时各样品又采集于不同时间段, 商品等级也不同, 所以不同品种、不同样品共有峰的峰面积比有较大差异, 所以制定各栽培品种菊花的指纹图谱需要根据采收时间、储存条件、商品等级等进一步进行研究。

新疆药用桑树 9 个栽培群体的 RAPD 分析

傅大煦¹, 张 辉², 陈 纹², 苏 雪², 孙 坤^{2*}, 陈家宽^{1*}

(1. 复旦大学生物多样性科学研究所, 上海 200433; 2. 西北师范大学植物研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 目的 从 DNA 分子水平上分析新疆药用桑树资源 9 个栽培群体的遗传关系。方法 从 100 个随机引物中筛选出 10 个引物, 用这 10 个引物做 RAPD 扩增, 应用 NTSYS 软件对扩增结果进行聚类分析。结果 共扩增出 108 个位点, 其中多态性位点 91 个, 多态比例为 84.26%, 各群体间存在较明显的遗传分化。另外, 获得药桑的 8 个特异位点。结论 RAPD 分析结果与新疆药用桑树资源植物的遗传关系的传统划分是基本一致的。

关键词: 桑树; 栽培群体; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: R282.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)09-1053-04

RAPD analysis of nine populations of medicinal mulberry cultivated in Xinjiang

FU Da-xu¹, ZHANG Hui², CHEN Wen², SU Xue², SUN Kun^{2*}, CHEN Jia-kuan¹

(1. Institute of Biodiversity Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Institute of Botany, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

* 收稿日期: 2004-02-12

作者简介: 傅大煦(1963—), 男, 江苏人, 研究员, 博士, 主要从事天然药物的研究与开发和管理工作。

* 通讯作者

Abstract: Object To study the inherited relationships among nine medicinal mulberry populations cultivated in different regions of Xinjiang at DNA level. **Methods** DNA of all populations was amplified by ten random primers from 100 random primers, the polymorphic bands of RAPD were counted. And the results of populations were analyzed by clustering analysis NTSYS-PC software. **Results** A total of 108 bands was obtained, 91 of total bands (84.26%) was polymorphic. The results indicated that there were apparent and abundant genetic variations in *Morus L.* of Xinjiang. Besides, eight specific bands of *M. nigra* were obtained. **Conclusion** The genetic relationship among medicinal resources plants of mulberry in Xinjiang indicates by the RAPD analysis to be consistent with their traditional classifications in the main.

Key words: mulberry; cultivated population; RAPD; genetic diversity

桑树的各个部分均可入药, 桑叶、桑果、桑白皮、桑枝等都是传统的民间药材。桑白皮中含有桑根酮、桑味喃等多种黄酮类物质, 具有抗 AIDS 的功效^[1], 桑叶中含有一种生物碱——1-脱氧野尻霉素, 可以竞争性抑制小肠麦芽糖酶、蔗糖酶和半乳糖酶等 2-糖苷酶的活性, 从而达到抑制血糖升高, 通便利尿的功效。桑葚具有增强免疫、促进造血、抗诱变、抗衰老、抗 AIDS、降血糖、降血脂、护肝等药理功效^[2]。新疆具有丰富而独特的药用桑树种质资源, 主要有白桑 *Morus alba* L., 黑桑 *M. nigra* L. (俗称药桑) 两个桑种和白桑的 1 个变种鞑靼桑 *M. alba* L. var. *tatarica*。新疆是我国为数不多的几个药桑栽培地区之一^[3], 药桑桑葚是维吾尔族重要的民间药材, 具有补血、镇静等功效^[4]。新疆药桑具有果期长, 产果量高, 桑籽结实率低等园艺学特性, 而且出汁率高, 糖分、蛋白质及维生素含量高, 人体必需氨基酸含量丰富, 是珍贵的药物和营养制品资源, 具有很高的开发价值^[5]。

DNA 分子标记技术在药用植物研究上的应用

表 1 新疆药用桑树 9 个栽培群体的采集地点和生境

Table 1 Sampling spots and habitats of nine cultivated populations of medicinal mulberry in Xinjiang

群体编号	栽培名	学名	采集地点	个体数	生境特点
TB	白桑	白桑 <i>M. alba</i>	吐鲁番坎尔井	13	公路旁边栽培
WB	白桑	白桑 <i>M. alba</i>	乌鲁木齐市卡子湾	9	庭院栽培
ZB	白桑	白桑 <i>M. alba</i>	喀什疏附县站敏乡	12	田边路旁栽培
KB	白桑	白桑 <i>M. alba</i>	阿克苏库车县乌宗乡	8	庭院栽培
KH	黑桑	鞑靼桑 <i>M. alba</i> var. <i>tatarica</i>	阿克苏库车县乌宗乡	3	庭院栽培
AH	黑桑	鞑靼桑 <i>M. alba</i> var. <i>tatarica</i>	阿克苏地区良种厂	13	田边路旁栽培
ZH	黑桑	鞑靼桑 <i>M. alba</i> var. <i>tatarica</i>	喀什疏附县站敏乡	6	田边路旁栽培
KY	药桑	黑桑 <i>M. nigra</i>	阿克苏库车县乌宗乡	16	庭院栽培
ZY	药桑	黑桑 <i>M. nigra</i>	喀什疏附县站敏乡	2	庭院栽培

1.3.1 DNA 提取及浓度的测定: 每一个体取 1 g 干燥叶片, 利用 CTAB 法^[9]并稍做修改提取样品的总 DNA, 溶于 1×TE 缓冲液备用。利用 0.8% 琼脂糖凝胶, 在 0.5×TBE 缓冲液中 80V 电压下电泳 30 min, 以 λ DNA 为对照, 确定各样品的 DNA 浓度。

1.3.2 引物筛选: 从约 100 个随机引物中, 筛选出

越来越多^[6,7], 随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 技术因其操作简便、省时省力等优点而在药材的遗传多样性、种属特异性、生药鉴定和道地性研究等方面得到广泛的应用^[8]。为探讨新疆药用桑树不同群体的遗传关系, 本实验利用 RAPD 技术对新疆不同产地的 9 个桑树群体进行了基因组 DNA 的多态性分析, 以期新疆药用桑树资源的鉴定与开发利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料: 采自新疆境内桑属植物的 2 个种 3 个分类群共 9 个栽培群体, 其中药桑 2 个, 白桑 7 个 (其中鞑靼桑 3 个), 每群体随机选取 10 个以上的个体 (部分群体因栽培个体很少, 取样个体数较少), 共计 82 个个体 (表 1)。

1.2 仪器与试剂: 德国 Biometra 温度梯度 PCR 仪, Hettich/Zentrifugen 高速冷冻离心机, Biometra 电泳仪; Taq 酶、引物、dNTP 及 DNA Ladders 均为上海 Sangon 产品。

1.3 方法

条带整齐清晰, 重复性好, 多态性丰富的 10 个随机引物, 用于扩增反应。引物序列见表 2。

1.3.3 PCR 反应: 10 μ L 的 PCR 反应体系各组分分别为模板 1.5~2 ng/ μ L, Taq 酶 0.5 U, dNTP 各 200 μ mol/L, 引物 3 ng/ μ L, Ficol 1%, 酒石黄 1 mmol/L; 反应程序为 94.0 变性 60 s, 35.0 复

性 10 s, 72.0 延伸 20 s, 以上程序循环 1 次, 后接 40 个扩增循环为 94.0 变性 2 s, 35.0 复性 10 s, 72.0 延伸 70 s, 扩增循环结束后 72.0 再延伸 4 min。PCR 反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 利用 UV I 凝胶图象分析系统观察并照相。

1.3.4 数据处理: 选取清晰稳定的 RAPD 条带做记录, 有带的记为 1, 无带的记为 0。应用 POPGENE32 软件计算出各群体之间的 Nei 无偏差遗传距离, 应用 NTSYS-pc 软件聚类分析得到 UPGMA 树状图。

2 结果与分析

2.1 多态性条带及多态性条带比例: 从 100 个随机引物中筛选出的 10 个引物, 对新疆各地栽培的药用桑 9 个群体 82 个个体, 共扩增出 108 条带, 条带大小主要分布在 300~ 1 500 bp, 其中多态性条带 91 条, 多态性条带比例为 84.26%, 平均每个引物扩增出 10.8 条条带(表 2)。9 个群体的多态性条带数差别较大, 喀什药桑只有 5 条, 阿克苏库车的白桑和阿克苏良种厂的鞑靼桑都为 51 条, 多态性条带比例相应地分布在 4.63%~ 47.22%。药桑的多态性条带百分比较低, 仅为 25%, 而白桑达到了 70.37%, 多态性分布差异悬殊(表 3)。

表 2 用筛选出的 10 个引物扩增出的 RAPD 多态位点

Table 2 Sequences of ten arbitrary primers and their RAPD results

引物	引物序列	扩增带数	多态性带数	多态带数比例/%
S47	TTGGCACGGG	12	11	91.67
S113	GACGCCACAC	7	4	57.14
S126	GGGAA TTCGG	11	10	90.91
S341	CCCGGCA TAA	10	9	90.00
S344	CCGAACACGG	11	9	81.82
S345	CTCCA TGGGG	11	10	90.91
S356	CTGCTTA GGG	11	10	90.91
S376	GAGCGTCGAA	12	9	75.00
S423	GGTACTCCCC	10	8	80.00
S508	CCC GTTG CCT	13	11	84.62
合计/平均		108	91	84.26

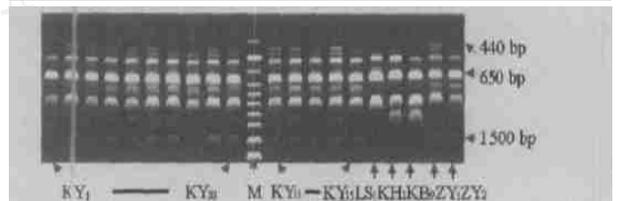
2.2 药桑和白桑两个类群的特异条带: RAPD 扩增获得的 108 个位点中有 8 个位点是新疆栽培药桑特有的, 分别为 S356 扩增的 350 和 850 bp 位点, S376 的 340 bp 位点, S341 的 600 bp 位点, S423 的 480 bp 位点, S126 的 750 bp 位点, S345 的 1 500 和 440 bp 位点。同时有 6 条是新疆栽培白桑特有的条带, 分别为 S376 的 1 300 bp 位点, S344 的 900 bp 位点, S423 的 700 和 1 300 bp 位点, S47 的 1 000 bp 位点和 S508 的 520 bp 位点。

图 1 为引物 S345 对新疆药桑 2 个群体 17 个个体与新疆白桑、鞑靼桑等群体各 1 个个体的扩增结果, 显示出药桑与桑属植物其他类群的 RAPD 带型之间具有较大的差异(LS₁ 为甘肃陇南徽县的野生鸡桑)。

表 3 药桑 2 个群体、白桑 7 个群体的遗传多样性比较

Table 3 Comparison of genetic diversity between two populations of *M. nigra* and seven populations of *M. alba*

群体名称	多态条带数	多态条带比例/%	特异条带
KY	23	21.30	
ZY	5	4.63	
药桑	27	25.00	8
WB	31	28.70	
ZB	8	7.41	
KB	51	47.22	
TB	47	43.52	
AH	51	47.22	
KH	26	24.07	
ZH	36	33.33	
白桑	76	70.37	6
桑属	91	84.26	17(共有)



材料名称见表 1(LS₁ 为鸡桑), 编号代表居群内个体; M 为 Ladders marker; 440 和 1 500 bp 为黑桑的特异条带, 650 bp 为各居群的共有条带

Samples were listed in Table 1 (LS₁ is sample of *M. australis*), number represented individuals in population; M is ladder markers; 440 and 1 500 bp are unique bands of *M. nigra*, 650 bp is one of common bands of *M. alba* L. plants

图 1 S345 扩增产生的 RAPD 带型

Fig. 1 RAPD bands amplified by primer S345

2.3 遗传距离与聚类分析: 各群体之间的 Nei's 遗传距离在 0.053 9~ 0.609 0。其中阿克苏的鞑靼桑和喀什的鞑靼桑群体之间的遗传距离最小, 仅为 0.053 9, 喀什的鞑靼桑与吐鲁番的白桑之间的距离次之, 为 0.055 0, 药桑的两个群体即喀什的药桑和库车的药桑之间的遗传距离也仅有 0.070 0。但药桑的两个群体与桑树的各栽培群体之间的遗传距离均很大, 遗传距离在 0.430 0~ 0.609 0, 而白桑及其变种鞑靼桑的不同群体之间的遗传距离则在 0.168 4 以下(表 4)。

对 RAPD 数据进行 UPGMA 聚类分析(图 2), 结果表明, 新疆药用桑属植物各群体可以明显地分为两支, 一支是乌鲁木齐、吐鲁番、喀什和阿克苏等地的白桑 4 个群体和鞑靼桑 3 个群体, 其中吐鲁番

表 4 新疆药用桑树各栽培群体间的遗传距离
Table 4 Genetic distances among nine populations of mulberry cultivated in Xinjiang

	KY	ZY	WB	KB	ZB	TB	KH	ZH	AH
KY	0.000 0								
ZY	0.070 0	0.000 0							
WB	0.562 6	0.609 0	0.000 0						
KB	0.430 0	0.472 4	0.087 6	0.000 0					
ZB	0.519 8	0.556 6	0.162 0	0.077 0	0.000 0				
TB	0.511 3	0.552 0	0.086 7	0.096 1	0.092 3	0.000 0			
KH	0.472 7	0.484 1	0.168 4	0.111 3	0.153 4	0.077 3	0.000 0		
ZH	0.503 6	0.527 4	0.158 7	0.101 9	0.078 7	0.055 0	0.079 4	0.000 0	
AH	0.516 9	0.551 8	0.142 3	0.075 9	0.117 8	0.077 8	0.087 7	0.053 9	0.000 0

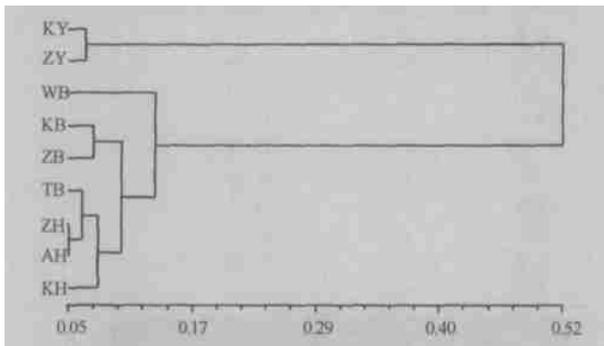


图 2 基于 RAPD 数据的 UPGMA 分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of nine populations of medicinal mulberry cultivated in Xinjiang based on RAPD data

白桑分支与鞑鞑桑的各个群体距离较近, 而乌鲁木齐卡子湾白桑却在相对较远的位置上才与白桑及其变种鞑鞑桑聚在一起, 表明白桑以及变种鞑鞑桑之间虽然有密切联系, 但两者间仍存在一定的遗传分化。另一支是喀什地区药桑和阿克苏地区药桑的 2 个群体, 说明在新疆栽培的药桑与白桑之间存在很大的遗传分化。

3 讨论

新疆具有悠久的栽桑历史, 白桑和药桑都是宝贵的药用桑树种质资源。新疆 9 个药用桑树栽培群体中有很高的遗传多样性水平, 多态位点的比例达到 84.26%, 显示新疆药用桑树拥有丰富的基因资源, 其中白桑的 7 个群体为 70.37%, 药桑的 2 个群体为 25.0%, 表明新疆药用桑树的遗传多样性主要分布于白桑之中, 而栽培药桑的遗传多样性很低。新疆药桑 2 个群体之间的遗传距离仅为 0.07, 显示出很低的遗传变异水平, 这可能与药桑在生产实践中大量采用嫁接、扦插等方式进行栽培有关, 因此应注意给药桑种质中补充其他的遗传资源。另外, 聚类分析结果表明, 新疆栽培药桑与白桑及其变种鞑鞑桑之间存在明显的遗传分化。药桑原产伊朗, 16 世纪

在我国新疆等地才有栽培。细胞学研究显示药桑为典型的二十二倍体^[10,11], 较晚的栽培历史和复杂的染色体倍性使得药桑很难在自然状况下与其他桑种发生基因交流, 这可能是造成新疆药桑与白桑之间的遗传关系相对较远的重要原因^[3]。有的学者把鞑鞑桑看作白桑在新疆独特的自然环境下分化产生的变种^[12]。本实验结果表明, 白桑及变种鞑鞑桑的栽培群体之间的遗传距离虽然均在 0.168 4 以下, 但聚类结果仍然表明二者之间存在一定的遗传分化, 支持将鞑鞑桑作为白桑的变种处理的观点。

新疆是我国道地性药桑的主产区之一, 本实验利用 RAPD 技术发现了药桑的 8 个特异性位点, 他们可以作为鉴别药桑种质资源的特异性分子标记。另外, 笔者等对新疆药用桑果药理学研究发现, 新疆药桑的药理学活性明显高于其他桑果(另文报道), 因此, 进一步研究药桑的 RAPD 特异位点, 构建药桑的遗传图谱, 将为深入研究药桑的特征序列与活性成分之间的连锁关系奠定基础。

References:

- [1] Luo S D, Nemeč J, Ning B M. Anti-HIV flavonoids from *Morus alba* [J]. *Acta Bot Yun* (云南植物研究), 1995, 17 (1): 89-95.
- [2] Liu X M, Xiao G S, Chen W D. Advances in research and development of mulberry [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(6): 569-571.
- [3] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [4] Song D K, Maimaiti Y M, Nai B J. The research of chemical component and medicinal value of *Morus nigra* L. juice in Xinjiang [J]. *Bull Sericult* (蚕桑通报), 1994, 25(4): 34-35.
- [5] Maimaiti Y M, Wu L L, Guo H R, et al. The research of germplasm resources of fruit mulberry in Xinjiang [J]. *Newletter Sericult Sci* (蚕学通讯), 2002, 22(3): 15-17.
- [6] Fu R Z, Shao P Z, Guo W Y, et al. DNA technology and its prospect in the study of medicinal plant [J]. *Adv Biol Eng* (生物工程进展), 1998, 18(4): 14-18.
- [7] Sun K, Zhang H, Chen W, et al. Review on the geo-herbalism of medicinal plant by DNA molecular markers [J]. *J Northwest Normal Univ* (西北师范大学学报), 2003, 39 (3): 100-103.
- [8] Shu Y Q, Bai S M, Chen Y H. The application of RAPD technology in the study of medicinal plant [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(2): 147-151.
- [9] Doyle J J, Doyle J L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemistry*, 1987, 19: 11.
- [10] Guo H R, Maimaiti Y M. Studies on the resources of mulberry variety in Xinjiang [J]. *Shaanxi Sericult* (陕西蚕业), 1994 (2): 7-11.
- [11] Dandin S B. Mulberry a versatile bioresource in the service of mankind [J]. *Sci Sericult* (蚕业科学), 1998, 24(2): 109-113.
- [12] The Editorial Committee of Flora in Xinjiang. *Flora of Xinjiang* (新疆植物志) [M]. Urumqi: Xinjiang Medical and Technological Publishing House, 1999, 218-220.