

半夏不同变异类型的RAPD分析

杨小林, 杨俊宝, 赵梅^(1. 川北医学院医学生物学教研室, 四川南充637007; 2. 四川省南充市第五中学, 四川南充637000)

摘要 为了利用RAPD技术研究半夏的各种变异类型。以栽培多年的6个不同变异类型的半夏为实验材料,取每一变异类型中的5~10株新鲜叶片,提取总基因组DNA。从100条随机引物中筛选出17条重复性好、条带清晰、能体现半夏性状变异类型差异的引物进行RAPD扩增。RAPD分析结果表明,17个RAPD引物扩增出了81条带,其中55条为多态带,占67.9%,表明半夏不同变异类型间存在分子水平的遗传差异。该研究为半夏的品种改良与栽培奠定了基础。

关键词 半夏; 性状变异; RAPD分析

中图分类号 S567.23⁺⁹ 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)21-06381-02

RAPD Analysis of the Different Variance Types of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.

YANG Xiaolin et al (Department of Medical Biology, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637007)

Abstract The study was constructed to make use of RAPD technology to study the variance types of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. With 6 different variance types of *P. ternata* cultured for many years as experiment materials, total genomic DNA was extracted from fresh leaves of 5~10 plants for each variance type. 17 primers that could embody the differences in various variance types with good repeatability and clear bands were screened from 100 random primers for the RAPD amplification. RAPD analysis showed that 81 bands were produced by the amplification of 17 RAPD primers, with 55 bands being polymorphic (being 67.9%), which indicated that there were genetic difference in the molecular level among different variance types. The study laid the foundation for variety improvement and cultivation of *P. ternata*.

Key words *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; Variation; RAPD analysis

半夏 [*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.] 是天南星科的多年生草本植物。其块茎入药,具有燥湿化痰、降逆止呕、清痞散结的功效,为我国传统的中药。近年来,由于生态环境遭受破坏,半夏野生资源日益减少,商品半夏主要来源于人工栽培。然而,人工栽培半夏在其生长过程中,群体中出现了许多性状变异类型,主要体现在叶形、珠芽着生方式和叶裂片数目上^[1-2]。这些性状变异是否引起半夏主要有效成分的改变还未见报道。笔者利用RAPD技术对半夏各变异类型进行研究,以期对半夏的改良及栽培奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料 半夏材料取自西华师范大学半夏实验基地,各变异类型均已栽培多年,其分类标准参照魏淑红等^[3]的分类方法。半夏的变异类型及形态性状见表1。

表1 半夏的变异类型及形态性状

编号	变异类型	形态性状
1	阔叶半夏	阔3叶(主叶片长宽比值 2.02)
2	柳叶半夏	3叶(主叶片长宽比值介于2.60~3.94)
3	细叶半夏	3叶(主叶片长宽比值 8.04)
4	4~5裂叶半夏	阔叶(两侧小叶又分别一裂为二)
5	双珠芽半夏1	阔3叶,叶柄基部与顶部各生一珠芽
6	双珠芽半夏2	细5叶,叶柄基部与顶部各生一珠芽

1.2 实验方法 于每一变异类型中5~10个不同单株上分别取新鲜叶片1~2g,剪碎混合后提取总基因组DNA。具体操作方法与流程参阅文献^[4],并将各材料的DNA浓度调至50 ng/ μ l备用。RAPD反应在BIO-RAD公司MyCyderTM型扩增仪上进行,RAPD引物和dNTPs来自上海生物工程公司。对100个随机引物进行筛选,RAPD反应体系为25 μ l,即:1 \times PCR buffer,1.5 mmol/L MgCl₂,1 U Taq 酶,0.25 μ mol/L 引物,100 ng 模板DNA,dNTPs 各0.2 mmol/L。反应程序为:94 预

变性3 min,94 变性1 min,36 退火1 min,72 延伸2 min,循环45次,最后72 延伸10 min,4 下保存。扩增片段用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,使用凝胶成像系统拍照记录结果。统计PCR扩增的条带,谱带按0/1系统记录,有带记为1,无带记为0,并进行分析。

2 结果与分析

采用RAPD技术从分子水平研究半夏不同性状变异类型的条带特征,从100条引物中筛选出17条重复性好、条带清晰、能体现半夏性状变异类型差异的引物进行扩增。不同碱基序列的引物及其在半夏不同变异类型间扩增反应的结果列于表2。

表2 RAPD分析中引物及扩增结果

引物	碱基序列	扩增总带数	多态带数	多态位点比率
S5	TCCGCCCTTC	4	2	0.500
S7	GGTGACGCAG	4	3	0.750
S8	GTCACACGG	6	4	0.667
S10	CTGCTGGGAC	4	3	0.750
S11	GTAGACCCGT	5	3	0.600
S12	CCTTGACCCA	2	1	0.500
S17	AGGGAACGAG	5	4	0.800
S20	GGACCCCTAC	5	4	0.800
S51	ACCGCCATTG	3	0	0.000
S53	GGGGTGACCA	5	5	1.000
S55	CATCCGTGCT	6	5	0.833
S85	CTGAGACCGA	7	4	0.571
S94	GGATGAGACC	6	5	0.833
S98	GGCTCATGTG	4	1	0.250
S99	GTCAGGCGAA	6	5	0.833
S164	CCGCCCTAGTC	3	1	0.333
S265	GGCGGATAAG	6	5	0.833
Totl	17	81	55	0.679

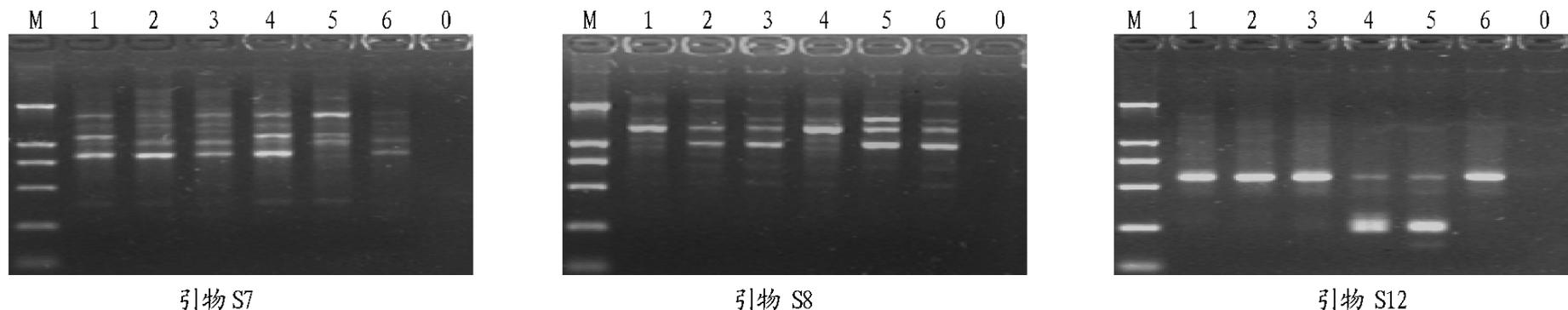
采用筛选出的不同引物对半夏6个变异类型进行扩增,部分RAPD指纹图谱如图1。结果表明:17个引物中有16个(占94.1%)引物的扩增产物具多态性;扩增出的产物条带在2~7条,平均每个引物扩增4.8条带,共产生81条扩增产物

作者简介 杨小林(1963-),男,四川西充人,讲师,从事遗传学的教学和研究工作。

收稿日期 2007-04-09

带,其中55条具有多态性,占67.9%,这表明半夏不同变异

类型间确实存在分子水平上的即遗传基础的差异。



注: M 代表 DNA marker DL2000;泳道 1~6 代表表 1 中变异类型编号;0 代表阴性对照。

图 1 半夏 6 个变异类型的部分 RAPD 指纹图谱

3 结论与讨论

生物性状的表现,一方面是由遗传因素决定的,另一方面与环境因素有关,环境条件的不同也可使性状发生变异。其中,环境因素除了自然环境外,还有人工栽培措施。实验材料多年栽培在同一实验地,实验地的土壤结构、土壤酸碱度、土壤肥力、土壤水分、光照以及管理措施相同,因此,选取来自同一实验地的不同变异类型来分析半夏群体的性状变异产生的遗传基础方面的差异是比较可信的。实验结果表明,半夏各变异类型间均有显著的遗传差异,进一步证实各变异性状愈多愈好是由遗传差异引起,并可以遗传。

在一项系统学研究中,需要分析多少个性状(位点),一直是一大难题。至今能够普遍接受的仍然是分析的性状愈多愈好,这在实践上难度很大。刘丽等^[5]用 25 个引物,对 40 个样本扩增,研究了勒氏笛鲷随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析中的最适样本量和位点数。结果显示,位点数达到 70 个以上时,遗传距离趋于一个稳定的数值,即在 RAPD 分析

中,位点数应达到 70 才能保证结果的可靠性。在笔者的实验中所得位点数为 81 个,结果具有一定的可靠性。

从该实验可知,半夏变异类型之间存在分子水平的遗传差异,这些变异类型在产量、药效成分等方面是否也发生了相应的改变,还需继续研究。因此,今后应该进一步探讨半夏变异类型与产量、药效成分含量的相关性,以找出产量高、药用品质好的类型,淘汰产量低、药用品质差的类型,从而达到改良半夏品质的目的。

参考文献

- [1] 郭巧生,贺善安.半夏种内形态变异的模糊聚类分析[J].植物资源与环境,1997,6(3):29-34.
- [2] 李名旺,顾德兴,刘友良,等.半夏属若干变异式样及其演化[J].武汉植物学研究,1997,15(4):317-322.
- [3] 魏淑红,彭正松.半夏群体性状变异类型研究[J].江苏农业科学,2004(6):37-40.
- [4] 杨俊宝,彭正松,杨军,等.半夏基因组 DNA 的提取及鉴定[J].现代中药研究与实践,2006,20(3):26-29.
- [5] 刘丽,刘楚吾,曾健民.RAPD 分析中最适样本量和位点数的研究[J].湛江海洋大学学报,2005,25(4):1-4.