

金银花五个品系的 RAPD 分析及 DNA 指纹图谱的建立

杨飞¹, 张敏², 彭兴扬², 魏建军², 李立家^{1*}

(1. 武汉大学生命科学学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072;

2. 湖北省十堰市农业局金银花研究开发中心, 湖北十堰 442000)

摘要: 运用 RAPD 技术, 对 5 个金银花品系进行遗传多样性研究并构建这 5 个金银花品系的 DNA 指纹图谱。从 80 个引物中筛选出 25 个带纹清晰, 多态性好的引物用于实验。其中, 引物 SBSD06 的扩增条带可以清楚明确区分 5 个品系, 建立其 DNA 指纹图谱。在清晰、稳定出现的 170 条带中, 153 条带具有多态性。按 UPGMA 法进行聚类分析, 计算其遗传相似系数, 结果显示, 金银花 5 个品系聚为两类, 与其形态学分类结果相符。

关键词: 金银花; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: Q949.95

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)03-0235-04

RAPD Analysis and Construction of DNA Fingerprints in Five *Flos lonicerae* Lines

YANG Fei¹, ZHANG Min², PENG Xing-Yang², WEI Jian-Jun², LI Li-Jia^{1*}

(1. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Woodbine Research Institute of Shiyan Agricultural Bureau, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: RAPD technique has been used to construct DNA fingerprints and analyze genetic diversity in *Flos lonicerae*. From eighty primers, twenty-five primers were selected which can amplify clear and reproducible polymorphic bands. The PCR results showed that a total of 170 bands were amplified, of which 153 bands were polymorphic. Interestingly, primer SBSD06 generated distinct fingerprinting patterns that could distinguish each of the five lines. Genetic similarity correlation and the cluster analysis indicated the abundant genetic diversity in five *F. lonicerae* lines. A dendrogram was constructed based on genetic distances using UPGMA method. The dendrogram reflected that five *F. lonicerae* lines clustered into two groups, and this was in accordance with the result of morphologic taxa.

Key words: *Flos lonicerae*; Molecular marker; Genetic diversity

金银花(*Flos lonicerae*), 又名忍冬花、鹭鸶花、双花等, 是忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属(*Lonicera* Linn.)植物忍冬(*L. japonica* Thunb.)、菰(红)腺忍冬(*L. hypoglauca* Miq.)、华南忍冬(*L. confusa* DC.)或水忍冬(*L. dasystyla* Rehd.)的干燥花蕾或带初开的花^[1,2]。作为常见的中药材, 金银花具有清热解毒之功效^[1]。目前, 在国内中药材市场上作为金银花流通使用的品种复杂。各地又在长期生产中形成了许多不同的金银花品系。周凤琴等调查发现山东地道产区有 16 个金银花品系^[3]。各不同金银花品系在产量、质量及有效成分上有一定差异。金银花的人工育种工作正在逐步进行, 而对人工选育的金银花优良品系的分子遗传学鉴定尚未广泛开展。近年来, RAPD 技术广泛应用于中药材的研究中^[4], 目前已对薯蓣^[5]、山茱萸^[6]、甘草^[7]等药材开展了

遗传多样性、品系鉴定等研究工作。于燕莉等率先应用 RAPD 技术鉴定金银花的 2 个品种^[8], 但未进行遗传多样性研究。李萍等运用分子克隆及生物信息学的方法, 研究了 8 个不同产地的金银花品种 5S rDNA 间隔区序列(ITS)的变化, 从而反映不同产地的金银花基因序列上的多样性^[9]。盛红梅等应用 RAPD 研究忍冬属 23 种植物的遗传多样性及其种间关系, 但并未涉及到作为金银花使用的 4 种药用忍冬科植物^[10]。应用 RAPD 技术研究忍冬科多种药用植物遗传多样性的工作未见报道。本研究以忍冬科忍冬的 2 个金银花品系和忍冬科菰腺忍冬的 3 个金银花品系为材料, 运用 RAPD 技术分析金银花 5 个品系种内、种间的遗传多样性, 建立其特异的 DNA 指纹图谱, 从而为金银花的品系鉴定、遗传育种、繁育栽培和 GAP 种植提供理论依据和方法措施。

收稿日期: 2007-01-30, 修回日期: 2007-05-09。

作者简介: 杨飞(1980-), 女, 博士研究生, 研究方向为植物分子细胞生物学。

* 通讯作者(Author for correspondence). E-mail: ljli@whu.edu.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用的金银花(*Flos lonicerae*)5个品系采自湖北省十堰市金银花研究开发中心农场,均为湖北省十堰市金银花研究开发中心选育的优选系,其编号为LH1、LH2、LJ1、LJ2、LJ3。其中LH1、LH2为菰腺忍冬,LJ1、LJ2、LJ3为忍冬。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采集金银花的嫩叶,采用CTAB大量法提取植物总DNA。电泳检测后,采用分光光度法测量其浓度^[11]。

1.2.2 PCR 扩增及引物筛选 RAPD随机引物选用赛百威公司生产的SBSA、SBSB、SBSC、SBSD四组10个碱基的随机引物,每组20个,共计80个引物。*Taq*聚合酶(含MgCl₂和10×PCR buffer)、dNTPs购自华美生物工程公司,96孔PCR扩增仪为PTC-100(MJ Research, INC.)。

RAPD反应体系: 25 μL的反应总体积中含有10×PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 30 ng/μL随机引物1.0 μL, 1 U/μL *Taq* DNA聚合酶1.0 μL, 20 ng/μL模板DNA 1.0 μL, ddH₂O 16 μL。

RAPD扩增程序: 94℃预变性2 min,然后进入40个循环(94℃变性1 min、35℃退火1 min、72℃延伸2 min),再于72℃延伸10 min。之后,用含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶电泳分离扩增后的PCR产物,电泳后照相。筛选出重复性好、多态性高的引物,记录其条带。

1.2.3 数据处理 参照Williams等^[12]的方法,记录DNA条带并处理数据。清晰可读的条带用作进一步分析,用数字“1”、“0”表示扩增片段的有无。用NTSYS-pc统计分析软件系统^[13]计算材料间的Nei氏遗传距离,按UPGMA法进行聚类分析。

2 结果

2.1 RAPD-PCR 扩增结果

本试验对供试的5份材料进行PCR扩增,从80个随机引物中筛选出带纹清晰稳定并呈现多态性的引物25个,并对这25个引物的扩增结果进行统计分析(表1)。25个引物共扩增出170条带,不同引物的扩增DNA片段数1~11条不等,分子量范围为:100~3000 bp,平均每对引物可扩增出6.8条带,其中引物SBSD06的扩增结果见图1。170条

DNA扩增带中,153条带具有多态性,总的多态条带比率(PBP)为90%,这表明试验的5个金银花品系之间RAPD条带多态性高,遗传多样性丰富。

表 1 引物及其序列和扩增结果
Table 1 List of primers, their sequences and amplification results

引物号 Primer number	序列(5'-3') Sequence	总扩增带数 Total bands	多态性扩增带数 Scorable polymorphic bands
SBSA02	TGCCGAGCTG	9	9
SBSA11	CAATGCCGT	6	5
SBSB17	ACGGAACGAG	8	8
SBSB18	CCACAGCACT	8	7
SBSB19	ACCCCCGAAG	4	4
SBSB20	GGACCCTTAC	4	3
SBSC08	TGGACCGGTG	10	9
SBSD01	ACCGGAAAGG	5	5
SBSD02	GGACCCAACC	5	4
SBSD03	GTCGCCGTCA	10	9
SBSD04	TCTGGTGAGG	8	7
SBSD05	TGAGGGGACA	6	3
SBSD06	ACCTGAACGG	6	5
SBSD07	TTGCCACGGG	6	6
SBSD08	GTGTGCCCA	5	4
SBSD10	GGTCTACACC	9	7
SBSD11	AGCGCCATTG	8	7
SBSD12	CACCGTATCC	7	7
SBSD13	GGGCTGACGA	8	8
SBSD14	CTTCCCAAG	9	9
SBSD15	CATCCGTGCT	6	6
SBSD16	AGGGCGTAAG	8	8
SBSD18	CAGACCAAC	7	6
SBSD19	CTGGGGACTT	1	1
SBSD20	ACCCGGTCAC	7	6
总计 Total		25	170
			153

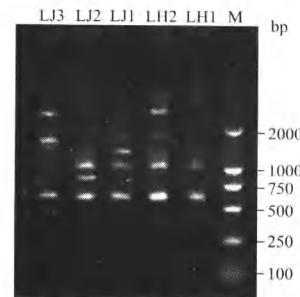


图 1 SBSD06 的 RAPD 扩增图谱
Fig. 1 Fingerprints amplified by SBSD06 [M: DL 2000(TAKARA)]

2.2 聚类分析结果

根据RAPD数据计算相似系数,按UPGMA法进行聚类分析,建立聚类分支树状图(图2)。由图2可知,供试材料可分为两类,LH1、LH2聚为一类,LJ1和LJ2聚在一起,再与LJ3聚为一类。LH1、LH2

间相似系数为 0.69, LJ1、LJ2 间相似系数为 0.66。将 LH1 和 LH2 作为外类群, 则 LJ1、LJ2、LJ3 组成的内类群中, LJ2 与 LJ3 的相似系数最小为 0.5260, 两者间遗传距离最大, 相似度最小, 亲缘关系远。

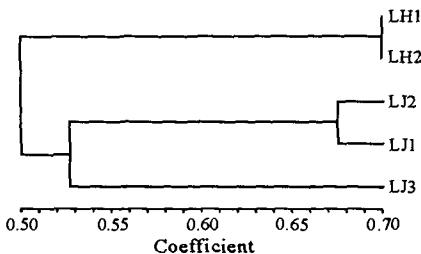


图 2 相似性聚类图
Fig. 2 Dendrogram of similarity analysis

同时运用 NTSYS-pc 计算材料间的遗传距离, 结果见表 2。由表中数据可知, LH1 和 LH2 的遗传距离最小, 为 0.3063; LJ1 和 LJ2 的遗传距离次之, 为 0.3781; LJ3 和 LJ2 的遗传距离最大, 为 0.6471。这与聚类分析结果相符, LJ2 与 LJ3 亲缘关系最远, LH1 和 LH2 的亲缘关系最近。

表 2 遗传距离
Table 2 Genetic distance

Population	LH1	LH2	LJ1	LJ2	LJ3
LH1					
LH2	0.3063				
LJ1	0.6621	0.6523			
LJ2	0.4218	0.5243	0.3781		
LJ3	0.7616	0.6050	0.6152	0.6471	

2.3 DNA 指纹图谱的建立

本实验从 80 个引物中筛选出 25 个具有多态性的引物, 每个引物均能扩增出稳定清晰的条带。如图 1 所示, 引物 SBSD06 在每种供试材料中均扩增出特异带纹, 可以将 5 种供试材料清楚区分开, 从而建立了 5 种金银花品系的 DNA 指纹图谱, 为金银花品系的鉴定提供分子生物学证据。

3 讨论

RAPD 分子标记广泛应用于作物品种或种子纯度的鉴定, 具有简便快速等优点, 但也存在特异性条带的扩增稳定性差、实验重复性低等问题^[3]。为了保证实验的准确性和可重复性, 本实验严格控制反应条件的一致性, 每个引物多次重复, 统计稳定出现、重复性高的条带并进行遗传分析, 放弃重复性低的模糊条带。在此基础上所获得的实验数据是可靠的, 实验结果能真实反映各品系的遗传特征。

于燕莉^[8,14-16]、石俊英^[17]等运用 RAPD 对金银

花的品系鉴定做了大量的工作, 但仅涉及忍冬中的 2 个品系大毛花金银花和鸡爪花金银花, 无法比较不同种之间金银花品系的差异。本研究中的供试材料分属两种忍冬属植物, 从聚类分析结果中可以看出, 属于忍冬的 3 个品系 LJ1、LJ2、LJ3 聚为一类, 属于菰腺忍冬的 2 个品系 LH1 和 LH2 聚为一类。聚类结果与形态学分类相符。盛红梅等应用 RAPD 对忍冬属 23 种植物的研究结果也显示, 聚类分析结果与前人基于形态学原理的分类结果基本一致^[9]。此外, 5 个品系遗传多样性丰富, 分别表现出不同的遗传特征。不仅种间遗传差异较大, 而且同种的不同品系间的遗传差异也较大, 忍冬的平均遗传距离为 0.5468, 菰腺忍冬的平均遗传距离为 0.5126。忍冬、菰腺忍冬都具有很丰富的遗传多样性, 忍冬的种内遗传多样性更高。周凤琴等从山东地道产区 30 余份忍冬金银花材料确定了 16 个金银花品系^[3], 这充分说明忍冬具有丰富的遗传多样性。遗传多样性反映了物种的遗传背景、育种潜力和利用价值。李萍等^[9]的研究表明, 金银花品种的有效成分差异与遗传变异有关。故忍冬、菰腺忍冬都具有较高的育种潜力, 从现有的遗传资源中有可能筛选到优质高产的优良品系。同时, 引物 SBSD06 在 5 种引物中的扩增条带各不相同。由引物 SBSD06 建立的 DNA 指纹图谱能够清楚区分 5 种供试品系, 这说明运用 RAPD 技术建立金银花品系的指纹图谱是可行的。指纹图谱的建立为这 5 个品系的进一步开发和利用提供了详细的分子生物学依据。

本研究应用 RAPD 的方法来揭示忍冬、菰腺忍冬种内和种间的遗传多样性, 由于所选的材料不多, 可能无法全面了解这两种材料的遗传差异。此外, 本研究也没有全面比较 4 种药用忍冬科植物的遗传关系, 我们还需要进一步收集材料, 深入开展工作。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 177.
- [2] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志(第 72 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1988. 236-238.
- [3] 周凤琴, 张永清, 张芳, 冉蓉, 周洁. 山东金银花种质资源的调查研究[J]. 山东中医杂志, 2006, 25(4): 268-271.
- [4] 王培训, 周联, 赖小平. 分子生物学技术与中药鉴别: RAPD 技术的研究与应用[M]. 广州: 广东世界图书出版公司, 2002. 1-3.
- [5] 薛焱, 秦天才, 张友德. 不同薯蓣皂苷元的盾叶薯蓣遗传关系的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2006, 37(1): 115-118.
- [6] 陈随清, 王利丽, 冀春茹. 山茱萸不同栽培品种的 RAPD 分析

- [J]. 中草药, 2006, 37(3): 430 - 432.
- [7] 王鸣刚, 葛运生, 陈亮, 杨必键, 王小如. 甘草亲缘关系的 RAPD 鉴定[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(4): 289 - 293.
- [8] 于燕莉, 石俊英. RAPD 技术在金银花品种鉴定中的应用 [J]. 中药材, 2000, 23(11): 678 - 679.
- [9] 李萍, 蔡朝晖, 邢俊波. 5S-rRNA 基因间区序列变异用于金银花药材道地性研究初探[J]. 中草药, 2001, 32(9): 834 - 837.
- [10] 盛红梅, 安黎哲, 陈拓, 徐世键, 郑晓玲, 刘亚洁, 蒲玲玲, 孙学刚. 忍冬属植物的遗传多样性及其种间关系研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1405 - 1409.
- [11] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 12 - 15.
- [12] Williams J G, Kubelik A R, Libak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nuc Acids Res*, 1990, 18(22): 6531 - 6535.
- [13] Rohlf F J, NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. Version 2.1. New York: Exeter Software, Setauket, 1993.
- [14] 于燕莉, 向凤宁. DNA 序列分析在金银花品种鉴定中的应用 [J]. 山东科学, 2000, 13(4): 39 - 40, 61.
- [15] 于燕莉, 石俊英. 脱氧核糖核酸序列分析在金银花品种鉴定中的应用[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(2): 136 - 137.
- [16] 于燕莉, 梁爱君, 潘菡清, 黄贤荣, 赵燕, 石俊英. 随机扩增多态性 DNA 和同工酶分析鉴别金银花品系[J]. 解放军药学学报, 2002, 28(6): 333 - 335.
- [17] 石俊英, 于燕莉, 卢燕. RAPD 和 POD 分析技术在金银花品种鉴定中的应用[J]. 山东中医药大学学报, 2001, 25(2): 137 - 138.