

- 料), 1993 (3): 26-29.
- [13] Reddy D M, Sakhare R S, Kamble T C. Correlation and path analysis in safflower [J]. *N ew Agric*, 1992, 3(2): 209-212.
- [14] Patil H P. Yield component analysis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *Annals Agric Res*, 1997, 18 (3): 332-336.
- [15] Pandya N K, Gupta S C, Nagda A K. Path analysis of some yield contributing traits in safflower [J]. *Crop Res H isar*, 1996, 11(3): 313-318.
- [16] Patil B R, Deshmukh S G, Deshmukh M P. Studies on correlation and path analysis in safflower [J]. *Annals Plant Physiol*, 1990, 4(1): 86-91.
- [17] Malleshappa C, Goud J V, Patil S S. Path analysis for seed yield in safflower [J]. *J Maharashtra Agric Univ*, 1989, 14 (2): 231-232.
- [18] Mathur J R, Tikka S B S, Shama R K, *et al*. Genetic variability and path coefficient analysis of yield components in safflower [J]. *Indian J Heredity*, 1976, 8: 3-4.
- [19] Kubsad V S, Desai S A, Mallapur C P. Path coefficient analysis in safflower [J]. *J Maharashtra Agric Univ*, 2001, 25(3): 321-322.
- [20] Thombre M V, Joshi B P. Correlation and path analysis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) varieties [J]. *J Maharashtra Agric Univ*, 1981, 6(3): 191-193.
- [21] Patil H S. Genetic variability, association and path analysis in safflower [J]. *Indian J Agric Res*, 1998, 32(1): 46-50.
- [22] Yan Z S, Wang R Q, Feng J F, *et al*. Path-analysis of characters related to yield per plant in mulching safflower [J]. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2004, 26(2): 35-38.
- [23] Lu X P, Li X W, Mi F G, *et al*. The genetic potential and genetic correlation of principal economic characters of safflower [J]. *J Inner Mongolia Inst Agric Anim Husband* (内蒙古农牧学院学报), 1996, 17(3): 67-70.
- [24] Nie Z, Shi X C, Chen P T, *et al*. A study on the hereditability genetic advance and genetic correlation of main agronomic characters in safflower [J]. *Oil Crops China* (中国油料), 1987(2): 18-22.
- [25] Lu X P, Li X L, Zhang Z, *et al*. Multi-genetic analysis of quantitative characters in safflower [J]. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2004, 26(2): 39-42.
- [26] Lu X P, Sun X X, Li X W. Estimation of stability parameters for safflower varieties [J]. *J Inner Mongolia Inst Agric Anim Husband* (内蒙古农牧学院学报), 1996, 17(2): 25-29.
- [27] Tang Q Y, Feng M G. *DPS Data Processing System for Practical Statistics* (实用统计分析及其 DPS 数据处理系统) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [28] Nie Z, Chen F T, Shi X C. Study on the selection indices of yield of flower per plant in safflower [J]. *Hereditas* (遗传), 1992, 14(5): 34-36.
- [29] Fu S Q, Xu X L, Li L Y. Comparison on the chemical constituents of Chuanhonghua-1 with Jianyang Honghua [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(2): 78-79.

霍山石斛及相似种的位点特异性 PCR 鉴别

刘石泉^{2,1}, 李小军², 余庆波², 周根余^{2*}

(1. 湖南城市学院 化学与环境工程系, 湖南 益阳 413000; 2. 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 设计出霍山石斛的位点特异性鉴别引物, 仅通过 PCR 就能对霍山石斛的真伪进行准确鉴别。方法 利用石斛属植物基因库中 rDNA ITS 序列数据库进行同源性比较, 在与霍山石斛差异较大的区段设计 1 对特异性引物, 然后对 19 份石斛属植物 DNA 模板进行 PCR 扩增, 阳性者即为霍山石斛正品。结果 发现在退火温度为 60 时, 该引物能把霍山石斛的模板从 19 份石斛属植物中扩增出来, 而其他的石斛属植物均为阴性。结论 运用位点特异性鉴别引物成功地对霍山石斛进行 PCR 鉴别, 该鉴别反应重现性好, 能在霍山石斛鉴别时发挥重要的作用, 与形态学、DNA 测序等鉴别方法相比, 该方法具有高效、准确、简便、省时等优点。

关键词: 霍山石斛; 位点特异性 PCR; 鉴别

中图分类号: R 282. 21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0111-05

Allele-specific diagnostic PCR authentication of *Dendrobium huoshanense* and its allied species of *Dendrobium Sw*

LIU Shi-quan^{2,1}, LI Xiao-jun², YU Qing-bo², ZHOU Gen-yu²

(1. Department of Chemistry and Environment Engineering, Hunan City University, Yiyang 413000, China;

2. Genetics Laboratory, Department of Biology, College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: **Objective** To design a pair of allele-specific diagnostic primer for authenticating *Dendrobium*

* 收稿日期: 2005-05-10

基金项目: 上海市高等学校科学技术发展基金项目 (03DZ02)

作者简介: 刘石泉 (1969—), 男, 湖南益阳人, 讲师, 研究方向为植物组织培养及分子检测。E-mail: lsq205@tom.com

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

um huoshanense from other species of *Dendrobium* Sw. only by PCR. **Methods** Based on rDNA ITS sequences database of *D. huoshanense* and other species of *Dendrobium* Sw., an allele-specific diagnostic primer pairs was designed. Diagnostic PCRs were performed using the primer with the total DNAs of 19 original plants from *Dendrobium* Sw. as templates. The positive was the genuine. **Results** When the annealing temperature was raised to 60 °C, the template DNA of *D. huoshanense* could be amplified whereas the diagnostic PCR of the rest species were all negative. **Conclusion** The diagnostic PCRs can authenticate *D. huoshanense* from other species of *Dendrobium* Sw. efficiently. Compared to the authentication method by sequencing DNA fragments and morphological traits etc., the allele-specific diagnostic PCR is not only simple with time-saving but also practical and effective.

Key words: *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng; allele-specific diagnostic PCR; authentication

石斛作为传统贵重的中药材,早在《神农本草经》中就有记载,有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等功效^[1]。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,作药用的就有 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。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,均非真正的霍山石斛加工而成^[2],再加上目前尚无快速、准确的霍山石斛鉴别方法,其伪品产量日益增大,市场极度混乱,目前市场上常用的假冒霍山石斛主要有石斛 *D. nobile* Lindl、铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo、细茎石斛 *D. moniliforme* (L.) Sweet、黄花石斛 *D. tosaense* Makino、矮石斛 *D. bellatulum* Rolfe、重唇石斛 *D. hercoglossum* Reichb. f、美花石斛 *D. loddigesii* Rolfe、细叶石斛 *D. hancockii* Rolfe、曲茎石斛 *D. flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sun et L. G. Xu、广东石斛 *D. wilsonii* Rolfe、罗河石斛 *D. lohohense* T. Tang et F. T. Wang、河南石斛 *D. henanense* J. L. Lu et L. X. Gao 等^[2]。笔者已亲自实地考察了霍山县长冲乡种植的霍山石斛,发现已有混杂。本实验试图在传统的形态标记、生化标记、组织细胞标记等这些以基因间接产物作为鉴别依据之外发展一种准确、迅速、简捷的霍山石斛鉴定方法,利用石斛属植物基因库中 rDNA ITS 序列数据库进行同源性比较,在与霍山石斛差异较大的区段设计位点特异性引物,然后对 19 种石斛属植物 DNA 模板进行 PCR 扩增,阳性

者即为霍山石斛正品。仅通过 PCR 就能对霍山石斛的真伪进行准确鉴别,以期能在霍山石斛鉴别时发挥重要的作用。

1 材料与来源

实验所用的材料来自于云南、安徽、浙江、河南、台湾等产区,其中 7 种由上海职工医院生药学教授顺庆生于 2004 年 3 月和 8 月提供,8 种材料 2002 年 12 月亲自采于霍山县长冲乡,其余材料由云南西南大地苗艺有限公司张申洪总经理于 2004 年 4 月采回,共计 19 份(表 1)。1~ 15 由上海职工医院生药学教授顺庆生鉴定;16~ 19 由上海师范大学植物分类学教授胡世福鉴定。所有材料均取新鲜单株叶片分别于 - 70 °C 保存。

引物由生工公司合成,引物顺序为: HSSH-F 5' ATAAATGGGTTTCGTGGGA, HSSH-R 5' CAACGCA TGAA TTGGGATC; P1-5' ACGAATTC-ATGGTCCGGTGAA GTGTTTCG, P2-5' TAGAA-TTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC; Taq 酶购自生工公司。PCR 仪为美国 MJ 公司 PTC-100™。

2 方法

2.1 DNA 的提取: 单株分别提取 DNA, 参见彭锐方法^[3], 略加改进, 沉淀干燥, 加入 30 μL TE 溶解, - 20 °C 保存备用。用分光光度计测得其 DNA 质量浓度为 50 ng/μL。

2.2 位点特异性引物的设计: 在设计鉴别性 PCR 引物前, 对霍山石斛和常见 12 种霍山石斛伪品的 ITS 序列用 Vector II 软件进行对位排列比较, 在与霍山石斛差异较大的区段设计了 1 对位点特异性引物(图 1), 其碱基顺序为: HHS-F 5' ATAAATGGGTTTCGTGGGA 3', HSSH-R 5' CAACGCA TGAA TTGGGATC 3'; PCR 产物理论长度为 432 bp, 包括部分 ITS1 和 ITS2 序列及全部 5.8 S 序列, 设计引物时主要选择 ITS 序列中与其他石斛

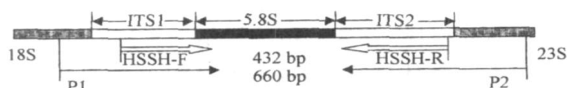
表 1 石斛样品来源

Table 1 Origin of samples from *Dendrobium Sw*

编号	材料名称	采集日期	采集地点
1	H1 霍山石斛 <i>Dendrobium huoshanense</i>	2002-12-11	安徽霍山
2	H9 霍山石斛	2002-12-11	安徽霍山
3	H10 霍山石斛	2002-12-11	安徽霍山
4	H14 霍山石斛	2002-12-11	安徽霍山
5	H13 霍山石斛	2002-12-11	安徽霍山
6	霍山石斛	2004-03-16	安徽霍山
7	T001 铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	2004-03-16	安徽霍山
8	T002 铁皮石斛	2002-12-11	安徽霍山
9	T31 铁皮石斛	2002-12-11	安徽霍山
10	铁皮石斛	2004-03-16	云南思茅
11	河南石斛 <i>D. henanense</i>	2004-03-16	河南南台
12	黄花石斛 <i>D. tosaense</i>	2004-03-16	台湾台南
13	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	2004-08-29	浙江乐沽
14	曲茎石斛 <i>D. flexicaule</i>	2004-08-29	河南西峡
15	齿瓣石斛 <i>D. devonianum</i>	2004-08-29	云南瑞丽
16	石斛 <i>D. nobile</i>	2004-04-28	云南瑞丽
17	鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i>	2004-04-28	云南瑞丽
18	翅萼石斛 <i>D. cariniferum</i>	2004-04-28	云南瑞丽
19	密花石斛 <i>D. densiflorum</i>	2004-04-28	云南瑞丽

1~ 5, 7~ 9: 材料分别来自于不同蒴果的实验室组培苗

1—5, 7—9: tissue culture plantlet in laboratory from different capsules



引物 P1, P2 和 HSSH-R, HSSH-F 分别扩增 ITS 区和霍山石斛的特定区

Primers P1, P2; HSSH-R, HSSH-F are used to amplify whole ITS region and special sequence of *D. huoshanense*

图 1 ITS 区引物结构示意图

Fig 1 Structure of whole ITS region

材料差异较大的区域。

2.3 石斛属植物模板 DNA 鉴定 PCR 的扩增: 根据 Emmanuel 等^[4]对兰科植物 ITS 区的研究, 运用 1 对石斛属植物 ITS 区的扩增引物 P1 (位于 18 S 上)、P2 (位于 26 S 上), PCR 反应在 30 μ L 反应体系中进行, 含 ddH₂O 19.3 μ L, 缓冲液 3 μ L, Mg²⁺ (2.5 mmol/L) 3 μ L, dNTP (100 μ mol/L) 1.2 μ L, 引物 (0.6 μ mol/L) 2.4 μ L, 模板 DNA 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.1 μ L。程序: 94 预变性 3 min, 94 变性 50 s, 54 复性 1 min, 72 延伸 2 min, 循环 30 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。

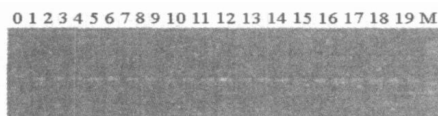
2.4 霍山石斛鉴别性 PCR 的扩增: 将 2.3 中引物 P1 和 P2 换成 HSSH-R 和 HSSH-F, 复性温度提高

到 60 , 其他条件相同。

3 结果

3.1 石斛属植物模板 DNA 鉴定 PCR: 从图 2 看出, 19 个 DNA 模板均能扩增出预期的 660 bp 条带, 该检测证明所有 DNA 模板的质量均没有问题, 可以进行下一步的霍山石斛鉴别性 PCR 反应。

3.2 霍山石斛鉴别性 PCR 的扩增: 当复性温度提高到 60 时 (图 3), 发现只有 1~ 6 号能扩增出 432 bp 条带, 其余模板没有条带, 证明该鉴别反应具有极强的特异性。



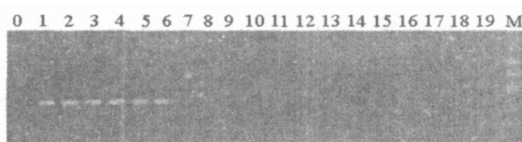
0-空白对照 1~ 19-石斛材料

M Marker (条带位于 800~ 600 bp)

0-negative control 1- 19-corresponding to code numbers in Table 1 M-DNA Marker (band between 600—800 bp)

图 2 用 P1 和 P2 鉴定石斛属模板 DNA

Fig 2 Template authentication of *Dendrobium Sw* with P1 and P2



0-空白对照 1~ 5-组培霍山石斛 6-野生霍山石斛 7~ 19-其他石斛材料 M Marker (特异性条带大小为 432 bp)

0-negative control 1- 5-tissues culture of *D. huoshanense*

6-wild *D. huoshanense* 7- 19-other *Dendrobium* species

M Marker (special band is 432 bp)

图 3 霍山石斛位点特异性 PCR

Fig 3 Allele-specific diagnostic PCR authentication of *D. huoshanense*

4 讨论

近年来, 随机扩增多态性 DNA (RAPD)、任意引物 PCR (AP-PCR)、限制性片段长度多态 (RFLP) 等分子标记技术以及 DNA 序列的直接测定检验 (如植物叶绿体基因组的 rbcL、matK、rplL, 核基因组的 rRNA、ITS 等) 不断应用于中药材的鉴别。由于 RAPD、AP-PCR、RFLP 等方法对模板 DNA 及 PCR 条件的要求较高, 往往导致实验结果不稳定, 从而影响了鉴定的准确性。目前虽然已经对一些中药材进行了 DNA 的序列鉴定, 但大多数药检部门尚不具备 DNA 测序的条件, 因此, 利用 DNA 序列分析方法鉴别药材的实用性受到限制。自 DeSalle 等^[5] 1996 年在 Nature 上发表了利用人

工设计的引物鉴别鱼子酱中鱼卵所属鲑鱼的种类后, 鉴别 PCR 在全世界得到推广和应用。国内学者对石斛药材的分类和鉴定作了大量研究, 对石斛的分类研究在形态解剖、生理性状等方面研究较多, 但利用 DNA 特异性进行分类和鉴定较少, 尽管已经取得一定程度的进展, 如齿瓣石斛^[6], 枫斗类石斛^[7], F 型 H 型石斛, 束花石斛, 曲茎石斛^[8], 铁皮石斛, 黄草石斛^[9]等的 ITS 的 DNA 序列特异性方面取得了较好的效果, 以及利用 DNA 的 ITS 的特异性做成的基因芯片^[10], 在石斛属的鉴别方面也取得了一定程度的进展, 但还只是处在起步阶段, 运用于普通实验室更加困难, 真正应用于市场还有待进一步开发。目前, 霍山石斛仅得到了 ITS 序列, 就其 DNA 分子特异性鉴别还未有人涉及过。

对于石斛属植物来说, 选择哪段 DNA 区域进行测序继而进行鉴别性引物的设计非常重要, 实验和文献检索表明, rDNA ITS 区域较为合适。近年来植物体内归属于核基因组的 rDNA 基因被广泛运用于植物系统发育研究, 与 cpDNA 相比 rDNA 的进化速率较快, 且不存在 cpDNA 的母系单项遗传, 更能反映种间差别和物种进化。ITS 是由被 5.8 S rRNA 分割的 ITS1、ITS2 两个片段组成, 其转录产物在 rRNA 加工过程中被切掉, 它在 rRNA 成熟过程中具有重要作用, ITS 片段进化速率较快, 可以用于研究高等植物广泛存在的杂交和多倍化现象。ITS 是高度重复的串联序列单位, 具位点内或位点间的协同进化。被子植物的 ITS 区长度较为稳定, 总长度约为 600~700 bp, 易于测序。ITS 序列有一定程度的变异。因此 ITS 适用于科以下, 特别是属、组的亲缘关系与分类鉴别研究。运用 ITS 序列大多数进行分子系统学的研究, 很少涉及到石斛属植物的鉴定。文献资料证明石斛属植物的 rDNA ITS 序列长度为 635~638 bp, ITS1 为 228~233 bp, ITS2 为 240~247 bp, 5.8 S 长度为 163 bp, 种间的差异百分率(碱基替换率) ITS1 为 11.79%~31.58%, 平均为 20.47%; ITS2 为 10.29%~25.30%, 平均为 17.67%, 说明石斛属种间 ITS 存在极其显著的差异^[4,9]。rDNA ITS 序列可以用于石斛种间的鉴别, 仅以石斛中 ITS 为例, 利用它进行种群分类、鉴定等就有大量的报道^[6,9]。

因此笔者认为当石斛属植物或药材的形态特征难以鉴别时, rDNA ITS 区间碱基序列特征是可靠的分子鉴别标记。本研究首次运用位点特异性鉴别引物成功地对霍山石斛进行了 PCR 鉴别, 在选择

霍山石斛位点特异性 PCR 引物的设计中, 用 Clustal X 及 MEGA 软件进行对位排列比较, 结合 Vector II 软件, 比较了市场上常见的霍山石斛 12 种伪品的 rDNA ITS 序列, 采用了石斛属种间差异明显又稳定的 ITS1 和 ITS2 区域设计了 1 对特异性鉴别引物, 实验证明只须进行 PCR 实验即可完成对霍山石斛的鉴别。

笔者在对霍山石斛的位点特异性 PCR 鉴别中发现在较低的退火温度下(58℃), 部分非霍山石斛样品也能扩增出相应的 432 bp 条带, 主要是同源性比较高的细茎石斛、河南石斛, 但随着退火温度的升高(60℃甚至 62℃), 只有霍山石斛能扩增出相应条带, 其他石斛均为阴性。重复实验得到相同的实验结果, 说明该鉴别引物已具有较强的特异性, 且鉴别效果稳定。由于特异性扩增出的片段仅为 432 bp, 同时 ITS 区域又为多拷贝重复区域, 因此位点特异性 PCR 鉴别在药材 DNA 降解非常严重的情况下, 实验证明还能达到非常好的鉴别效果, 能有效地将霍山石斛从其他石斛属植物中鉴别出来。该鉴别方法具有成本低、时间短、效率高等特点, 避免了贵重植物用品的损耗。即使从植物标本上直接取样也不会造成标本的整体破坏, 所需模板 DNA 的量较少, 且在有外源 DNA 污染的情况下也不会影响检测结果。

传统中药鉴别一般根据药材形态、组织、粉末特征、理化性质等进行鉴别, 本研究则首次直接根据药材的遗传本质 rDNA ITS 的多态特征, 根据霍山石斛特有的 rDNA 片段设计引物进行 PCR 鉴别, 因而是一种准确、迅速、简捷的霍山石斛鉴别方法。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [2] Bao S X, Shun Q S, Zhou G Y, et al. A Famous Medicinal Plant Houshan Shihu (D. huoshanense) in China (中华仙草之最——霍山石斛) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2003.
- [3] Peng R, Song H Y, Li Q S, et al. Extraction and characterization of total DNA from *Dendrobium* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(12): 1129-1131.
- [4] Douzery E J P, Pridgeon A M, Kores P, et al. Molecular phylogenetics of disease (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequence [J]. *Am J Bot*, 1999, 86: 887-899.
- [5] DeSalle R, Bristein V J. PCR Identification of the black caviar [J]. *Nature*, 1996, 381: 197-198.
- [6] 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.
- [7] 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* Sw. [J]. *Acta Pham Sin* (药学报), 2002, 37(7): 567-573.
- [8] Ding X Y, Xu L S, Xu H, et al Morphological and DNA molecular evidence for authentication of *Dendrobium flexicaule* from ITS allied of *Dendrobium* Sw. [J]. *Acta Pham Sin* (药学报), 2001, 36(11): 868-873.

- [9] Xu H, Li X B, Ding X Y, et al rDNA ITS sequence of *Herb Dendrobii* (HUANGCAO) [J]. *Acta Pham Sin* (药学报), 2001, 36(10): 777-783.
- [10] Zhang Y B, Wang J, Wang Z T, et al DNA Microarray for identification of the herb of dendrobium species from Chinese medicinal fomulations [J]. *Planta Med*, 2003, 69 (12): 1172-1174.

不同薯蓣皂苷元的盾叶薯蓣遗传关系的 RAPD 分析

薛 焱, 秦天才*, 张友德

(华中农业大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 目的 从 DNA 水平分析鉴定不同薯蓣皂苷元盾叶薯蓣的遗传关系。方法 从 40 个 10 bp 随机引物中筛选出 12 个引物, 进行 RAPD 分析, 应用 POPGENE 1.31 软件对扩增结果进行聚类分析。结果 共扩增出 73 条 DNA 片段, 其中多态性片段 64 条, 占 87.67%, 盾叶薯蓣类型间具有明显的多态性差异。结论 DNA 分子多样性差异与薯蓣皂苷元量差异具有相关性, 说明盾叶薯蓣的遗传基础可能对薯蓣皂苷元的形成和积累有显著的影响。

关键词: 盾叶薯蓣; 遗传关系; RAPD

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0115-04

RAPD Analysis of genetic relationship among *Dioscorea zingiberensis* with different diosgenin

XUE Yan, QIN Tian-cai, ZHANG You-de

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: **Objective** To study the genetic relationship among *Dioscorea zingiberensis* with different diosgenin content at DNA level. **Methods** DNA of all types was amplified by 12 random primers from 40 random primers, the polymorphic bands of RAPD were counted. And the results of types were analysed by POPGENE 1.31 (Tool for Population Genetic Analysis 1.31) software. **Results** A total of 73 bands was obtained, 64 of total bands (87.67%) was polymorphic. The results indicated that there were apparent and abundant genetic variations in *D. zingiberensis*. **Conclusion** The formation and accumulation of diosgenin could be affected significantly by the genetic basis of *D. zingiberensis*.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; genetic relationship; RAPD

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 俗称黄姜, 为多年生缠绕草质藤本植物, 隶属于薯蓣科薯蓣属根状茎组, 为我国特有种。该属植物的根状茎中含有丰富的薯蓣皂苷元 (diosgenin), 是重要的甾体激素类药源植物, 盾叶薯蓣由于其含薯蓣皂苷元量高, 为我国主要药源植物, 也是世界上单株薯蓣皂苷元量最高的薯蓣种^[1]。目前盾叶薯蓣各品种薯蓣皂苷元差别很大, 各类型间除生物学特性等差异外, 迄今在遗传背景、亲缘关系及基因组 DNA 上的差异研究报道较少。DNA 分子水平上的

多态性检测技术是进行基因组 DNA 研究的基础。Williams 和 Welsh 1990 年几乎同时建立的随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析技术, 以其高效、快速、简便的特点, 用于药用植物研究, 从方法上更显示独到的优势, 它能够通过不同引物直接给出整个基因组的多态性信息, 避免了生长环境和发育时期不同的影响; 并从 DNA 水平上对分类群比较分析, 确定药用植物种、类型间的亲缘关系, 构建树状聚类图^[2]。本研究利用该技术对不同薯蓣皂苷元量的盾叶薯蓣类型

* 收稿日期: 2005-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30170098)

作者简介: 薛 焱 (1974—), 女, 内蒙古人, 硕士阶段从事资源植物方面的研究, 现为内蒙古大学生命科学院 2005 级博士研究生, 研究方向为植物发育生物学。
Tel: 13704781063 E-mail: xyxy2172@163.com

* 通讯作者 秦天才 Tel: (027) 87281305 E-mail: qtc@mail.hzau.edu.cn