

文章编号:1001-5132 (2009) 01-0044-04

浙贝母4品种及5种贝母遗传多样性的RAPD分析

陆 含¹, 朱世华^{1*}, 周书军², 宋乐民², 张林苗³

(1.宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2.宁波市鄞州区农业技术服务站, 浙江 宁波 315100;
3.宁波市鄞州区贝母研究所, 浙江 宁波 315161)

摘要: 通过 RAPD 技术对浙贝母的多子、宽叶、狭叶(浙贝 1 号)和岭下 4 个品种和贝母属的浙贝母、川贝母、皖贝母、东贝母、伊贝母 5 个种的遗传多样性进行了分析, 并对预筛选得到的 9 种多态性丰富的引物进行了 RAPD 扩增, 得到了 57 条清晰可辨的扩增片段, 其中 48 条多态性谱带, 占总谱带数的 84.21%。研究结果表明: 4 个品种之间, 多子贝母与其他 3 个品种间遗传分化较大; 5 个贝母种之间的相似性系数为 0.210 5~0.849 2, 其中东贝母与浙贝母亲缘关系最近, 伊贝母与其他贝母亲缘关系最远; 筛选到的分子标记对于浙贝母不同品种和贝母不同种的鉴别具有重要的意义。

关键词: 贝母; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

中药贝母来源于百合科贝母属多种植物的鳞茎, 具有清热润肺、化痰止咳之功效^[1]。据文献^[2]记载贝母属植物有 20 种 2 变种^[2], 李萍等通过广泛调查和标本采集鉴定出贝母属植物 27 种(包括变种), 并对调查收集的 23 种贝母药材性状进行了描述^[3]。根据贝母药材法鉴定来源, 贝母的原植物来源有川贝母(*F. cirrhosa*)、浙贝母(*F. thunbergii*)、伊贝母(*F. pallidiflora*)、平贝母(*F. ussuriensis*)、湖北贝母(板贝)(*F. hupehensis*) 5 个类别^[4]。在中医处方上则多根据贝母的药理性质、化学成分和功效划分为川贝和浙贝 2 大类^[5]。对贝母资源调查、化学成分分析、药理作用研究以及含量测定等已有大量报道, 但用分子生物学方法对贝母的遗传多样性和种间鉴别方法研究不多^[6-9]。

浙贝母又名象贝、大贝、珠贝、土贝、元宝贝、苏贝(江苏), 为百合科贝母属多年生草本植物。浙贝母鳞茎干燥, 性苦、寒, 具清热散结、化痰止咳、开郁之功, 是常用的中药材, 著名“浙八味”之一, 产地以宁波市鄞州区樟水镇为主。当地浙贝的栽培品种有狭叶浙贝(细叶种、本种)、宽叶浙贝(宽叶种、竹叶青)、轮叶浙贝、三芽浙贝(小三子)、多芽浙贝(多子种)^[10], 其中以狭叶浙贝种植面积最广, 并于 2007 年被浙江省非主要农作物品种认定委员会认定为浙贝 1 号, 但目前这些品种间的遗传分化和分子鉴定并未研究。本文拟通过随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 技术对浙贝母 4 个品种及贝母属的 5 个种进行遗传多样性研究, 分析贝母种间的系统发生关系, 筛选

收稿日期: 2007-11-27.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 宁波市自然科学基金(2006A610074)。

第一作者: 陆 含(1984-), 女, 浙江湖州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 遗传学。E-mail: happy20031209@yahoo.com.cn

*通讯作者: 朱世华(1963-), 男, 浙江宁波人, 博士/教授, 主要研究方向: 植物遗传学。E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn

特异性的分子标记, 为贝母品种的鉴定、分类、遗传育种及资源保护提供理论基础.

1 材料与方 法

1.1 材料

浙贝母的多子、狭叶、宽叶和岭下贝母 4 个品种, 皖贝母(*F. anhuiensis*)、东贝母(*F. thunbergii*)、川贝母、伊贝母 4 个种, 共 8 个样品, 每个样品各采集 4 株植株的叶片用于 RAPD 分析.

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

采用微量 DNA 提取法提取贝母 DNA. 剪取贝母长约 2 cm 的叶片放入 1.5 mL 离心管中, 加 200 μ L 的 TPS 抽提液(100 mmol Tris-HCl(pH 8.0)、10 mmol EDTA(pH 8.0)、1 mol KCl), 将叶片倒碎; 放入 75 $^{\circ}$ C 的水浴锅中温浴 20 min 后离心 5 min (12 000 rpm), 取上清液, 加入等体积的异丙醇, 离心 10 min(12 000 rpm). 弃上清液, 加 200 μ L 的 70% 乙醇, 离心 5 min(12 000 rpm). 弃 70%乙醇, 待沉淀在室温下自然干燥后加 30 μ L ddH₂O 溶解, 置于 4 $^{\circ}$ C 下保存备用.

1.2.2 PCR 扩增

PCR 反应总体积为 25 μ L, 其中模板 DNA 1 μ L (100 ng), dNTP Mixture(2.5 mmol)1.5 μ L, Taq(5 U $\cdot\mu$ L⁻¹) 0.3 μ L, 10 \times PCR Buffer(Mg²⁺ free) 2.5 μ L, MgCl₂ 2.0 μ L, 引物(10 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L. 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 37 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 扩

增后的产物进行凝胶电泳检测.

用 50 个 10 bp 寡核苷酸随机引物(上海生工), 浙贝母 4 个品种(多子、狭叶、宽叶和岭下贝母)各 1 个样品进行引物筛选实验, 选多态性丰富的引物用于全部样本的 RAPD 分析.

1.3 统计分析方法

根据电泳结果统计清晰可重复的 RAPD 条带, 对于同一引物的扩增产物, 迁移率相同的条带记为 1 个位点, 扩增阳性赋值为 1, 阴性赋值为 0, 运用 Popgen3.2 软件计算单位引物多态性条带及多态性条带百分率、品种与种间的遗传相似性系数(genetic similarity)和遗传距离(genetic distance). 将所得到的遗传距离数据用 PHILIP3.65 软件中的 Neighbor Joining 程序处理, 得到基于 NJ 的系统树.

2 结果与分析

2.1 5 种贝母的 RAPD 结果

50 个随机引物中经过引物筛选实验, 选出其中 9 种随机引物(S301、S303、S304、S307、S311、S313、S314、S338、S349)用于全部样本的 RAPD 分析实验(图 1). 共获得 57 条清晰可辨的扩增片段, 其中 48 条多态性谱带, 占总谱带数的 84.21%(表 1). 不同引物扩增出的清晰条带数为 5~9 条, 多态性条带数为 4~7 条. 平均每个引物扩增出的片段条带数为 6~7 条, 平均每个引物产生的多态性条带数目为 5~6 条.

2.2 遗传相似性分析

对 8 个贝母品种和种间进行了遗传多样性分

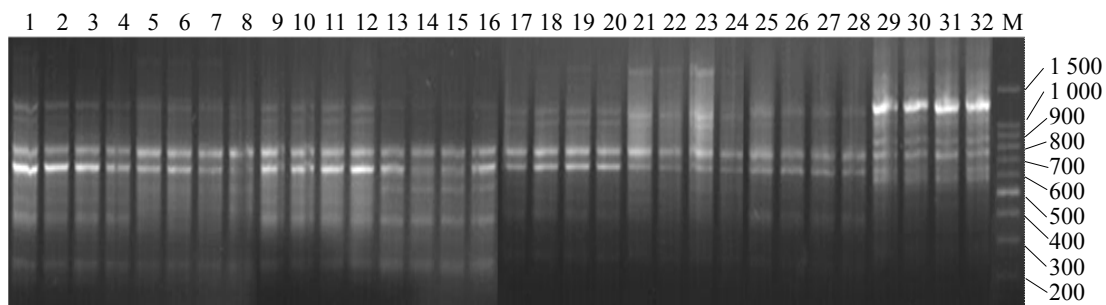


图 1 RAPD 扩增部分结果(引物 S307)

东贝母也有学者认为是浙贝母的变种, 李萍等通过对花粉形态的研究, 发现二者的花粉形态近似, 但有一定的区别^[1]。在本实验中它与浙贝母的亲缘关系最近, 但是否属于浙贝母的变种, 还是单独的种有待进一步研究。伊贝母与其他贝母的亲缘关系最远, 结果显示遗传多样性与贝母资源所处的地理位置相关。

此外, 实验所选的引物对于品种和种间的鉴定、遗传选育都有一定的应用价值, 同时为进一步发掘和充分利用贝母资源提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 李萍. 贝母类中药的镇咳祛痰作用研究[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24:360-364.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [3] 李萍, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 中药贝母类的研究 XII—资源调查和性状鉴定[J]. 中国药科大学学报, 1990, 21(1): 19-25.
- [4] 严玉平, 雷宇华, 由会玲, 等. 川贝母及代用品种源与分布初步研究[J]. 河北中医药学报, 2007, 22(2):42-43.
- [5] 王冲之, 孙健, 李萍. 贝母类药材生物碱及生物碱苷含量测定方法学研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(6):415-418.
- [6] 卞云云, 李萍, 高志千, 等. RAPD 技术在中药贝母类研究中的应用[J]. 中药材, 2000, 23(1):13-16.
- [7] 蔡朝晖, 李萍, 董婷霞, 等. 贝母的分子生物学鉴定方法的研究[J]. 药学学报, 2000, 35(4):309-312.
- [8] 李玉锋, 唐琳, 陈放. 8 种贝母的 RAPD 分析[J]. 中成药, 2006, 28(10):1 258-1 259.
- [9] 尹春萍, 刘文涛, 徐顺清, 等. 湖北贝母与川贝母随机扩增引物 DNA 的鉴别[J]. 医药导报, 2007, 26(4):359-361.
- [10] 崔培章. 五种浙贝母的光合强度及干物质、生物碱积累动态的研究[J]. 中药材, 1993, 16(6):4-7.
- [11] 李萍, 濮祖茂, 徐珞珊, 等. 中国贝母属花粉形态的研究[J]. 云南植物研究, 1991, 13(2):41-46.

Specific RAPD Screening of Breeds in *Fritillaria Thunbergii* and Genetic Diversity Analysis of Five Species of *Fritillaria*

LU Han¹, ZHU Shi-hua^{1*}, ZHOU Shu-jun², SONG Le-min², ZHANG Lin-miao³

(1.Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2.Yinzhou District Agriculture Technique Service Station, Ningbo 315100, China; 3.Yinzhou District *Fritillaria* Research Institute, Ningbo 315161, China)

Abstract: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) is used to study the genetic diversity of four *F. thunbergii* varieties including addition of seeds, broad-leaf, narrow leaves (the breed has been identified as countries on the 1st of *Fritillaria thunbergii*), lingxia and five fritillaria species including *F. thunbergii*, *F. cirrhosa*, *F. anhuiensis*, *F. thunbergii* var. *chekiangensis*, *F. pallidiflora*. By prescreening, nine polymorphic primers are selected for further RAPD amplification. The results clearly display 57 identified amplicons with 48 polymorphic bands accounting for 84.21% of all the bands. Among four *F. thunbergii* varieties, *Fritillaria* with additional seeds differs from the other three varieties. The coefficient in *Fritillaria* species range from 0.210 5 ~ 0.849 2. *F. thunbergii* var. *chekiangensis* and *F. thunbergii* have close relationship while *F. pallidiflora* and other fritillaria distances each other most. Screened molecular markers can be applied to identify different *F. thunbergii* varieties and fritillaria species.

Keywords: fritillaria; genetic diversity; RAPD

CLC number: R284.1

Document code: A

(责任编辑 史小丽)