

金线莲 RAPD-SCAR 标记的开发和种质遗传多样性评价

王剑锴¹, 李明杰¹, 王建明^{1*}, 韦坤华³, 古力¹, 林文明⁴, 张君毅², 张重义^{1*}

1. 福建农林大学作物科学学院, 福建 福州 350001

2. 华侨大学 园艺系, 福建 厦门 351021

3. 广西壮族自治区药用植物园, 广西 南宁 530023

4. 古农堂生物科技有限公司, 福建 泰宁 354400

摘要: 目的 研究不同种质资源金线莲 *Anoectochilus roxburghii* 的遗传进化关系, 开发高效、实用的分子标记方法。方法 在 20 个不同产地金线莲种质资源的基础上开发 RAPD 标记, 并将其换成特异 SCAR 标记。结果 从 100 条 RAPD 随机引物中筛选出 28 条具有显著多态性的引物, 扩增得到 135 条多态性位点。RAPD 聚类分析显示, 当 20 个金线莲种质资源平均遗传距离为 0.748 时, 可以聚为 6 类, 同一区域起源金线莲基本归为一类, 表明不同区域金线莲种质资源存在着显著遗传差异。在此基础上, 从多态性 RAPD 条带中挑选出 5 个特异位点转换为 SCAR 标记, 并在不同金线莲种质资源中进行验证, 结果显示 5 条 SCAR 标记具有显著的种质资源特异性和扩增模式。结论 所筛选的特异 RAPD-SCAR 标记为加快金线莲优良品种选育进程奠定坚实基础。

关键词: 金线莲; 种质资源; RAPD 标记; SCAR 标记; 多态性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)01-0122-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.019

Development of RAPD-SCAR marker for *Anoectochilus roxburghii* and their utilization to assess genetic diversity of germplasm

WANG Jian-kai¹, LI Ming-jie¹, WANG Jian-ming¹, WEI Kun-hua³, GU Li¹, LIN Wen-ming⁴, ZHANG Jun-yi², ZHANG Zhong-yi¹

1. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350001, China

2. Department of Horticulture, Huaqiao University, Xiamen 351021, China

3. The Medicinal Botanical Garden of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530023, China

4. Gunongtang Biological Technology Co., Ltd., Taining 354400, China

Abstract: Objective To reveal the genetic relationship of germplasms of *Anoectochilus roxburghii* and develop an effective and valuable molecular marker. **Methods** In this study the polymorphic random amplified polymorphic DNA (RAPD) and specific SCAR markers were developed based on 20 different germplasms from various places. **Results** Twenty-eight 100 RAPD primers have significant polymorphism, generated 135 polymorphic bands among 20 germplasms. On the basis of RAPD results, 20 germplasms were clustered into six groups on genetic distance of 0.748. **Conclusion** Clustering analysis shows that there are the significant genetic differences among germplasms derived from different regions. A total of five specific bands from RAPD results are transferred into sequence characterized amplified region (SCAR) markers. Amplified results of SCAR markers among different germplasms show that SCAR markers are significant specific to different germplasms. This study has laid a solid foundation for accelerating the breeding of *A. roxburghii*.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl; genetic resources; RAPD marker; SCAR marker; polymorphism

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl 即 (Orchidaceae) 开唇兰属 *Anoectochilus* Bl. 的一种多年生草本植物。金线莲是我国传统的珍贵药材和室

收稿日期: 2015-09-15

基金项目: 国家中医药管理局 2015 年行业科研专项 (201507002); 福建省“闽江学者”科研专项 (2011)

作者简介: 王剑锴 (1989—), 男, 在读硕士, 研究方向为生药资源研究。Tel: 13489149847 E-mail: fafuwj@163.com

*通信作者 张重义, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源研究。Tel: 18305910999 E-mail: hauzy@163.com

王建明, 男, 硕士, 实验师, 主要从事中药资源研究。Tel: 15005083851 E-mail: wjm1009@126.com

内观叶珍品，以全草入药，其性味平、甘，具有清热凉血、祛风利湿之功效^[1]。随着野生金线莲资源大量采挖，金线莲种质资源正面临着逐渐枯竭的局面。同时，金线莲生产上所用品种多为不同企业或部门的自选、自育和自留品种，不同产区之间存在着严重的“同物异名、同名异物”现象^[2]。因此，摸清我国不同地区金线莲种质资源的“家底”，鉴定其相应的亲缘关系，建立金线莲种质核心资源库和规范金线莲品种选育程序，对于解决目前金线莲资源濒危状态和提高其产量和品质显得尤为必要。随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD) 的原理是设计 10 bp 的随机引物对基因组进行 PCR 扩增，通过分析 PCR 产物多态性来研究基因排布与外在性状表现的一门技术。RAPD 分析可在没有基因组信息条件下进行，所用随机引物不受物种的限制，对 DNA 质量要求不高，操作简便、快捷。此外，由于 RAPD 引物序列较短、退火的温度较低，使 RAPD 还表型出易扩增、扩增位点丰富、多态性强等优点^[3]。然而，RAPD 标记却存在假阳

性高、稳定性和重复性差等缺点，但将 RAPD 所产生的特异性条带转化为 SCAR 标记则可以克服这些缺点，兼具 RAPD 优点^[4]。SCAR 标记目前在牛膝、地黄、五味子、铁皮石斛等药用植物已经被广泛应用，虽然在金线莲中 ISSR、SRAP、RAPD 等标记已被广泛开发利用^[4-6]，但 SCAR 标记目前并未见报道。

本研究在 20 个金线莲种质资源的基础上，开发金线莲多态性 RAPD 标记，并将特异条带转化为相应 SCAR 标记，鉴定其特异性。本研究为揭示金线莲种质资源的亲缘关系和建立金线莲分子标记辅助育种体系提供了重要的基础数据^[7-10]。

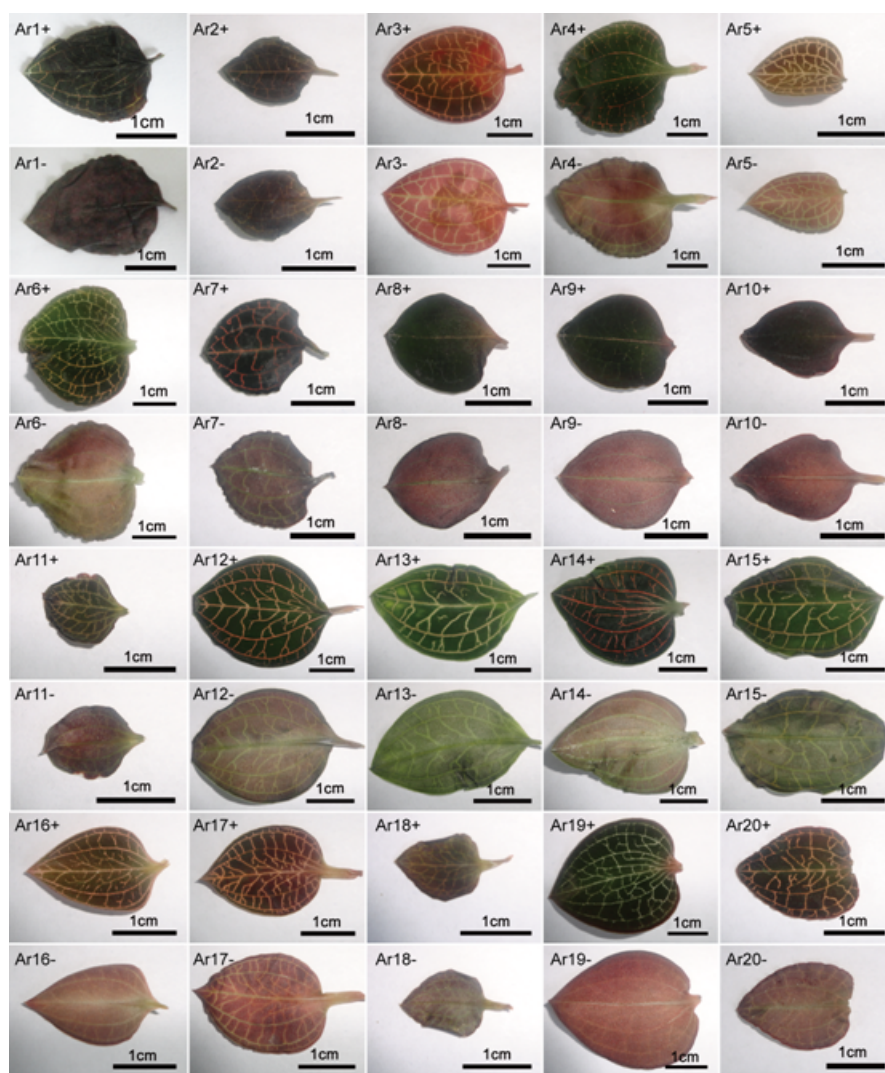
1 材料和方法

1.1 金线莲种质资源的搜集

在全国范围内广泛收集具有显著区域特点的 20 个金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl 种质资源，均由福建农林大学王建明实验师鉴定，种植于福建农林大学中药材 GAP 研究所田间隔离池内（表 1 和图 1），同时，在组培条件下对每个资源进行离体培养和保存。

表 1 不同金线莲种质资源样品
Table 1 Samples of *A. roxburghii* from different germplasm resources

编号	品种	来源	茎节色	叶形	叶脉	叶背
Ar1	福建钝尖叶	福建	浅红	尖	金	浅红
Ar2	福建红叶	福建	红	尖	红	暗红
Ar3	福建红霞	福建	乳白	圆	红	鲜红
Ar4	福建大圆叶	福建	浅红	尖	红	微红
Ar5	福建小叶	福建	白	尖	乳白	浅绿
Ar6	福建大青杆	福建	乳白	圆	红	微红
Ar7	福建小圆叶	福建	乳白	圆	红	微红
Ar8	福建绒叶 A	福建	红	圆	细一线	微红
Ar9	福建绒叶 B	福建	浅红	圆	粗一线	红
Ar10	福建绒叶 C	福建	白	圆	无线	微红
Ar11	福建小叶变种	福建	白	尖	白	浅绿
Ar12	广东大黑叶	广东	白	尖	红	浅绿
Ar13	广东大叶 A	广东	浅红	尖	红	微红
Ar14	广东大叶变种	广东	浅红	尖	金	绿
Ar15	广东大叶 B	广东	浅红	尖	金	绿
Ar16	福建红霞小叶	福建	白	尖	红	鲜红
Ar17	广西尖叶	广西	浅红	尖	金	红
Ar18	云南品种	云南	红	尖	红	微红
Ar19	台湾品种	台湾	浅红	圆	白	暗红
Ar20	福建大红叶	福建	乳白	尖	红	红



“+”代表叶片正面 “-”代表叶片背面
 “+” representative blade front “-” represents the back of the blade

图 1 不同种质资源的金线莲外观差异比较

Fig. 1 Comparison on appearance difference of *A. roxburghii* from different germplasm resources

1.2 金线莲基因组 DNA 的提取

每个种质资源随机取 10 株金线莲植株的嫩叶，于 -80°C 冰箱贮存。将所收集的同一种质资源的所有叶片（10 株不同单株）进行等量混合，经液氮研磨后，采用改良 CTAB 法提取 DNA。同时，每个资源分别随机选取 5 个单株，单独提取 DNA 用于 SCAR 个体验证。1%琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的质量和完整性，微量分光光度计 ND2000 进行定量。

1.3 RAPD 引物多态性筛选

从 OP 系列 10 核苷酸随机引物库中 (<http://www.operon.com/>)，随机筛选 100 条 RAPD 预选引物。利用所搜集的 20 个资源验证 RAPD 引

物多态性。RAPD-PCR 扩增体系为 $20\ \mu\text{L}$ ，包括：1 μL DNA 模板 ($50\ \text{ng}/\mu\text{L}$)、1 μL 随机引物 ($10\ \mu\text{mol}/\text{L}$)、0.3 μL ($1.5\ \text{U}$) Taq 酶、1 μL dNTP、 Mg^{2+} 2.5 μL 、ddH₂O 补足至 $20\ \mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序： 94°C 预变性 6 min； 94°C 变性 50 s， 36°C 退火 30 s， 72°C 延伸 90 s，进行 40 个循环； 72°C 延伸 6 min， 4°C 保存 RAPD 图谱制成 0-1 矩阵，即在相同位置上“有带”记为“1”，“无带”记为“0”，使用 NTSYSp2.1 软件的 UPGMA 方法进行系统地聚类分析。

1.4 特异性片段的回收和测序

从 RAPD 图谱中挑选显著特异性的条带回收，与 pMD-18T 载体连接过夜，转入 Trans-5 α 感受态细胞中，均匀涂布在含有 IPTG、X-gal、AMP 的

LB 平板上, 37 ℃ 恒温培养 14 h。挑选白斑接种至 500 μL 含 AMP 的 LB 液体培养基中, 250 r/min, 37 ℃ 条件下震荡培养 14 h, 挑选单菌落进行 PCR 验证。

1.5 SCAR 引物设计

根据所挑选的 RAPD 特异片段的测序结果, 使用 Primer5 软件设计 SCAR 正、反向引物。设计引物时在原 RAPD 引物序列基础上, 分别向内延伸 10~20 bp, 调节引物延伸长度, 使正、反向引物退火温度 (T_m) 值趋于相同。

1.6 SCAR-PCR 的特异性条带验证

以不同资源金线莲的单株 DNA 为模版进行 SCAR 标记特异性个体验证, 扩增体系为 20 μL, 包括: 1 μL DNA 模板 (50 ng/μL)、0.5 μL 上游引物 (5 μmol/L)、0.5 μL 下游引物 (5 μmol/L)、0.3 μL (1.5 U) Taq 酶、1 μL dNTP、 Mg^{2+} 2.5 μL、ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 6 min; 94 ℃ 变性 50 s, 退火 30 s (根据各引物退火温度上下浮动 5 ℃), 72 ℃ 延伸 90 s, 进行 40 个循环; 72 ℃ 延伸 6 min, 4 ℃ 保存。鉴定单个 SCAR 标记在不

同资源中特异性时, 在每个资源中至少验证 5 个单株, 若 SCAR 标记在每个单株中均能扩增出一致的结果, 说明所设计的 SCAR 标记在该资源中具有相应特异性。统计 SCAR 在所有资源中扩增结果, 获取 SCAR 特异性谱。

2 结果与分析

2.1 RAPD 引物多态性筛选与分析

将所筛选的 100 条 RAPD 随机引物在 20 个金线莲种质资源中进行扩增。结果有 57 条引物可以在不同种质资源中扩增出清晰条带, 其中, 28 条 RAPD 引物具有明显的多态性, 共扩增出 267 条条带, 其中, 具有多态性的条带有 135 条, 占总扩增条数的 50% (表 2 和图 2)。将 28 条多态性引物在不同资源中的扩增谱统计, 并进行聚类分析。结果显示: 当遗传相似系数为 0.748 时, 20 个品种分为 6 大类, 其中 Ar12、Ar13、Ar14 可归为 A 类; Ar19 可归为 B 类, Ar15 可归为 C 类, Ar18 可归为 D 类; Ar3、Ar16、Ar5、Ar17 可归为 E 类; Ar1、Ar6、Ar11、Ar2、Ar4、Ar7、Ar20、Ar8、Ar9、Ar10 可归为 F 类 (图 3)。

表 2 多态性 RAPD 引物
Table 2 RAPD primers with polymorphism

引物	序列	总带数	多态性带数	多态性位点/%
OPB10	CTGCTGGGAC	9	7	78
OPC2	GTGAGGCGTC	11	4	36
OPE19	ACGGCGTATG	11	5	45
OPH19	CTGACCAGCC	8	2	25
OPI14	TGACGGCGGT	7	3	43
OPJ15	TGTAGCAGGG	16	7	44
OPK17	CCCAGCTGTG	10	4	40
OPO20	ACACACGCTG	15	13	87
OPO7	CAGCACTGAC	5	3	60
OPQ5	CCGCGTCTTG	4	1	25
OPR9	TGAGCACGAG	9	3	33
OPS10	ACCGTTCCAG	9	3	33
OPW6	AGGCCCGATG	10	5	50
OPZ6	GTGCCGTTCA	13	10	77
OPAD12	AAGAGGGCGT	6	4	67
OPAG5	CCCACTAGAC	11	10	91
OPAK12	AGTGTAGCCC	12	6	50
OPAS8	GGCTGCCAGT	10	5	50
OPAU13	CCAAGCACAC	10	5	50
OPAV3	TGTAGCCGTG	8	7	88
OPAU20	GTCGAAACCC	10	3	30
OPAW8	CTGTCTGTGG	9	7	78
OPAW19	GGACACAGAG	10	3	30
OPI9	TGGAGAGCAG	7	1	14
OPL13	ACCGCCTGCT	5	1	20
OPAQ19	AGTAGGGCCT	7	2	29
OPAP17	ACGGCACTCC	14	7	50
OPM7	CCGTGACTCA	11	4	36

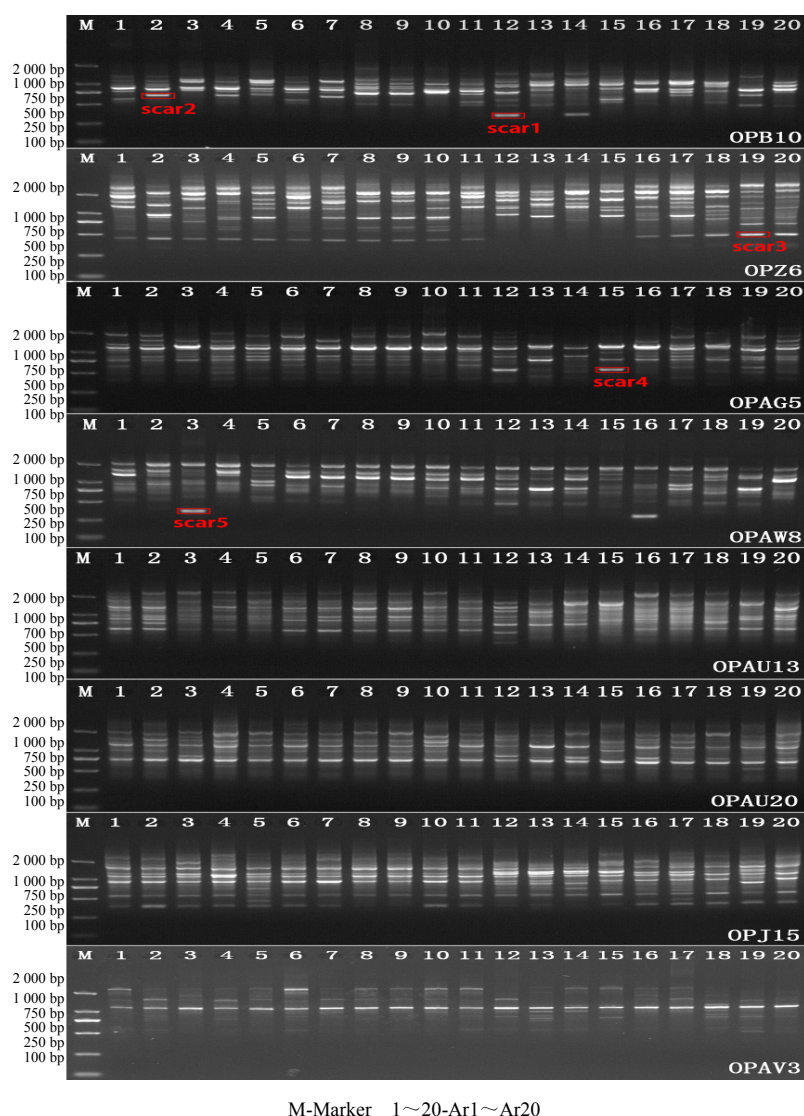


图 2 RAPD 标记在不同种质资源中的扩增结果

Fig. 2 Amplification of RAPD marker among different germplasm resources

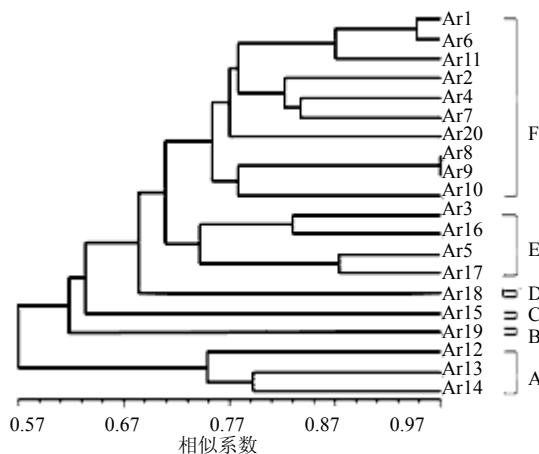


图 3 RAPD 基础上不同金线莲种质资源亲缘关系聚类图

Fig. 3 Genetic cluster of *A. roxburghii* from different germplasm using RAPD markers

2.2 RAPD 特异性片段的回收、克隆

根据不同 RAPD 引物在不同资源中的扩增信息,在 RAPD 图谱中筛选到的 5 条特异性条带作为转化 SCAR 备选序列。进一步将 5 个条带进行切胶、回收,转化后,获取 5 条特异条带序列信息,初步转化为 SCAR 标记。其中,SCAR1、SCAR2 转化自随机引物 OPB10 的多态性条带,测序长度分别为 377 bp 和 837 bp; SCAR3 则来自于 OPZ6 的多态性条带,测序长度为 443 bp, SCAR4 转化自 OPAG5,长度为 541 bp; SCAR5 转化自 OPAW8,长度为 345 bp (图 2) 用 BlastN 和 BlastX 工具对 5 条序列进行同源搜索,结果均未发现同源序列。5 条特异性序列的测序结果见图 4 (划线部分为 OP 随机引物序列)。

SCAR1:

5'-**CTGCTGGGAC**ACTCTAGTTGACCATTGAGGGAATCGACGAAGTCAGAAAGAACAACAACTCTTTCAATAAC
CAGATATATAAACCTTCGTATATGAAGCTGGAGACACCCTGACCATCCACTACGAGAAGTCCCTTAATATTATCAAT
GACTTAAGGATCTATGGTCGGAGCTTCACAAATGATGAAATAAACTACAAGTTCATGCGATCACTTCCGGCTGAATG
GGATCCGTACACAGTGGCTATCAAGAAAATCGAAAAGCTTGAAGACCATATCTCTAAGCGCTCTTTTGGAAAGCTT
CTCTCCTAAGAACTGACAATGGATCAAACGAAGAAGCAGCCCAAGAAAGCTATTTGGCTATG**GTCCCAGCAG**-3'

SCAR2:

5'-**CTGCTGGGACT**TGGACAGATTCAAGTCAGTCAATAAAAGCAAGATAAACGGCATTCTTCTGCATTAACCTTTTGCTT
GTGCAATATTCTACTGCTGTGTAGGTTATATAATATTTTGGTAGACGCAATATTTATTTTTTGTGCTTTTAATTTATT
ATTTATCCATAATTCTAAGACATCAAGTTTTCTTTTATAGATTTCATGAGAAACATACACCACAAAAATTGGAGGGTGT
GTCTTAAATTGGAGGGTGTGTCTGATGTTTTGAAAAATTTCTTAATATGTCAATCGGACCACGGTATTGATGGAGA
TAAATTTGTCTTATTCTGAAATCCTATAATTTTGAATAGTGACATAAAATTGAAATCTAAGACTTTTACATGTAAATA
CATAGAAAATGTCTAACAATAAAATTGGAGGACCGGCCCGCTGCTACCATTTGCTTCTTTTAAACAATTTTG
CTTATATCAGCAACGATCAATAATTGTTGTTTGGTGGAAAACAAGTGTTCATTAAACCGGGTTCGGATCAT
CAGGCTAGACATCCGATGGGTCCAACCGGATCGGAACACTGTTCCGGAATGGTGGAAAGTGCTAAAAATGAAAA
TCAATTGAGCATAAAATATAAAATTGATATAATAGCAATATATCTAATTATACTAAGAAAATCCTCTTTTGGAGATGTC
AGAGATCAATAGAGGATCCAGACCGTTCAAATAATTGAAAAATTTAAACCATTTGACGCTAAGTTCCTTTAAC
GCGGATACAAAAAACCGTCTCAATTCTACGCCTTCAAACCGCGCTCTCC**GTCCCAGCAG**-3'

SCAR3:

5'-**GTGCCGTTCA**AATGCTTGGTGGGAATCAGGCTGGAAGTAACAAAGAGCAGCCACACCTTAGCCTCGCGACTTA
AGCAGGTAGACTTAATCAGATTTTATTCGATTCCGCATACTCCAACCTCACCACCCCTTGTGATTCCATTGACTAATT
CTTCCACAGGCAACCAATCTTGATATTTGCATAATTATCTACCTCAAAATCCTCCAACCTCCAGATATTCATTGATTGC
TTTTGCGGTATACTGGACCTCTACCCCTCGGATGCACGCTTTGCCGTCCTCTAAAAATTTGGCATTGTCATAGAATTC
GTACACCAGGGTTCGGTATACACTCCGTCCTAGGGTGGCATAAGACCTTCAGTTTCAGTGCCTCAATCCGGGCAATAT
ACTCTCTCATCCACTTCTTCTTATCAATGTGAACCCCTCTCTCATAGAT**TGAACGGCAC**-3'

SCAR4:

5'-**CCCAGTAGAC**ATGATTAGCAAGACCTCTTATGTAGTGTAATAAGAGTGCATTTCTCATTGTAAGACATCTTGCG
ATCTGAGAGAAGAAACCTTGCTTCCAGTCTGCGACCTATGCGACCAGAAGTTCCTCTTTTGAACAATTGATCCCTT
CCTGTTTTTATCGTCTTTTTTCTTATCAACATCAGTTCGGTAATATAAGTTGAAGTTCGTTTGTCTCTATTTTCTGACGT
TCTTCGGTAGATTTCTCGGCTACTCATTAGCTGGCTAACCTGAGTAATAGGTCCAATTTGCTCGAATATATTTGGAT
CCAACAGTTTATGTTTCAAATAAAATTTAAACAATTGATTCTGTATATTTCAAATAATCTTGACCATCAATTAGACGCA
AATTACTTATAACCACATAGAATTAGTATCCATCTCCCTACATCTCTCATGCATGTAACATTTACTTTATATAGTTT
GATAAAAAATCCCAACCATCACATCTAAACCATTAATAATATATTGAAATTTCTTTTT**CGTCTAGTGGG**-3'

SCAR5:

5'-**CTGTCTGTGG**CCCATCTCATGCTAACGGACAAATTAAGTACCAACCATACTATCCTAAAGGGATTCAAAT
GCGCATTCATAAGTCTGGTATGCAATGGGTGATGAAGTACCAACGTCCTTTGGGCTTATCACACCACTGAAAGG
ACCCCTACAGGTGAGACACCCTTCAACTTATGTTACAGCTCTGAAGCAGTCATCTCGGTTGACATCAGGATCCTCA
GCACTCGCGTACAAAACCTTCAGCCCATGAGAGAATGAAGAACAACAGCGGGGAACCTTGACCTCATTCTGAAC
TGAGAGCCCTTACAGTCTCAGCGAGTTGCGGCCT**ACCACAGACAG**-3'

图 4 特异性序列

Fig. 4 Specific sequences

2.3 SCAR 标记在种质资源中的特异性验证

在 5 条 RAPD 序列基础上, 设计特异的 SCAR 标记引物, 并进行特异性验证 (表 3)。PCR 扩增结果表明, 5 对引物均能在相应的种质资源中扩增出单一的条带。其中, SCAR1 仅在 Ar12、Ar14、Ar17 中扩增出条带; SCAR2 仅在 Ar2、Ar4、Ar7、Ar13 中扩增出条带; SCAR3 仅在 Ar13、Ar14、Ar15、Ar18 中条带缺失, 其他种质资源均能扩增出条带; SCAR4 仅在 Ar11、Ar15 中扩增出条带; SCAR5 仅在 Ar2、Ar10、Ar15、Ar19 中条带缺失 (图 5)。此外, 5 对 SCAR 引物在同资源不同单株间的扩增结

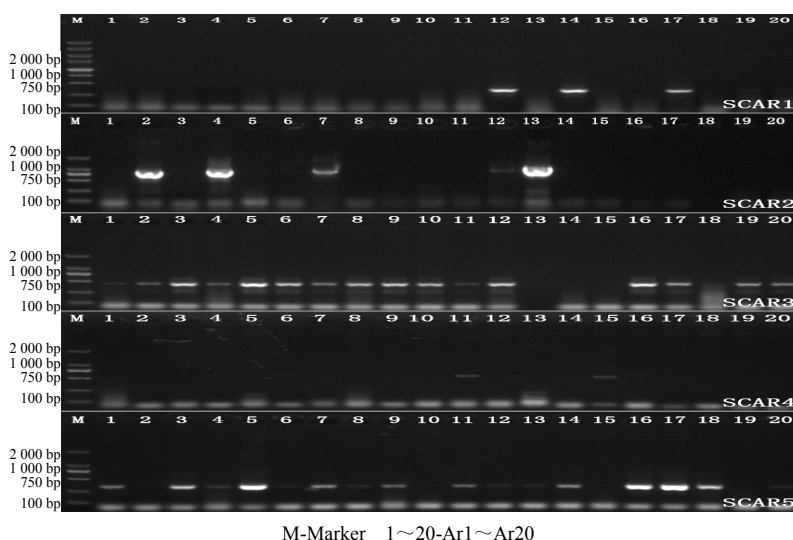
果完全相同, 表明本研究所筛选的标记具有明显的资源特异性, 而非单株间误差, 说明 RAPD 标记成功转化成 SCAR 标记 (图 6)。

3 讨论

分子标记辅助育种体系已经在不同粮食作物中被广泛运用, 在粮食增产、品质改善和育种效率的提高及遗传性状的改良等方面具有重要意义。相对于常规粮食而言, 大多数药用植物仍然采用常规育种, 仅凭外观性状和经验进行自选自育, 导致育种效率低、品种退化快及杂种优势不明显。因此, 在药用植物育种中, 开发高效分子标记体系, 从根源

表 3 SCAR 引物序列
Table 3 Sequences of SCAR primers

引物	序列 (5'-3')	$T_m/^\circ\text{C}$	(G+C)/%
SCAR1-1	CTGCTGGGACACTCTAGTTGAC	59.3	54.5
SCAR1-2	CTGCTGGGACCATAGCCAAA	58.8	55.0
SCAR2-1	CTGCTGGGACTGGACAGATTTCAGTCAGTCA	69.6	53.3
SCAR2-2	CTGCTGGGACGGAGGAGCGC	69.6	75.0
SCAR3-1	GTGCCGTTTCATCTATGAGAGAGGG	61.5	54.2
SCAR3-2	GTGCCGTTCAAATGCTTGGTG	60.6	52.4
SCAR4-1	CCCACTAGACATGATTAGCAAGACG	61.4	54.2
SCAR4-2	CCCACTAGACGAAAAAGGAAAATT	60.6	52.4
SCAR5-1	CTGTCTGTGGCCCATCTCATGCTA	61.4	48.0
SCAR5-2	CTGTCTGTGGTAGGCCGCAA	61.4	37.5



M-Marker 1~20-Ar1~Ar20

图 5 SCAR 标记在不同种质资源中的扩增结果

Fig. 5 Amplification of SCAR marker among different germplasm resources

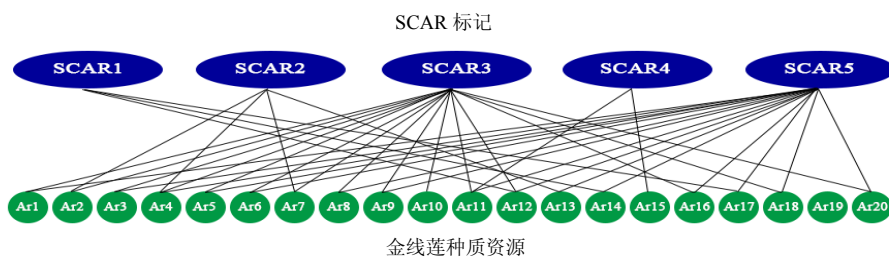


图 6 SCAR 标记在不同种质资源金线莲中的特异性分析

Fig. 6 Specific analysis of SCAR marker among different germplasm resources

上鉴定不同种质资源间的亲缘关系，选配出较高配合力的杂种优势群，对于药用植物的品种选育而言具有重要意义^[11]。金线莲和大多数药用植物一样，种质资源亲缘关系模糊、缺乏正规的育种体系。在金线莲的生产实践中，一些常见的分子标记已经被广泛的开发和利用，比如顾慧芳等^[9]用 RAPD 标记

方法比较组培和野生金线莲，证明金线莲组培苗可以代替野生品种。张铁等^[12]采用 RAPD 技术对 4 个金线莲品种进行区分，用 16 条引物扩增出 108 个条带，其中有 95 个多态性条带，证明 RAPD 方法可以区分干燥的金线莲药材。胡珊梅等^[2]运用 RAPD 方法，发现 RAPD 技术不仅能鉴别种间差异，而且

能揭示同种不同产地植物的遗传变异。将 RAPD 标记转换为 SCAR 标记,将原有 RAPD 复杂的标记统计模式转换为较少条带,能够显著提高其稳定性、特异性和准确性。因此,RAPD-SCAR 标记体系在药用植物中开发和利用,已成为一种趋势^[4]。

本研究从 100 条 RAPD 随机引物中筛选出特异性强、重复性高、条带清晰的 28 条引物,对 20 个不同资源的金线莲进行 RAPD 实验,共获取 267 个条带,其中有 135 条特异性条带。RAPD 聚类分析显示当遗传系数为 0.748 时,将 20 个品种共分为 6 类。从聚类结果来看,来自同一地区的种质资源基本可以聚为一类,如 A 类均为广东地区的种质资源, B 类为台湾地区的种质资源, D 类为云南地区的种质资源, F 类均为福建地区的种质资源。而归为 C 类的 Ar15 与其他广东种质资源差异较大,独立归为一类。与其他亲缘分类, E 类则有广西来源的资源 Ar17 与部分福建资源 Ar3、Ar16、Ar5,初步推测广西尖叶可能是由福建地区引种而来。此外,结合表型和亲缘关系聚类结果可以看出即使在同一分类中,表型存在着明显差异,这可能是由于地域隔离,气候差异导致其在基因上的表现变异。

为了筛选出金线莲资源鉴定所需的特异 SCAR 标记,本研究从多态性 RAPD 标记中获取 5 条特异位点的片段信息。对所获取的特异性片段序列进行注释发现 5 条序列均未找到同源序列,这可能一方面与金线莲在公共数据库中遗传信息极少有关,另外一方面这些序列可能处于基因间隔区、内含子区域或其他非编码区域^[13]。将所获取的 SCAR 标记对不同金线莲进行鉴定,显示 5 条 SCAR 标记对某一类种质资源具有明显特异性。比如, SCAR1 能有效鉴定出 Ar12、Ar14、Ar17; SCAR2 能有效鉴定出 Ar2、Ar4、Ar7、Ar13; SCAR3 能有效区分出 Ar13、Ar14、Ar15、Ar19; SCAR4 能有效区分出 Ar11、Ar15; SCAR5 能有效区分 Ar2、Ar10、Ar15、Ar19。从鉴定结果可以看出对 5 条 SCAR 标记进行组合,可以更准确地鉴定某个种质资源,如 SCAR1、SCAR3、SCAR5 均能在 Ar12 中扩增出条带。因此,

这 3 个 SCAR 标记在 Ar12 重复扩增能够减少单一标记鉴定的假阳性结果,更精确地鉴定相应种质资源。同时,对不同标记的有效组合则更广泛地鉴定不同金线莲资源。比如 SCAR1 标记能够鉴定 Ar12、Ar14、Ar17,但不能鉴定 Ar15;但 Ar15 则能被 SCAR4 特异鉴定。因此, SCAR1 和 SCAR4 组合则大大提高 SCAR 标记鉴定群体。本研究所开发的 SCAR 标记为特异地鉴定某一类或某一种金线莲资源提供了快速、高效、准确的分子检测手段。

参考文献

- [1] 孔祥海. “药王”金线莲的自然资源初步研究 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 155-157.
- [2] 胡珊梅, 张启国, 周涵韬. RAPD 法在金线莲的鉴别研究中的应用 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 949-950.
- [3] 汪小全, 邹喻苹, 张大明. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题 [J]. 植物学报, 1996, 11(12): 954-962.
- [4] 杨春勇, 李戈, 王艳芳, 等. 福建金线莲 DALP 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2824-2828.
- [5] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 96-100.
- [6] 周鹏. 地黄 RAPD-SCAR 标记及其生物信息学分析 [D]. 郑州: 河南师范大学, 2012.
- [7] 张福生, 郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 137-142.
- [8] 吴佳溶. 不同地理种源金线莲有效成分含量测定及 SRAP 标记 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [9] 顾慧芬, 庄意丽, 梅其春. 野生与组培金线莲有效成分的比较及 RAPD 分析 [J]. 中成药, 2011, 33(8): 1364-1367.
- [10] 邹继军, 杨庆凯, 陈受宜. 大豆灰斑病抗病基因 RAPD 标记的分子特征及抗、感种质的 SCAR 标记鉴定 [J]. 科学通报, 1999, 44(23): 2544-2550.
- [11] 邓启云, 袁隆平, 梁凤山. 野生稻高产基因及其分子标记辅助育种研究 [J]. 杂交水稻, 2004, 19(1): 6-10.
- [12] 张铁, 李洪超, 刘伟. 文山野生金线莲的 RAPD 鉴别 [J]. 中药材, 2009, 32(3): 347-348.
- [13] 包雷. 基因芯片数据分析与药效基因组的生物信息学研究 [D]. 北京: 清华大学, 2002.