

- by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [5] Nagaoka T, Ogiwara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597-602.
- [6] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 440-449.
- [7] Wolff K, Morgan-Richards M. PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 282-286.
- [8] Hollingsworth M L, Hollingsworth P M, Jenkins G I, et al. The use of molecular markers to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae) [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 1681-1691.
- [9] Wolfe A D, Xiang Q Y, Kephart S R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat (ISSR) bands [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 1107-1125.
- [10] Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1998, 123: 612-617.
- [11] Jiang S Y, Chen Q F, Fang X J. RAPD and ISSR analysis between photoperiod sensitive genic male sterile rice Nongken 58S and its original variety Nongken 58S [J]. *J Agric Biotech* (农业生物技术学报), 2000, 8(1): 63-66.
- [12] Li J B, Mou T M, Fang X J. Identification and genetic analysis for 12 elite PGMS and TGMS rices based on ISSR markers [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2002, 18(1): 6-9.
- [13] Qian W, Ge S, Hong D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42(7): 741-750.
- [14] Du J K, Yao Y Y, Ni Z F, et al. Genetic diversity revealed by ISSR marker in common wheat, spelt, *compactum* and progeny of recurrent selection [J]. *Acta Genetic Sin* (遗传学报), 2002, 29(5): 445-452.
- [15] Fang X J, Wang J Q, Wang Y S, et al. SSR & ISSR molecular tagging of gene conferring resistance to race 4 of soybean cyst nematode (SCN) for soybean ZDD2226 in China [J]. *J Agric Biotech* (农业生物技术学报), 2002, (10): 81-85.
- [16] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1990, 12: 13-15.
- [17] Lau D T W, Shaw P C, Wang J, et al. Authentication of medical *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA [J]. *Planta Med*, 2001, 67: 456-460.
- [18] Ding X Y, Xu L S, Xu H, et al. Morphological and DNA molecular evidence for authentication of *Dendrobium flexicaule* from ITS allied species of *Dendrobium* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(11): 868-873.
- [19] Zhang M, Huang H R, Liao S M, et al. Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(7): 442-447.
- [20] Teng Y F, Wu X J, Xu H, et al. A comparison of matK sequences between *Herba Dendrobii* (Shihu) and its adulterant species [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(4): 280-283.

霍山石斛种内遗传稳定性的 RAPD 初探

刘石泉, 余庆波, 李小军, 周根余*

(上海师范大学生命与环境科学学院 生物系遗传学实验室, 上海 200234)

摘要:目的 研究霍山石斛荚果内遗传稳定性及荚果间的差异大小。方法 利用从 20 个随机引物筛选出来的 3 个稳定性较好的 10 碱基引物对来自 5 个不同荚果的霍山石斛种群进行 RAPD 检测。结果 5 个荚果内遗传相似系数较大, 在 92.592%~100.00%, 其中 H1、H9、H10、H14 存在一定程度的变异, H23 是一个较为稳定的群体; 5 个荚果间 H1、H9、H10、H23 的遗传距离较小, H14 与其他 4 个荚果的遗传距离则较大。结论 建立霍山石斛稳定的无性快繁体系是切实可行的, 同时说明霍山石斛种内存在一定的变异, H14 与其他荚果的差异最大。

关键词: 随机扩增多态性 DNA; 霍山石斛; 荚果; 遗传稳定性

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0427-05

Hereditary stability among species of *Dendrobium huoshanense* by RAPD

LIU Shi-quan, YU Qing-bo, LI Xiao-jun, ZHOU Gen-yu

(Laboratory of Genetics, Department of Biology, College of Life and Environment Science,

Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Objective To study the hereditary stability in the pod and the diversity within the pods of *Dendrobium huoshanense*. **Methods** Three optimal decamer oligonucleotide primers with better stability selected from 20 random primers were used to detect the populations of five different pods of *D. huoshanense* by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Results** The coefficient of genetic similarity were higher within five pods at the range of 92.592%—100.00%, the variation presented in the H1, H9, H10, and H14, but H23 was a stable group. There was a smaller genetic distance within the pods H1, H9,

收稿日期: 2004-05-22

基金项目: 上海市高等学校科学技术发展基金资助项目 (03DZ02)

作者简介: 刘石泉 (1969—), 男, 湖南益阳人, 讲师, 在读研究生, 研究方向为药用组织培养及分子检测。 E-mail: lsq205@sina.com

* 通讯作者 Tel: (021)64323698 E-mail: zhougenyu@sina.com

H10, and H23, but a bigger one between the above four and H14. **Conclusion** The establishment of rapid cloning system of *D. huoshanense* is feasible, and the results indicate that the variations exist among the above pods of *D. huoshanense* and the most diversity appears between H14 and the other four.

Key words: random amplified polymorphic DNA (RAPD); *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng; pod; hereditary stability

霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng 又名米斛, 兰科石斛属植物, 原产安徽霍山, 是药用石斛中的极品。由于石斛是一种附生植物, 对生态环境要求比较严格, 自然繁殖频率极低 (<5%), 加上长期采集, 野生植株已濒临灭绝。我国现有的 76 种石斛属植物中, 具药用价值的就有 40 多种。其药理作用主要是强阴益精、补肾益力、明目和延年益寿。近年来, 包声雪^[1]等对霍山石斛资源进行了大量研究。但对石斛离体条件下的遗传稳定性和生理稳定性缺乏基础性研究, 未能获得规范化石斛繁殖技术体系和工艺流程, 从而极大地阻碍了这一名贵中药走向市场。霍山石斛因其质量上乘而驰名中外, 多年来市场上霍山石斛有名无实、有价无市, 资源接近枯竭。现在国内外市场上, 凡冠以“霍山石斛”、“霍斗”或“野生金霍斛”等名称的一些枫斗产品, 均不是用真正的霍山石斛加工而成的^[1], 国内学者对石斛药材的分类和鉴定作了大量研究^[2~5], 但真正应用于市场还有待进一步开发。笔者实地考察了霍山县长冲乡种植的霍山石斛, 从组织形态解剖学上看, 发现已有混杂。因此有必要对霍山石斛荚果采用单荚果接种的方法进行提纯, 严格培养过程, 确保正宗的霍山石斛原种, 以期获得霍山石斛遗传性稳定的群体。本研究利用来自 5 个不同荚果的霍山石斛进行 RAPD 研究, 发现荚果内存在着较小的遗传差异, 来源不同荚果其 RAPD 条带差异性较大, 从而首次从分子水平上证明霍山石斛的产地差异较为明显, 很有可能已经混杂, 有必要对其进行种的真伪鉴定和遗传稳定性分析, 以确保获得正宗霍山石斛种群, 发挥其应有的临床疗效。

1 材料与来源

从霍山县长冲乡种植的霍山石斛中分别随机抽取 5 个单株上各一个成熟荚果, 在实验室中分别单独继代, 其采样时间和编号见表 1。分别从继代 8~10 次、生长一致的 5 个荚果群中随机抽取 10 株进行实验。10 碱基随机引物由生工公司合成, 3 个筛选出来的稳定性较好的引物为 P1341: GTCCAC-CTCT; P1349: CCGATCCAAC; P1351: ACGCGC-CTTC; Taq 酶购自生工公司。PCR 仪为美国 MJ 公

司 PTC-100TM。

表 1 5 个霍山石斛荚果的采集情况
Table 1 Collection of five pods of *D. huoshanense*

材料名称	采样时间	采集编号	实验编号
荚果 1	2002-11-22	H1	H10-H19
荚果 9	2002-11-22	H9	H20-H29
荚果 10	2002-11-22	H10	H30-H39
荚果 14	2002-11-22	H14	H40-H49
荚果 23	2002-11-22	H23	H50-H59

2 方法

2.1 DNA 的提取: 单株分别提取 DNA^[4], 将沉淀于 37 ℃干燥 30 min, 加入 30 μL TE 溶解, -20 ℃保存备用。用分光光度计测得其 DNA 质量浓度为 50 ng/μL。

2.2 PCR 条件的优化: 以张铭^[4]RAPD 反应体系条件为基准, 分别对缓冲液 (2、3、4 μL)、Mg²⁺ (2.5 mmol/L, 2、3、4 μL)、dNTPs (100 μmol/L, 0.6、1.0、1.2、2.0、3.0 μL)、引物 (0.6 μmol/L, 1.2、2.0、2.4、3.0、4.0 μL)、模板 DNA (0.5、1.0、1.5、2.0 μL)、Taq 酶 (0.5 U/μL, 0.1、0.2、0.3 μL)、复性温度 (34、36、38、42 ℃) 进行梯度筛选实验, 最后确定 30 μL 反应体系中含 ddH₂O 19.3 μL; 缓冲液 3 μL; Mg²⁺ (2.5 mmol/L) 3 μL; dNTPs (100 μmol/L) 1.2 μL; 引物 (0.6 μmol/L) 2.4 μL; 模板 DNA 1 μL; Taq 酶 (0.5 U/μL) 0.1 μL。程序: 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 50 s、36 ℃复性 1 min、72 ℃延伸 2 min, 循环 40 次; 最后 72 ℃延伸 5 min。用 1.5% 琼脂糖、3 V/cm 电压、回流冷却电泳槽凝胶电泳分离 PCR 产物, 用天龙科技有限公司 GIS-2008 凝胶成像仪成像。

3 结果

3.1 5 个荚果内遗传差异性分析: P1341、P1349、P1351 3 个引物在霍山石斛 5 个群体中的 RAPD 电泳结果见图 1。图 1 可见 H1 10 个单株带型在 3 个引物中明显分为两种 (H10、H11 相同记为 H1A, H12~H19 相同记为 H1B); H9 10 个单株带型在 3 个引物中明显分为两种 (H20~H23 相同记为 H9A, H24~H29 相同记为 H9B); H10 10 个单株带

型在 P1341 中明显分为 3 种(H30、H37 相同记为 H10A, H31、H32 相同记为 H10B, H33、H34、H35、H36、H38、H39 相同记为 H10C), 在 P1349 中条带一致, 在 P1351 中则只有 H31、H32 与其他 8 株相

比, 少一条带; H14 10 个单株带型在 3 个引物中只有 H43 增加了一条条带, 记为 H14B, 其余的均相同, 记为 H14A; H23 10 个单株带型在 3 个引物中则完全一致。

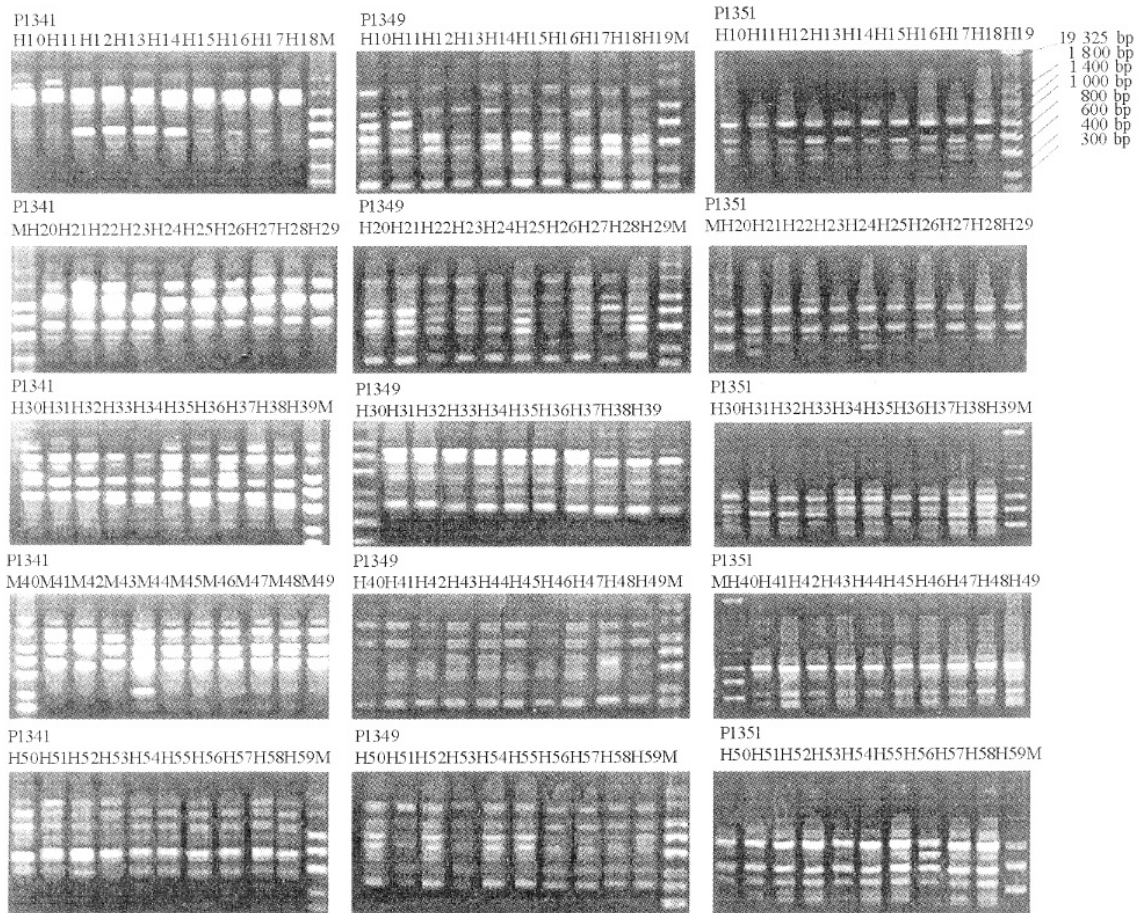


图 1 P1341、P1349、P1351 3 个引物在霍山石斛 5 个群体(10 个体/群体)中的 RAPD 电泳结果
Fig. 1 RAPD electrophoretograms from five pod groups of *D. huoshanense* with three primers of P1341, P1349, and P1351 (ten individuals per group)

统计 5 个群体中的 RAPD 电泳结果时舍弃小于 200 bp 和大于 2 500 bp 的条带, 只采用 200~2 500 bp 的重复性较好的条带, 以 100 bp Markers (Biolab 公司)作为相对分子质量标记的标准, Cross Checker (J. B. Buntijer, 1999)软件将每个样品的扩增带型中按有或无来记录, 有此条带赋值 1, 无此条带赋值为 0, 计算遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD)。GS = $2N_{AB} / (N_A + N_B)$ (N_{AB} 是样品 A 和样品 B 共有的条带数, N_A 和 N_B 分别是样品 A 和样品 B 具有的条带数), GD = 1 - GS。从表 2 看, 荚果内的 GS 是很高的, 最低的也有 92.592 6%, 最高为 100%, 这主要是由于兰科植物属于严格自花授粉且

分别来自独立荚果, 应该都象 H23 一样, 条带完全一致。至于荚果内出现的 2 种或 3 种 RAPD 带型, 笔者认为主要是在组培过程中出现的变异, 因为在组织培养过程中, 其变异是普遍存在的, 如薛建平^[7]等、陆伟达^[8]等、李亮亮^[9]等分别在药菊、麻疯树、掌叶半夏组织培养过程中等均有大量的报道。

3.2 5 个荚果出现的 10 种 RAPD 带型的遗传差异性分析: 3 个引物在 5 个荚果内出现的 10 种 RAPD 带型见图 2。5 个荚果间的 RAPD 带型较为不一致, 其 GD 分析见表 3。5 个荚果内的不同 RAPD 带型之间的 GD 明显要小得多, 而荚果间的 GD 有较大的, 也有较小的, 最大为 0.142 9, 最小为 0.017 5, 说

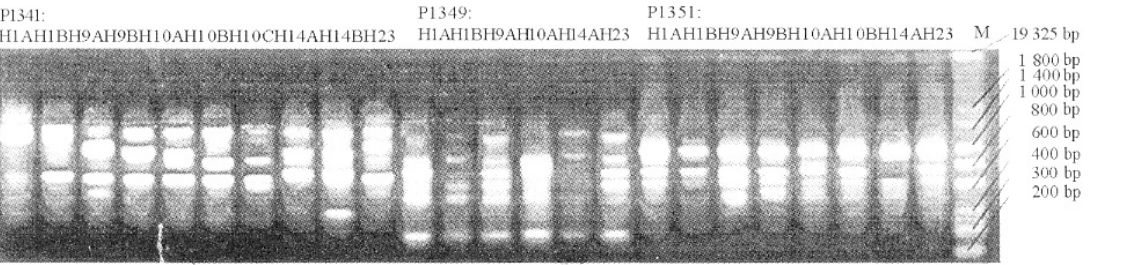
明这 5 个荚果本身存在着较大的遗传差异,其中 H1、H9、H10、H23 的 GD 较小,H14 与其他 4 个荚果的则较大,很有可能不是同一种,在产地就已经混杂。这一结果与笔者在实验室得到的霍山石斛开花株经专家鉴定的结果及野外实地考察结果基本上是吻合的;H14 是霍山石斛的一个亚种。当然这也并不能排除 H14 是由正宗的霍山石斛变异而来,因为只是进行了 3 个引物的 RAPD 分析,其 GD 结果并不一定完全能说明问题,而且究竟要多大的 GD 才能算得上是新种也并没有完全定论,实验说明即使在霍山石斛单荚果内,同样条件下组织培养出来的苗之间也存在一定的 GD,只不过是相当小而已,荚果间的 GD 要大一些,很显然说明在采集荚果之前就存在一定差异。当然不排除实验误差,但单荚果培养条件一致,组织培养导致的变异基本上几率是相

等的,RAPD 实验条件也经过严格重复筛选,即使存在误差的话,误差大小应该说是基本一致的。所以说 H14 与其他荚果 GD 大,至少说明其变异较明显,至于是否为非霍山石斛种,还有待于深入研究。

表 2 3 条引物从 5 个荚果群体(10 个体/群体)中扩增的条带数据

Table 2 Data of amplified bands with three primers from five pod groups of *D. huoshanense* (ten individuals per group)

采集荚果号	每个个体平均条带数	群体总条带数	GS
H1	26.6	266	0.945 455
H9	27.0	270	0.925 926
H10	28.2	282	0.952 941
H14	26.1	261	0.981 132
H23	28.0	270	1.000 000
平均	27.18	271.8	



P1349 中:H9B 与 H9A 同;H10B、H10C 与 H10A 同;H14B 与 H14A 同,在该引物中 H9B、H10B、H10C、H14B 略去;P1351 中:H10C 与 H10A 同;H14B 与 H14A 同,在该引物中 H10C、H14B 略去
H9B,H10B,H10C, H14B were omitted in P1349 because H9B and H9A, H10B, H10C and H10A, H14B and H14A were identical; H10C and H14B were omitted in P1351 because H10C and H10A, H14B and H14A were identical

图 2 P1341、P1349、P1351 3 个引物在 5 个荚果群体内出现的 10 种 RAPD 带型

Fig. 2 Ten RAPD band-types from five pod groups of *D. huoshanense* with three primers of P1341, P1349, and P1351

表 3 5 个荚果群体内出现的 10 种 RAPD 带型的遗传距离分析

Table 3 Genetic distance of ten RAPD band-types from five pod groups of *D. huoshanense*

	H1A	H1B	H9A	H9B	H10A	H10B	H10C	H14A	H14B	H23
H1A	0.111 0	0.054 5	0.035 7	0.090 9	0.069 0	0.052 6	0.087 7	0.127 3	0.142 9	0.025 6
H1B		0.111 0	0.056 6	0.076 9	0.090 9	0.037 0	0.074 0	0.115 4	0.132 0	0.037 0
H9A			0.000 0	0.056 6	0.071 4	0.054 5	0.090 9	0.094 3	0.111 1	0.054 5
H9B				0.000 0	0.054 5	0.074 0	0.074 0	0.076 9	0.132 1	0.074 1
H10A					0.000 0	0.017 5	0.052 6	0.090 9	0.071 4	0.087 7
H10B						0.000 0	0.171 4	0.111 1	0.127 3	0.035 7
H10C							0.000 0	0.111 1	0.127 3	0.035 7
H14A								0.000 0	0.018 9	0.074 1
H14B									0.000 0	0.090 9
H23										0.000 0

4 讨论

虽然对每一个引物而言,其检测的基因 DNA 多态性是有限的,但可用的引物数很多,可检测区域几乎覆盖整个基因组,所以从理论上讲,RAPD 可以对整个基因组 DNA 进行多态性检测。RAPD 技术目前已经十分成熟,运用相当广泛,几乎渗透于整

个基因组研究的各个方面,如进行遗传多样性与种质资源的研究、物种进化与亲缘关系研究、中药真伪、近缘药材及代用品鉴别研究、药材的野生类型与栽培品种的研究、道地药材研究等^[10]。

本研究首次运用 RAPD 技术,探讨了霍山石斛组织培养过程中不同荚果内的遗传稳定性,说明荚果

内存在一定程度的变异,所研究的5个荚果中,H1分为2个RAPD带型,H9为2个,H10为3个,H14只有一株在一个引物中有一条不同的条带,H23则所有带型均相同,5个荚果群体内GS均很高,最小也为92.5926%,说明同一荚果群体在组织培养过程中其变异程度相当小,运用组培方法建立霍山石斛稳定的无性快繁体系是切实可行的,不但能挽救濒临灭绝的霍山石斛,而且能满足市场的大量需求;同时,H1、H9、H10、H23群体间的GD较小,H14与其他4个荚果的则较大,说明H14是距其他4个荚果亲缘关系较远的一个群体,很有可能不是同一种,在产地就已经混杂,当然这一结果还有待于进一步的研究。但至少首次从分子水平证明在霍山产地,霍山石斛种群内存在较大的差异,因此确定霍山石斛种源真伪、保持遗传稳定性,是建立适合市场需求的稳定的霍山石斛快繁体系首要的前提条件。

References:

- [1] Bao S X, Shun Q S, Zhou G Y, et al. A Famous Medicinal Plant Huoshan-shihu (*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng) in China [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2003.
- [2] Ding X Y, Wang Z T, Xu H, et al. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium* species of "FENGDOU" and authentication of *Dendrobium flexicaule* from ITS allied species of *Dendrobium* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(7): 567-573.
- [3] Ding X Y, Xu L S, Wang Z T, et al. Allele-specific diagnostic PCR authentication of *D. devonianum* from other *Dendrobium* species [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(2): 897-901.
- [4] Zhang M, Huang H R, Liao S M, et al. Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(7): 442-446.
- [5] Zhang Y B, Wang J, Wang Z T, et al. DNA microarray for identification of the herb of *Dendrobium* species from Chinese medicinal formulations [J]. *Planta Med*, 2003, 69(12): 1172-1174.
- [6] Zhang J, Zhang D, Yin L K. Genomic DNA extraction and RAPD experiment conditions of *Tamarix Hixpida* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(2): 253-256.
- [7] Xue J P, Miao Y U, Zhang A M. Studies on callus induced from leaves and plantlets regeneration of the traditional Chinese *Chrysanthemum morifolium* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(3): 213-216.
- [8] Lu W D, Wei Q, Tang L. Induction of callus from *Jatropha curcas* and rapid propagation [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, 9(2): 127-130.
- [9] Li L L, Zhu B C, Cheng Y L, et al. Chromosome variation in callus culture of *Pinellia pdisata* [J]. *J Agric Biotech* (农业生物技术学报), 1998, 6(1): 23-27.
- [10] Liu S Q, Zhou G Y, Li X J, et al. Advances in molecular marking of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and its applications in the authentication of traditional Chinese drug (TCD) [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2004, 15(7): 431-434.

不同种质资源及贮藏条件对缬草种子发芽率的影响

黄宝康,郑汉臣*,张巧艳,秦路平

(第二军医大学药学院,上海 200433)

摘要:目的 探讨不同种质资源、贮藏条件及萌发温度对缬草种子发芽率的影响。方法 采用不同条件贮藏的缬草种子进行常规种子发芽试验,计算不同萌发条件下的种子发芽率。结果 不同来源的缬草种子发芽率有较大差异,缬草的种子发芽率要高于其变种宽叶缬草的发芽率,栽培缬草的种子发芽率要远高于野生缬草种子的发芽率。贮存时间、贮存温度、萌发温度等因素对缬草种子发芽率均会产生影响。结论 为保持缬草种子的发芽率,贮藏过程中要保持适当的低温和透气性,要长期保存缬草种子,则必须要以较低的温度保存;种子繁育要在适宜的时间和温度等条件下进行。

关键词:缬草;种质资源;贮藏条件;发芽率

中图分类号:R282.21

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)03-0431-04

Effects of various seed sources and different storage conditions on seed germination rate of *Valeriana officinalis*

HUANG Bao-kang, ZHENG Han-chen, ZHANG Qiao-yan, QIN Lu-ping

(School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of seed sources and storage conditions on the seed germination rate of *Valeriana officinalis*. **Methods** The seeds of *V. officinalis* under different storage condi-

收稿日期:2004-07-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270152)

作者简介:黄宝康(1969—),男,浙江东阳人,第二军医大学药学院副教授,在读博士研究生,主要从事中药资源与品质评价及中药新药的研究与开发工作。E-mail:hbkg999@sohu.com

*通讯作者:Tel(021)25074577 E-mail:hczheng@sohu.com