

象的内在原因有待进一步研究。

References:

- [1] Jiang S Y, Zhao R F, Wu X H, et al. A list of peculiar and rare medicinal plants in the limestone area of Guangxi [J]. *Guihaia* (广西植物), 2005, 25(suppl): 107-115.
- [2] Wang X K, Zhao T F. Distribution and bioactivity of alkaloid from *Stephania kwangsiensis* [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 1990, 25(1): 3-5.
- [3] Deng Y C, Xu H H. Alkaloids from the tubers of *Stephania kwangsiensis* [J]. *J Guangxi Norm Univ, Nat Sci* (广西师范大学学报:自然科学版), 2004, 22(4): 73-77.
- [4] Dong C Q, Zhou Y, Yi H, et al. Total alkaloid assay from the tubers of *Stephania kwangsiensis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(9): 915-916.
- [5] Deng Y C, Xu H H. Studies on insecticidal activities and active ingredients of *Stephania kwangsiensis* Lo. [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2005, 38(3): 523-527.
- [6] Luo S H, Hu H, Yang C R, et al. Hairy root culture of *Stephania delavayi* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1997, 19(4): 411-414.
- [7] Ye M, Wang B C, Duan C R. Advances of explant browning in plant tissue culture [J]. *Lett Biotechnol* (生物技术通讯), 2004, 15(4): 426-428.
- [8] Yu D H, Meredith C P J. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip culture of grapevine [J]. *J Am Hort Sci*, 1986, 111(6): 97.
- [9] Xiao G L, Yang Q H, Li F S, et al. Study on the relationship between endogenous hormones and the rooting rate of plantlet of sugarcane in the course of subculture [J]. *J Yunnan Agric Univ* (云南农业大学学报), 2001, 16(4): 271-273.
- [10] Zhan Y G, Diao G P, Wang Q Y, et al. Rapid propagation of *Populus tremula* × *P. tremuloides* by multiplication of axillary buds [J]. *J Northeast Fore Univ* (东北林业大学学报), 2005, 33(2): 7-9.
- [11] Wang A Q, He L F, Pei R M, et al. Study on the vitrification of aloe varieties plantlet in tissue culture [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2002, 18(5): 46-49.
- [12] Yang J L, Gui Y L, Guo Z C. Studies on differentiation potential and chromosome stability of embryogenic callus in subcultures of *Picea meyeri* Rehd. et Wils [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2000, 20(1): 44-47.
- [13] Wu M S, Wang X F. Variation of chromosome number in successive culture of *Eucalyptus camaldolensis* Dehnhardt [J]. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 1998, 3(1): 16.
- [14] Lai Z X, Chen C L, Huang S H, et al. Long-term subculture of embryogenic calli and their genetic variation of the chromosome number in Longan [J]. *J Fujian Agric Univ* (福建农业大学学报), 2001, 30(1): 29-32.
- [15] Liang G Q, Tang Y M. Tissue culture and rapid amplification of strawberry [J]. *J Guangxi Tropic Agric* (广西热带农业), 2004, 6: 8-9.

红花 RAPD 和 AFLP 分子标记技术多态性效率比较

张阵阵¹, 郭美丽^{1*}, 张军东², 张汉明¹

(1. 第二军医大学药学院 生药学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学药学院 药理学教研室, 上海 200433)

摘要:目的 探讨 RAPD 和 AFLP 这两种分子标记技术应用于红花不同品系多态性效率的比较。方法 以河南无刺大红袍和若羌有刺白两个红花品系为材料,应用 100 条 RAPD 引物、64 对 AFLP 引物,对两品系进行多态性筛选,初步确定反映品系间差异的引物。结果 筛选到 RAPD 特异性引物共 5 条,分别为 AA52726、AA52729、AA52739、AA52766、AA52785,在两品系间扩增到稳定的差异片段;筛选到 AFLP 特异性引物共 7 对,分别为 AF26356、AF26372、AF26385、AF26311、AF26396、AF26327、AF26343,在两品系间扩增到稳定的差异片段。结果表明,平均每条 RAPD 引物可以扩增出红花基因组片段数目 4~10 条,多态性选出率为 0.20%;平均每对 AFLP 引物可以扩增出红花基因组片段数目为 50~80 条,多态性选出率为 0.31%。就每条(对)引物平均可以扩增出多态性条带的数目而言,RAPD 引物为 1~2 条,AFLP 引物组合则 4~5 条,AFLP 的检测效率明显高于 RAPD。结论 在红花的分子标记研究中,AFLP 较 RAPD 为更有效的分子标记。

关键词:红花; RAPD; AFLP; 分子标记; 效率比较

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)03-0449-03

Efficiency comparison on polymorphism in *Carthamus tinctorius* with RAPD and AFLP

ZHANG Zhen-zhen¹, GUO Mei-li¹, ZHANG Jun-dong², ZHANG Han-ming¹

(1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; random amplified polymorphic DNA (RAPD); amplified fragment length polymorphism (AFLP); molecular marker; efficiency comparison

收稿日期:2006-06-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271588);国家中医药管理局课题(02-03zp54);上海市基础研究重点项目(043919313)

作者简介:张阵阵(1979-),女,山东人,硕士,研究方向为生药种质资源。E-mail:zz_jane@163.com.

* 通讯作者 郭美丽 E-mail:mlguo@smmu.edu.cn

红花为菊科一年生草本植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥管状花^[1],具有扩张冠状动脉、抗凝、降血压、耐缺氧、抗炎镇痛、防治血栓等多种药理作用^[2],是传统的活血化瘀中药。由于长期的自然选择和人工选择的结果,红花种内产生了明显的分化,形成了丰富的种质资源,从外部形态到有效成分的组成及量上均存在一定差异^[3]。因此,寻找高效率鉴定红花不同种质资源的有效分子标记技术方法具有重要意义。

RAPD^[4]和 AFLP^[5]是目前常用的分子标记。这两种分子标记方法已在遗传群体结构分析、亲缘关系分析以及基因图谱构建等方面得到了应用^[6,7]。本研究探讨了红花 RAPD 和 AFLP 两种分子标记方法的多态性效率,旨在寻找红花的高效分子标记,为进一步进行红花种质资源研究及分子辅助标记育种研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料:红花两品系河南无刺大红袍和若羌有刺白由新疆农业科学院王兆光研究员提供,并经本课题组多年反复纯化。幼嫩叶片采自第二军医大学药学院药圃;琼脂糖(上海 YITO 生物技术有限公司),*Taq* 酶(2.5 U/ μ L)、dNTP(10 mmol/L)、 $MgCl_2$ (25 mmol/L)、10 $\times$ PCR buffer 为上海天为时代科技有限公司产品。限制性内切酶 *Eco*RI、*Mse*I、*T_4* DNA 连接酶均购自 NEB 公司;尿素、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、过硫酸胺、TEMED 购自上海华舜生物公司;硝酸银、剥离硅烷、亲和硅烷购自北京鼎同生物公司;引物、接头由上海生工生物公司合成;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器:PCR 仪(Biometra 公司,德国),ELITE300 型电泳仪、GES 型电泳槽、Dolphin-DOC 凝胶成像系统为美国 Wealtec 公司产品。

2 方法

2.1 模板 DNA 提取:以红花幼嫩叶片为材料,按照 CTAB 微量法^[8]提取 DNA。

2.2 RAPD 分析:RAPD 的反应体系为:*Taq* 酶 0.04 U/ μ L、dNTP 0.30 mmol/L、Primer 0.32 pmol/L、 Mg^{2+} 1.5 mmol/L、模板 1.0 mg/L,10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,DDH₂O 补足 25 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 8 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,37 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环,最后延伸 2 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳观察、记录。

2.3 AFLP 分析

2.3.1 限制性消化与接头连接:酶切反应体系为

DNA(100 ng/ μ L)2.5 μ L,*Mse*I(12 U/ μ L)0.25 μ L,*Eco*RI(10 U/ μ L)0.25 μ L,Buffer 4 μ L,BSA 0.2 μ L,ddH₂O 12.7 μ L,37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h,72 $^{\circ}$ C 10 min;连接体系为酶切完成的 DNA 样品,再加 MA(25 μ mol/L)1.0 μ L,EA(5 μ mol/L)0.5 μ L,ATP(10 mmol/L)0.25 μ L,*T_4* DNA 连接酶(3 U/ μ L)0.15 μ L,Buffer 1.0 μ L,ddH₂O 2.1 μ L,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

2.3.2 预扩增:预扩增反应体系为连接完成的 DNA 样品 1.0 μ L,*M*₀₀(50 ng/ μ L)0.6 μ L,*E*₀₀(50 ng/ μ L)0.6 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 2.0 μ L,*Taq* 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L,dNTP(10 mmol/L)0.4 μ L,ddH₂O 15.2 μ L,混合后加 1 滴石蜡油,进行预扩增;反应条件为:72 $^{\circ}$ C、5 min;95 $^{\circ}$ C、30 s,56 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、2 min,20 个循环;72 $^{\circ}$ C、5 min,4 $^{\circ}$ C 保温,扩增在 PCR 热循环仪上进行,预扩增后,扩增产物在 1.5%琼脂糖检测,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3.3 选择性扩增:选择性扩增反应体系为预扩增混合液 5.0 μ L,*Mse*I 引物(50 ng/ μ L)0.8 μ L,*Eco*RI 引物(50 ng/ μ L)0.4 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 2.0 μ L,*Taq* 酶(2 U/ μ L)0.4 μ L,dNTP(10 mmol/L)0.4 μ L,ddH₂O 11.0 μ L,混合后加 1 滴石蜡油,进行选择性扩增;反应条件为:95 $^{\circ}$ C、2 min;95 $^{\circ}$ C、30 s,65 $^{\circ}$ C、30 s(每个循环降低 0.7 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C、1 min,13 个循环;95 $^{\circ}$ C、30 s,56 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、1 min,24 个循环;72 $^{\circ}$ C、5 min,4 $^{\circ}$ C 保温,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3.4 AFLP 扩增产物的电泳及银染检测:扩增产物 6%的变性 PAGE 凝胶,2 500 V 恒压电泳分离,银染检测。

3 结果与分析

3.1 RAPD 标记结果与分析:选用上海生工生物公司的 100 条随机引物对河南无刺大红袍和若羌有刺白两种红花品系进行 PCR 扩增,每条引物都能扩增出 2~10 条不等的条带,平均每条引物扩增出 5.4 条带。初步筛选 5 条引物(编号为 AA52726、AA52729、AA52739、AA52766、AA52785)在两品系间存在多态性,多态性选出率为 0.2%。RAPD 引物平均可以扩增出多态性条带的数目为 1.4 条。见图 1。

3.2 AFLP 标记结果与分析:选用上海生工生物公司合成的 64 对引物对河南无刺大红袍和若羌有刺白两种红花品系进行 PCR 扩增,每条引物都能扩增出 40~80 条不等的条带,平均每条引物扩增出 57 条带。初步筛选 7 对引物(编号 AF26311、AF26327、

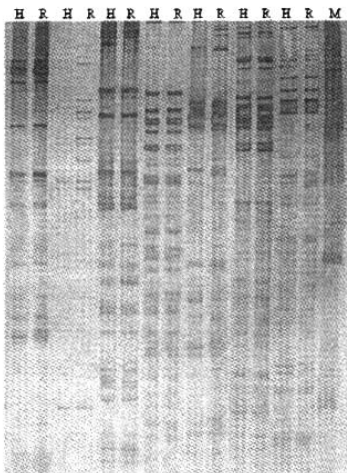
AF26343、AF26356、AF26372、AF26385、AF26396) 在两品系间存在多态性,多态性选出率为 0.31%。AFLP 引物平均可以扩增出多态性条带的数目为 4.8 条。见图 2。



H-河南无刺大红袍 R-若羌有刺白 M-Marker 2 000
H-Henanwuclidahongpao R-Ruoqiangyoucibai M-marker

图 1 河南无刺大红袍和若羌有刺白两种红花品系部分引物的 RAPD 扩增图

Fig. 1 Amplified profile by RAPD primers in Henanwuclidahongpao and Ruoqiangyoucibai, two lines in *C. tinctorius*



H-河南无刺大红袍 R-若羌有刺白 M-Marker 2 000
H-Henanwuclidahongpao R-Ruoqiangyoucibai M-marker

图 2 河南无刺大红袍和若羌有刺白两种红花品系部分引物的 AFLP 扩增图

Fig. 2 Amplified profile by AFLP primers in Henanwuclidahongpao and Ruoqiangyoucibai, two lines in *C. tinctorius*

3.3 两种分子标记方法的比较:对河南无刺大红袍和若羌有刺白品系,两种标记系统都能产生各自有效的多态性条带,但多态性水平和检测效率各不相同。每对 AFLP 的多态性检测效率大于 RAPD。各项指标的比较见表 1。

AFLP 分子标记方法较 RAPD 分子标记方法在红花种质资源研究中为高效分子标记技术。

表 1 RAPD 与 AFLP 分子标记比较

Table 1 Comparison of RAPD and AFLP markers

分子标记	筛选引物 (对)数	多态性 引物数	多态性 总带数	多态性检 测效率	多态性选 出率/%
RAPD	100	5	7	1.4	0.2
AFLP	64	7	34	4.8	0.31

References:

- [1] Yang Y X, Wu W, Zheng Y L. Advances in studies on Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 2004, 22 (4): 365-369.
- [2] Pahlavani M H, Mirlohi A F, Saeidi G. Inheritance of flower color and spininess in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *Hered*, 2004, 95: 265-267.
- [3] Li Y, Zhang G, Guo M L, et al. Determination of hydroxysafflor yellow A in *Flos Carthami* [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2005, 26 (5): 587-588.
- [4] Williams J G K, Kuhelik A R, Livak K J. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18 (6): 6231-6235.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23 (21):4407-4414.
- [6] Bonin A, Pompanon F, Taberlet P. Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers in surveys of vertebrate diversity [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 395: 145-161.
- [7] Rodriguez-Navarro D N, Camacho M, Leidi E O, et al. Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia from diverse geographical origin that nodulate *Pachyrhizus* species, [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2004, 27 (6): 737-745.
- [8] Li X B, Feng B, Zhang Z H, et al. Isolation of total DNA from plant Chinese medicinal materials. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (7): 652-654.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青