

分子标记技术在药用植物研究中的应用

肖哲丽^{1,2}, 柳金凤²

(¹宁夏大学生命科学学院, 银川 750004; ²种苗生物工程国家重点实验室, 银川 750004)

摘要:分子标记是继形态标记、细胞标记和生化标记之后发展起来的一种比较理想的遗传标记技术。本文综述了几种常用的DNA分子标记技术的原理, 特点及其在药用植物上的最新研究成果和进展, 为准确、科学的评价药用植物的品质及真伪优劣提供可靠的依据, 并对分子标记技术在药用植物研究上的应用前景进行了展望。

关键词:分子标记; 药用植物; 应用

中图分类号: S567

文献标志码: A

论文编号: 2010-3202

Molecular Markers and Their Application in Medicinal Plants

Xiao Zheli^{1,2}, Liu Jinfeng²

(¹College of Life and Science of Ningxia University, Yinchuan 750004;

²State Key Laboratory of the Seedling and Bioengineering, Yinchuan, 750004)

Abstract: Molecular markers are ideal genetic markers after the development of morphological marker, cytological marker and biochemical marker. The principles, characteristics and the latest achievement and progress of molecular markers in medicinal plants were reviewed and which can provide a reliable basis for accurate and scientific evaluation on the quality and authenticity of the pros and cons of medicinal plants. The prospects of molecular markers in medical plants were also discussed.

Key words: molecular markers; medicinal plants; application

0 引言

药用植物是中国中药资源的重要组成部分, 作为药用植物资源的研究方法, 早期有形态学标记、细胞学标记与生化标记。然而, 早期的鉴定手段都是针对基因的表达产物进行的, 受环境影响较大。近年来, 随着分子生物学技术的发展, DNA分子标记技术已广泛用于药用植物遗传多样性、系统学、分类学研究, 以及种质资源鉴定等各个方面, 极大地促进了该领域的发展^[1]。分子标记(molecular markers)是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 揭示来自DNA的变异, 能够反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性DNA片段, 大多数DNA分子标记以电泳谱带的形式表现个体之间的DNA差异^[2]。由于DNA分子标记具有快速、微量、特异性强、准确可靠等优点,

且不受生育阶段、供试部位、环境条件、贮藏等因素影响, 近年来对其研究及运用十分活跃^[3]。目前, 用于药用植物研究的分子标记技术主要有RFLP、RAPD、SSR、ISSR、SRAP、AFLP等, 本文通过分析分子标记技术的特点、适用范围, 以及近年来国内外分子标记技术在药用植物研究中的最新研究成果, 为准确、科学的评价药用植物的品质及真伪优劣提供可靠的依据, 同时也为研究人员根据不同的实验目的选择合适的分子标记技术提供比较准确的参考。

1 分子标记在药用植物研究中的应用

1.1 限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

RFLP是最早发展的分子标记技术, 它利用限制性内切酶解及凝胶电泳分离不同的DNA分子, 然后

基金项目:宁夏自治区科技攻关项目“基因工程构建和培育抗盐经济作物技术研究”。

第一作者简介:肖哲丽, 女, 1985年出生, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物基因工程。通信地址: 750004 宁夏银川市胜利南街1059号, E-mail: xiaozheli-2008@163.com。

通讯作者:柳金凤, 女, 1983年出生, 助理研究员, 硕士。研究方向: 生物技术。通信地址: 750004 宁夏银川市胜利南街1059号, E-mail: liujinfeng_317@163.com。

收稿日期:2010-11-09, **修回日期:**2010-12-20。

用特异DNA探针与之杂交,通过放射自显影或非同位素显色技术来揭示DNA的多态性的遗传标记。由于DNA中限制性内切酶酶切识别序列中出现碱基的变异而导致酶切位点的增减所引起的限制性片段长度的差异^[4]。近年来,RFLP技术在品种鉴定、物种进化、基因定位、亲缘关系研究,遗传图谱的构上都有一定的应用。在多源性中药材如伞形科北沙参、柴胡、菊科苍术属、豆科甘草属、羽扇豆属、茄科澳茄属、3种苍术的基原鉴定、资源分析及其地理品系(居群)间亲缘关系研究方面有了一些报道^[5]。但由于RFLP技术在实际应用中整个处理过程比较冗长,步骤繁琐,操作相对复杂,并且受到探针来源地限制,实验成本相当较高,对实验材料要求严格,难以适用于干燥的药用植物的研究等缺陷的制约,在药用植物研究尤其是需要大量分子标记进行遗传多样性研究中受到限制,近年来在药用植物研究上已经很少使用。

1.2 随机扩增多态性DNA(Random Amplified Polymorphism DNA,RAPD)

RAPD技术是建立在PCR基础上的一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的DNA分子标记技术。RAPD技术由于反应灵敏、多态性强、操作简便、不受种属特异性的限制等优点,被广泛用于遗传多样性和品种鉴定的研究中^[6,7]。相对于其他几种分子标记,RAPD标记是在药用植物品种鉴定领域用得最多的分子标记技术^[8],并对药用植物研究产生了深刻的影响。所涉及的药用植物总计达到近百种之多,利用分子标记技术不仅可以对分析结果进行聚类分析,而且可以获得与种有关的DNA带型^[9]。谷巍等^[10]运用RAPD分子标记分析了福建、江西、四川产泽泻的遗传多样性,用筛选的28个引物进行扩增,共检测到171个多态性位点,多态位点比率为63.6%,证明不同产地泽泻具有较高的遗传多样性,RAPD分子标记方法可以用来鉴定不同产地的泽泻。华树妹等^[11]利用RAPD技术对34份山药资源进行遗传多样性分析,聚类分析结果与经典的园艺学分类相符,在分子水平上支持了按园艺学薯块类型对山药资源进行分类的观点。杜勤等^[12]建立及优化青天葵样品总DNA的提取方法及RAPD反应体系,探讨不同品种的青天葵及其替代品、伪品在DNA分子水平上的遗传多样性及其遗传关系,证明RAPD技术可以很好的鉴别青天葵。Rout GR^[13]运用RAPD技术对心叶青牛胆进行研究,证明RAPD技术具有检测药用植物遗传变化的潜力。RAPD技术还能很好的鉴别不同地域的车前^[14]、菊科苍术属^[15]、铁线莲属^[16]的药用植物,并且对人参及其伪

品、甘草、黄连、冬虫夏草及其伪品、贝母等药材也有很好的区分作用,因此,RAPD标记完全适用于种内水平的亲缘关系研究,也可用于种间及近缘属间亲缘关系和品种鉴定的。

1.3 简单重复序列(Simple Sequence Repeats,SSR)

生物的基因组中,特别是高等生物的基因组中含有大量的重复序列,由于重复次数及重复程度不完全相同而呈现多态性。根据微卫星两端的保守单拷贝序列设计一对特异性引物,进行PCR扩增,扩增产物经凝胶分离,放射自显影,银染或荧光进行检测,即可显示不同基因型个体在SSR位点的多态性^[18]。SSR标记数量丰富,具有较多的等位性变异,共显性,重复性好,结果可靠等优点。

SSR-PCR产物的检测一般是通过变性聚丙烯酰胺凝胶,非变性聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶进行电泳检测。郑伟耀等^[19]提取天麻DNA,进行PCR扩增,用SSR标记DNA,结果表明特异引物扩增位点与天麻素含量有关,这为探讨天麻遗传变异与其品质的关系以及优良种质的选育提供了科学途径。此项技术结果稳定可靠,但因为在设计引物之前必须知道重复序列两端的特异序列,且引物具有物种特异性,使得引物设计难度较大,导致其应用受到了很大限制。

1.4 简单重复序列间扩增(Inter-Simple Sequence Repeats,ISSR)

ISSR是利用在基因组中常出现的SSR本身作为引物进行多位点PCR扩增的技术。ISSR标记以其高多态性,已广泛用于绘制DNA指纹图谱、遗传多样性分析、品种鉴定等许多领域^[20]。

葛娟等^[21]运用RAPD和ISSR分子标记技术,对29份新疆红花栽培品种的遗传多样性进行检测,结果表明红花不同品种之间具有比较丰富的遗传变异。对比RAPD和ISSR在PCR反应中的稳定性和检测变异的能力表明,ISSR的实验稳定性优于RAPD,而且ISSR能检测到比RAPD更多的遗传变异。刘逸慧等^[22]运用ISSR标记技术对来自浙江磐安和浙江、贵州、福建、湖北的4个白术栽培群体以及来自安徽的1个苍术栽培群体进行遗传多样性分析,结果表明中国栽培白术的种质遗传多样性较高,有利于培育高品质的药材。曹秀明^[23]对东北产药材龙胆的3个不同品种进行了DNA提取和RAPD及ISSR分析,筛选出3条RAPD引物能把供试的3种龙胆区分开,聚类分析结果表明分子标记技术可用于龙胆的鉴别以及亲缘关系划分。另外,芸香科植物^[24]和白芷^[25]的ISSR-PCR最佳反应体系和扩增程序也已建立,为进一步利用该标记技术进行品

种鉴定和遗传多样性研究奠定了基础。ISSR 技术由于其 DNA 用量少, 实验重复性好, 操作过程相对简单, 技术要求低, 多态性水平高等优点, 在药用植物研究中已崭露头角, 相信随着分子标记技术的不断发展和完善, ISSR 技术必将以其显著地优势广泛应用于药用植物研究中。

1.5 相关序列扩增多态性 (Sequence-Related Amplified Polymorphism, SRAP)

SRAP 是一种基于 PCR 的新型标记, 具有产率中等, 重复性好, 操作简单等优点, 在中药材的多样性分析, 指纹图谱构建及道地性药材的研究中有着较广泛的应用。SRAP 技术是通过 1 对引物对 ORFs 进行扩增, 利用在不同个体中外显子的相对保守性及内含子和启动子的可变性, 通过正反引物的组合搭配扩增出基于内含子与外显子的 SRAP 多态性标记。

利用 SRAP 技术对于中药的遗传连锁图谱构建和育种研究尚在起步阶段, 但国内已有相关报道, 特别是对于名优中药材等的研究, 一直走在前沿。黄璐琦^[26]等从生物学角度认为道地药材是药材原植物的基因型及其所处的环境决定的, 并探讨了以丹参作为道地性药材研究模式植物的可行性。李廷春^[27]等建立和优化了丹参的 SRAP 反应体系, 从 88 对引物组合中筛选得到 36 对多态性引物组合, 对生长在四川中江、陕西商洛、山东、临沂、安徽亳州和安徽凤阳 5 个丹参主产区的 6 个丹参种群进行了遗传多样性分析, 结果表明: 36 对多态性引物组合共产生 782 条多态性条带, 显示了较高的多态性, 说明 SRAP 技术可有效地应用于丹参的遗传多样性及亲缘关系的研究。谷凤平^[28]以怀地黄 DNA 为模板, 进行 SRAP 反应条件的优化, 构建了怀地黄 23 个品种的 DNA 指纹图谱, 为怀地黄品种鉴定、遗传多样性分析、分子标记辅助育种和质量综合评价等研究奠定了基础。钱丹等^[29]采用 SRAP 分子标记对来源于 12 个产地的蒙古黄芪的样品进行了 SRAP 多态性分析, 表明蒙古黄芪居群间遗传分化明显, SRAP 技术可以有效用于蒙古黄芪的亲缘关系分析, 为蒙古黄芪的种质资源评价提供一定的依据。除了应用于以上大宗贵重的中药材研究外, SRAP 技术还被应用于青葙子^[30]、芫花^[31]、荆半夏^[32]等中药材的遗传多样分析。

1.6 扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

AFLP 是 1993 年发展起来的一种检测 DNA 多态性的方法。该方法具有多态性高、扩增结果稳定、不需要了解序列信息等优点^[33], 并且处理样品数量多、灵敏度高、易操作。近年来该技术已广泛应用于遗传图谱

构建、中药基因定位、遗传多样性分析、分子标记辅助育种及生物系统分类等方面的研究^[34]。AFLP 技术是以酶切后 DNA 作为扩增反应的模板, 进行选择性的扩增, 扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离显示其多态性。它结合了 RFLP 和 PCR 技术特点, 具有 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性。近年来利用 AFLP 标记对药用植物种质资源遗传多样性的研究也呈逐渐增多趋势。

陈要臻^[35]等建立了白芷的扩增片段长度多态性的反应体系, 并筛选出了适合白芷的引物, 构建了白芷种质资源的 AFLP 指纹图谱, 为今后利用 AFLP 标记技术进行白芷品种鉴定及种质遗传多样性分析提供了标准化程序。谢渊等^[36-37]用 AFLP 标记分别对石斛以及天麻进行分析, 得到了清晰的石斛及天麻的 AFLP 指纹图谱。张磊等^[38]用 AFLP 技术, 对 28 个中国红花品种进行分析, 为进一步红花种质量资源选育和筛选品质相关基因奠定基础。AFLP 可在一次单个反应中检测到大量的片段, 所以说 AFLP 技术是一种新的而且有很大功能的 DNA 指纹技术。但是 AFLP 技术受到专利保护, 应用受到限制, 试剂盒价格昂贵; 另外, 操作中通常要利用同位素标记, 对样品 DNA 质量要求严格等, 限制了其在实践中的广泛应用。

2 展望

DNA 分子标记技术以其特异性强、稳定性好, 结果直观、可靠等优势作为药用植物资源的研究手段, 经过多年的研究已经在整体上处于一个较高的水平。从基因水平上对药用植物进行研究, 不仅在药用植物的亲缘关系研究、单味药材的鉴别、濒危物种的保护、基因定位与分离、品种鉴定、资源评价等方面为药用植物研究进行了完善和补充, 并且为药用植物提供了新的研究思路, 为现代药用植物的研究注入了新的活力, 展示了良好的应用前景, 受到了植物科研工作者的广泛关注和实际应用。但是由于 DNA 分子标记技术的检测实验体系还没有形成统一的标准, 因此, 必须要认识到建立一套完备的 DNA 检测鉴定技术体系的必要性, 虽然目前药用植物的研究仍以传统的研究方法为主, DNA 分子标记技术作为一项应用于药用植物的新的方法和手段, 投入的人力物力还很有限, 与药用植物其他方面的研究的结合还未展开, 而且由于分子标记技术对实验条件和研究人员的技术要求比较高, 另外对后期实验数据的软件分析缺少统一的分析标准, 就限制了此项技术在生产收购一线的广泛应用。

今后应广泛开展 DNA 分子标记技术在更多药用植物研究中的应用, 通过比较不同分子标记技术的特

点和适用条件,根据不同的实验目的,确定适合不同种类药用植物的分子标记技术。还可以通过分子标记技术研究大分子多态性和小分子药用成分分布规律之间的联系,为药用成分快速、准确的开发与利用提供新的研究思路,另外,由于分子标记技术本身也在不断地发展和完善,利用分子标记技术研究濒危药用植物的遗传多样性,检测遗传结构,通过制定具体、科学的药用植物保护措施,使药用植物保护理论和实践相结合,来保护丰富的药用植物种质资源,达到可持续利用的目的。由于DNA分子标记具有极其显著的技术优势,在推进药用植物现代化研究进程中,必将发挥重要的作用。

参考文献

- [1] 韩艳丽,朱建华.DNA分子标记技术在中草药鉴定中的应用[J].现代中药研究与实践,2008,22(4):62-65.
- [2] 王军,谢皓,郭二虎,等.DNA分子标记及其在谷子遗传育种中的应用[J].北京农学院学报,2005,20(1):76-80.
- [3] 王建,赵应学.分子标记在药用植物中的研究概况[J].广西中医药,2009,32(2):65-67.
- [4] 关强,张月学,徐香玲,等.DNA分子标记的研究进展及几种新型分子标记技术[J].黑龙江农业科学,2008(1):102-104.
- [5] 李力,徐永莉,张月云,等.DNA分子标记在中药鉴定中的应用及发展趋势分析[J].时珍国医国药,2009,20(11):2845-2847.
- [6] 周宇燧.分子标记发展简史[J].现代农业科技,2009(11):264-270.
- [7] 汤复跃,周立人.RAPD和RFLP在大豆研究中的有关进展[J].安徽农学通报,2006,12(6):52-53.
- [8] 黄璐琦.分子生物学[M].北京:北京医科大学出版社,2000:228-254.
- [9] Dangi R S, Lagu M D, Choudhary L B, et al. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers [J]. BMC Plant Biol, 2004,30(4):13.
- [10] 谷巍,吴启南,巢建国,席蓓莉,张莹.不同产地泽泻RAPD分析[J].南京中医药大学学报,2009,25(6):147-153.
- [11] 华树妹,涂前程,雷伏贵.福建山药种质资源遗传多样性的RAPD分析[J].植物遗传资源学报,2009,10(2):195-200.
- [12] 杜勤,魏智强,田军.基于RAPD的青天葵遗传多样性及鉴别研究[J].中药新药与临床药理,2009,20(6):554-557.
- [13] Rout G R. Identification of *Tinospora cordifolia*(Wild.)Miers CX Hook or Thomas using RAPD markers[J].Z Naturforsch,2006,61(1~2):118.
- [14] Guo W L, Gong L, Ding Z F, et al.Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth.Et Hook.F. as revealed by ISSR and RAPD markers[J].Plant cell Rep.2006,25(9):896.
- [15] Kohjyouma M, Kurihara K, Yamada K, et al. Genetic identification of cinnamon (*Cinnamomum* spp.) based on the trnL and rHf chloroplast DNA[J]. Planta Medica,2002,68(1):94.
- [16] 普春霞杨,竹雅,刘小莉.云南铁线莲属12种药用植物的RAPD分析[J].云南中医学院学报,2008,31(5):37-41.
- [17] 孙琦,孟昭东,张发军,等.SSR标记在玉米遗传育种中的应用[J].玉米研究,2006,14(1):37-39.
- [18] 郑伟耀,宋聚先,王晓丽,等.天麻微卫星DNA分子标记与天麻素含量的关系[J].贵阳医学院学报,2010,35(1):4-7.
- [19] 张玉星,马艳芝,赵国芳.简单重复序列间扩增分子标记技术及其应用[J].生物技术通报,2009(9):54-56.
- [20] 葛娟,岳庆妮,王蕾,等.用RAPD和ISSR法研究新疆红花主栽品种的遗传多样性[J].新疆农业科学,2009,46(6):1164-1170.
- [21] 刘逸慧,陈斌龙,周晓龙,等.药用植物白术栽培群体的遗传多样性研究[J].中国中药杂志,2008,33(23):2756-2760.
- [22] 曹秀明,郑蔚虹,尚明.DNA分子标记技术在龙胆鉴别与亲缘关系划分上的应用[J].中华中医药学刊,2007,25(4):829-830.
- [23] 柴素芬,陈兆贵,洪彩霞.芸香科药用植物ISSR-PCR反应体系的建立及优化[J].安徽农业科学,2008,36(33):1433-1435.
- [24] 郭丁丁,马逾英,唐琳,等.白芷ISSR-PCR反应体系的建立和优化[J].成都中医药大学学报,2008,31(2):45-48.
- [25] 黄璐琦,戴住波,吕冬梅.探讨道地药材研究的模式生物及模型[J].中国中药杂志,2009,34(9):1063-1066.
- [26] 李廷春,樊洪泓,高正良,等.丹参遗传多样性的SRAP标记分析[J].核农学报,2008,22(5):576-580.
- [27] 谷凤平,周春娥,路淑霞,等.怀地黄SRAP分子标记体系的建立与DNA指纹图谱的构建[J].河南师范大学学报(自然科学版),2009,37(3):175-178.
- [28] 钱丹,黄璐琦,崔光红,等.不同产地蒙古黄芪遗传关系的SRAP分析[J].中国中药杂志,2009,34(4):382-385.
- [29] Feng N, Xue Q, Guo Q H, et al. Genetic diversity and population structure of *Celosia argentea* and related species revealed by SRAP [J].Biochem Genet,2009,47(7-8):521-532.:
- [30] 王从彦,李晓慧,胡颖,等.SRAP分子标记分析芫花遗传多样性[J].河南科学,2008,26(5):554-556.
- [31] 邓瑞宁,王沫,李再云,等.荆半夏遗传多样性的SRAP分析[J].农业生物技术学报,2008,16(6):1070-1071.
- [32] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al.AFLP: a new technique for DNA finger printing[J]. Nucleic Acids Res.1995,23(21):4407-4414.
- [33] 韩艳丽,朱建华.DNA分子标记技术在中草药鉴定中的应用[J].现代中药研究与实践,2008,22(4):62-65.
- [34] 陈要臻,郭丁丁,马逾英,等.白芷扩增片段长度多态性反应体系的建立及优化[J].时珍国医国药,2008,19(12):2844-2846.
- [35] 虞泓,和锐,倪念春,等.石斛属4种植物的AFLP分析[J].中草药,2004,35(7):808.
- [36] 谢渊,张小蕾,李毅,等.天麻AFLP分析技术体系的建立[J].生物技术,2007,17(1):47.
- [37] Zhang L, Huang B B, Kai G Y, et al. Analysis of intraspecific variation of Chinese *Carthamus tinctorius* L. using AFLP markers [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2006,41(1):91.