

茅山苍术与苍术素相关的 RAPD 标记研究

韦阳连, 吴宝成*, 周义锋 (江苏省中国科学院植物研究所 南京中山植物园, 江苏省植物迁地保护重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要 [目的] 探索鉴别苍术素高含量株与低含量株的方法, 为筛选高含量苍术素株苗提供理论依据。[方法] 对茅山 100 个苍术单株进行苍术素含量测定分析, 从中选取 3 个高含量株和 3 个低含量单株, 将其总 DNA 用于茅苍术-苍术素相关性 RAPD 研究。[结果] 在所筛选的 132 个随机引物中, 引物 B16 (5-TTGCCCGGA-3) 和 F15 (5-CCAGTACTCC-3) 可以对苍术素高含量株与低含量株进行鉴别。用这 2 条引物分别对 3 个高含量单株和 3 个低含量单株进行扩增, 结果表明, 高含量株系的特异性条带只在高含量单株中存在, 低含量株系的特异性条带只在低含量单株存在。[结论] 该研究成功找到了与苍术素高含量株或低含量株相关的分子标记。

关键词 苍术; 苍术素含量; RAPD 标记

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)24-10368-03

Study on *Atractylodes* and *Atractylodin* associated RAPD Markers in *M. Maoshan*

WEI Yanglian et al (Key Laboratory for Plant Ex-situ Conservation in Jiangsu Province, Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden), Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract [Objective] The aim was to explore the method for identifying the plants with high and low *atractylodin* content and provide the theoretical basis for screening the high content *atractylodin* seedlings. [Method] The *atractylodin* content of 100 *atractylodes* individuals from *M. Maoshan* was tested and analyzed, in which 3 individuals with high *atractylodin* content and 3 individuals with low *atractylodin* content were selected and their total DNA were used for the *atractylodin*-associated RAPD research. [Result] The primers B16 (5-TTGCCCGGA-3) and F15 (5-CCAGTACTCC-3) could distinguish individuals with high *atractylodin* content from the individuals with low ones and the 3 individuals with high *atractylodin* content and 3 individuals with low ones were amplified using the 2 primers. The result showed that the specific bands of the high content *atractylodin* strains existed only in the *atractylodes* individuals with high *atractylodin* content and that of the low content *atractylodin* strains existed only in the *atractylodes* individuals with low *atractylodin* content. [Conclusion] This research found the high content or low content *atractylodin*-associated molecular markers successfully.

Key words *Atractylodes*; *Atractylodin* content; RAPD marker

苍术 (*Rhizoma atractylodis*) 是我国著名传统中药材, 来源于菊科 (Compositae) 苍术属 (*Atractylodes* DC.) 茅苍术 (*A. lancea* (Thunb) DC.) 和北苍术 (*A. chirensis* (DC.) Koidz.) 的干燥根茎^[1]。《中国植物志》将茅苍术和北苍术合并为 1 种苍术 (*A. lancea* (Thunb) DC.)^[2]。茅苍术根茎挥发油的主要化学成分为苍术素、苍术酮、-桉叶醇和茅术醇等, 不同产地的苍术挥发油组成成分和含量差异较大^[3], 江苏道地茅苍术总挥发油含量比非道地苍术药材低, 其主要成分为苍术酮和苍术素, 且苍术素、苍术酮、-桉叶醇及茅术醇呈现出一种特定的配比关系; 而非道地苍术挥发油的主要成分为茅术醇和-桉叶醇^[4]。郭兰萍等研究认为, 茅苍术道地药材的形成具有逆境效应, 道地产区特定的生态条件是其形成的重要因素^[5]。薛焱等研究结果表明, 不同薯蓣皂苷元含量的盾叶薯蓣样品间遗传差异与形态、地理来源差异没有必然的联系, 但与薯蓣皂苷元量差异具有相关性, 推测盾叶薯蓣的遗传基础可能对薯蓣皂苷元的形成和积累有显著的影响^[6]。张国防等研究发现, 不同樟树单株间的亲缘关系主要取决于其叶精油的主要化学成分类型, 但也与主成分的含量相关, 表现出含量相近的趋同性, 利用 RAPD 技术可以对樟树叶精油主成分含量高株进行筛选^[7]。笔者拟对同一生境下的 100 个茅山苍术单株进行苍术素含量测定, 从中选出苍术素高含量单株和低含量单株进行 RAPD 分析, 以期找到鉴别苍术素高含量株与低含量株的方法, 为筛选高含量苍术素株苗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 2006 年 4 月, 在茅山地区汤山境内, 于同一生境

下随机采集 100 株茅苍术单株, 经准确鉴定, 凭证标本存于江苏省中科院植物研究所。将根茎洗净, 称重, 30℃ 烘箱烘干。新鲜叶片用于总 DNA 提取, 备用。

1.2 方 法

1.2.1 茅苍术-苍术素相关性研究试验体系的建立。 将 100 个茅苍术样品的苍术素含量进行比较^[8], 从中选出 3 个高含量株与 3 个低含量株, 将其总 DNA 用于茅苍术-苍术素相关性 RAPD 研究。

1.2.2 茅苍术-苍术素相关性 RAPD 研究。

(1) 总 DNA 的提取、纯化和检测。参照 Paterson 等^[9] CTAB 法提取植物总 DNA。提取的 DNA 用北京莱博生物实验材料研究所生产的 DNA 纯化回收试剂盒纯化后, 溶解于灭菌双蒸水中, -20℃ 贮藏, 备用。

纯化后的 DNA 在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳 40 min 后, 在紫外灯下判断 DNA 浓度。

(2) RAPD 筛选。在进行 RAPD 引物筛选时, 采用群体分组混合分析法 (BSA 法)^[10] 将苍术素高含量株与低含量单株 DNA 分别进行等量混合, 建立高含量株系 DNA 池 (DNA pool) 和低含量株系 DNA 池。所用 RAPD 引物由上海英骏公司合成。PCR 扩增反应在 PE-9600 PCR 扩增仪上进行, 反应体系总体积为 20.0 μl, 其中包括 2.0 μl 10×PCR buffer, 2.0 μl 25 mmol/L MgCl₂, 1U Taq DNA 聚合酶, 约 30 ng DNA 模板, 0.8 μl 10 μmol/L 引物, 0.3 μl 10 mmol/L dNTPs。

扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 38℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 40 个循环; 最后 72℃ 保温 5 min, 4℃ 保存。PCR 产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳 1.5 h, 溴化乙锭 (EB) 染色, 凝胶成像系统拍照。

2 结果与分析

2.1 苍术素含量测定结果及茅苍术-苍术素相关性 RAPD 试验体系确立结果 试验结果表明, 100 个茅苍术单株根茎

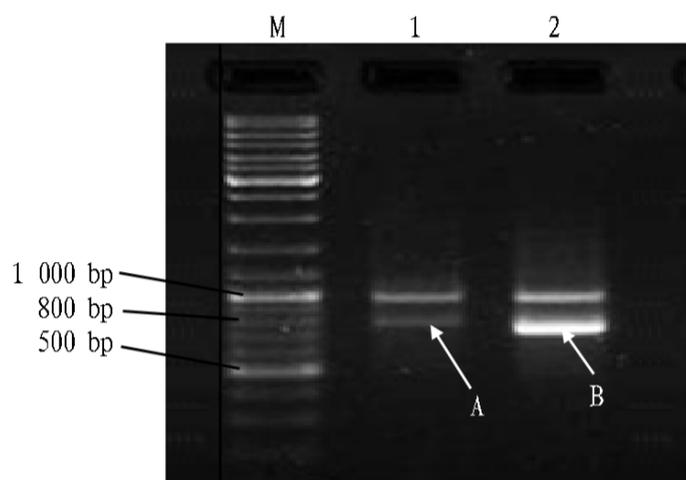
基金项目 江苏省自然科学基金重点项目 (BK2005206); 江苏省道地药材种质资源库建设项目 (BM2006104) 资助。

作者简介 韦阳连 (1983-), 女, 广西壮族自治区河池人, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物分子鉴别。* 通讯作者, E-mail: wubaocheng2015@163.com。

收稿日期 2008-06-06

中苍术素含量的平均值为0.233%^[8]。按照苍术素含量高低排列后,在两端分别选出3个高含量单株(苍术素含量分别为0.496%、0.464%和0.454%)和3个低含量单株(苍术素含量分别为0.042%、0.046%和0.049%)来进行茅苍术-苍术素相关性RAPD研究。

2.2 RAPD 筛选结果 经132个RAPD引物进行PCR扩增后,在RAPD引物B16(5'-TTTGCCCGGA-3')的扩增图谱中找到了高含量株系和低含量株系各自的特异性条带,高含量株系特异性条带的长度比低含量株系的稍长,约800 bp(图1);另外在引物F15(5'-CCAGTACTCC-3')的扩增图谱中又找到低含量株系的另一特异性条带,长约600 bp(图2)。用这2条引物分别对3个高含量单株和3个低含量单株进行扩增,结果表明,高含量株系的特异性条带只在高含量单株中存在,低

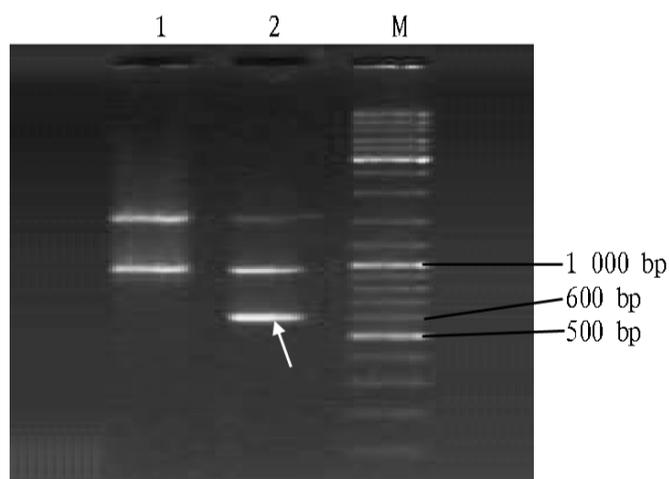


注:M为100 bp ladder DNA 分子量标记;1 为高含量苍术素 DNA 池;2 为低含量苍术素 DNA 池;图2 同。箭头 A 所示为高含量苍术素 DNA 池的特有带;箭头 B 所示为低含量苍术素 DNA 池的特有带。

Note :M.100 bp ladder DNA marker ;Lane 1 .DNA pool for high content of atractylodin ;Lane 2 .DNA pool for low content of atractylodin ; Arrow A shows the specific band of DNA pool for high content of atractylodin . Arrow B shows the specific band of DNA pool for low content of atractylodin .

图1 引物 B16 扩增得到的苍术素高含量 DNA 池和低含量 DNA 池 RAPD 指纹图谱

Fig.1 Amplification products generated by RAPD primer B16 in the DNA pools for high content and low content of atractylodin



注:箭头所示为低含量苍术素 DNA 池的特有带。

Note :Arrow shows the specific band of DNA pool for low content of atractylodin .

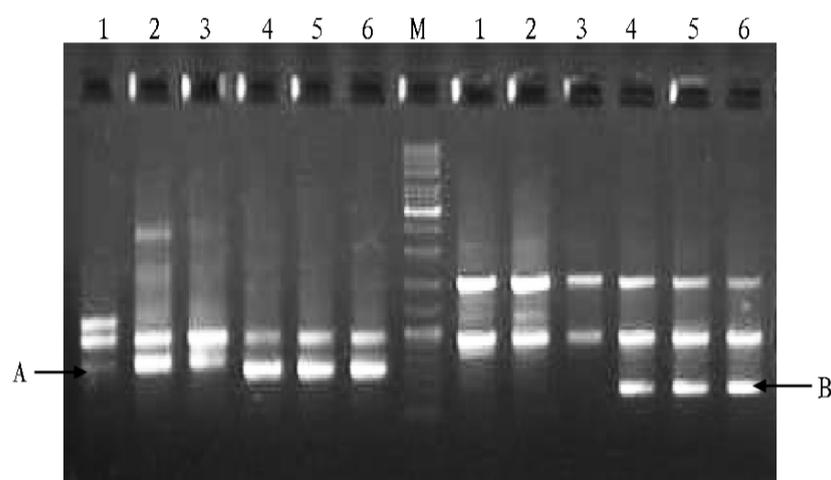
图2 引物 F15 扩增得到的苍术素高含量 DNA 池和低含量 DNA 池 RAPD 指纹图谱

Fig.2 Amplification products generated by RAPD primer F15 in the DNA pools for high content and low content of atractylodin

含量株系的特异性条带只在低含量单株中存在(图3)。

3 讨论

3.1 遗传因子与化学成分相关性研究中试验材料和方法的选择 在大力发展中药现代化的当代社会,药材化学组分与其遗传因子的相关性研究日益受到人们的关注。为了科学研究药材化学组分与其遗传因子的相关性,在试验中应排除或尽可能降低环境因子的影响。刘玉萍等对不同产地广藿香的化学成分与其遗传因子的相关性进行了研究,认为不同产地广藿香化学型的差异在本质上是其遗传变异造成的^[11],但由于研究的试验材料来源于不同产地,其环境背景不一致,研究结果未能排除环境因素的影响。为了最大限度降低环境因素的影响,该研究在同一生境下进行试验材料的选取,以保证所得苍术-苍术素相关鉴别标记的科学性。



注:M为100 bp ladder DNA 分子量标记;1~3 为苍术素高含量单株;4~6 为苍术素低含量单株;M 左边为引物 B16 的扩增图谱,M 右边为引物 F15 的扩增图谱;箭头 A 所示为与苍术素高含量相关的特异性条带;箭头 B 所示为与苍术素低含量相关的特异性条带。

Note :M.100 bp ladder DNA marker ;Lane 1-3.Individuals with high content of atractylodin ;Lane 4-6 .Individuals with low content of atractylodin ;The left of M is the amplification products by primer B16 ;The right of M is the amplification products by primer F15 ; Arrow A shows the specific band relating to high content of atractylodin . Arrow B shows the specific band relating to low content of atractylodin .

图3 引物 B16 和 F15 分别对3个高含量单株和3个低含量单株扩增的指纹图谱

Fig.3 Amplification products of the DNA of 3 individuals with high content of atractylodin and 3 low content ones generated by primers B16 and F15

同种植物不同个体间的差异比属间种间差异小,因此在同种不同个体间进行研究时要选择合适的技术方法。蔡朝晖等利用5S rRNA 基因间区对3个产地单体生物碱含量不同的浙贝母进行比较,发现3个产地浙贝母的5S rRNA 基因间区序列完全相同,由此推测浙贝母中单体生物碱含量的差异可能是由局部环境因素引起的,与其遗传因素无关^[12]。据文献报道,5S rRNA 基因间区比高度保守的5S rRNA 基因进化速度快,它在不同的种间甚至在种内都会有差别^[13-16],一般多用于物种阶元的遗传关系分析。但不同植物类群的5S rRNA 基因间区进化速率不一样,有些物种的5S rRNA 基因间区在种内差异很小甚至没有^[17],因此,该片段不适用于不同单体生物碱含量的浙贝母之间的相关性研究。RAPD 技术是用长度只有10个碱基的随机引物对DNA模板进行扩增,

灵敏度极高,其揭示DNA多态性的能力远高于RFLP和目前常用的DNA序列,是检测种内个体间遗传差异常用的技术手段之一。薛焱^[6]、张国防^[7]及笔者的试验结果表明,RAPD技术适用于遗传因子与化学成分相关性研究。

3.2 BSA法在化学成分含量相关性研究中的应用 BSA法是作物育种研究中快速获得与质量性状基因连锁的分子标记的有效方法,利用BSA法,人们已成功标记和定位了水稻抗稻瘟病基因、水稻抗瘦螺基因和莴苣抗霜霉病基因等^[18]。与质量性状不同,中药材中各化学成分的含量属数量性状,它受多基因控制,表现为连续变异,其表现型与基因型之间没有明确的对应关系,但如果淘汰掉中间类型,将高值和低值(接近零值或零值)2种极端表型用BSA法分成2组,从某种意义上就可以将它们视为2个不同的质量性状,从而可以将它们明确地区分开来。按照BSA法将高值和低值2组个体的DNA分别混合,形成2个DNA池,2个DNA池间差异相当于两近等基因系基因组之间的差异,仅在目标区域上不同,而整个遗传背景是相同的,即这是一对近等基因DNA池。因此,在这2个DNA池间表现出多态性的DNA标记,就有可能与目标基因连锁^[18]。该研究根据苍术素含量高低,利用BSA法对100个苍术单株中的苍术素3个高含量株和3个低含量单株进行分组处理并进行RAPD研究,成功找到了与苍术素高含量株或低含量株相关的分子标记。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 第1部M. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 林焜, 石铸. 中国植物志. 第78卷(第1分册)M. 北京: 科学出版社, 1987: 23-28.
- [3] 朱晓琴, 贺善安. 不同产地苍术药材化学成分的比较J. 植物资源与

(上接第10367页)

PCR扩增式样,容易得到引物二聚体,相反模板浓度过高则会影响重复性^[14],容易得到非特异性扩增。最佳的模板浓度范围取决于研究的类群与模板纯度,特别是在模板不纯的情况下,宁可使用有效浓度范围内的最低极限,使抑制Taq酶活性因子的影响降到最小^[12]。考虑到模板过少,分子碰撞的机率低,偶然性大,影响扩增产物的稳定性;模板过多,又会降低特异性扩增效率,增加非特异性产物。通过浓度梯度试验,考虑节约用量和高浓度所带来的不利因素,最终笔者将白木香ISSR-PCR扩增的模板用量定为4 ng/μl。

dNTP是PCR反应的原料。4种dNTP常用的浓度为50~200 μmol/L。该研究表明,过高或过低浓度的dNTP都会使得PCR产物模糊不清。究其原因可能是浓度太高容易产生错配,同时与Taq酶竞争Mg²⁺,使Taq酶不能充分发挥聚合活性,导致扩增失败;浓度太低则使得扩增产率低,甚至会因为dNTP的过早消耗而使产物单链化^[15]。所以,筛选比较适合的dNTP浓度至关重要。

参考文献

- [1] 国家环境保护局,中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危保护植物名

- 环境,1994,3(4):18-22.
- [4] 郭兰萍,刘俊英,吉力,等. 茅苍术道地药材的挥发油组成特征分析[J]. 中国中药杂志,2002,27(11):814-819.
- [5] 郭兰萍,黄璐琦,阎洪,等. 基于地理信息系统的苍术道地药材气候生态特征研究J. 中国中药杂志,2005,30(8):565-569.
- [6] 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.
- [7] 张国防,陈存及. 不同化学型樟树的RAPD分析J. 植物资源与环境学报,2007,16(2):17-21.
- [8] 吴宝成,韦阳连,高兴,等. 茅山苍术挥发油组分特征及与根茎产量相关性研究C//中国植物学会植物结构与生殖生物学专业委员会,江苏省植物学会2007年学术年会学术报告及研究论文集,2007.
- [9] PATERSON A H, BRUBAKER C L, WENDEL J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. *Hort Mol Bo Rep*, 1993, 11(3): 122-127.
- [10] MICHELMORE R W. Identification of markers linked to disease-resistance gene by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific regions by using segregating population[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828-9832.
- [11] 刘玉萍,罗集鹏. 广藿香的基因序列与挥发油化学型的相关性分析[J]. 药学学报,2002,37(4):304-308.
- [12] 蔡朝晖,李萍,李松林,等. 不同产地浙贝母的基因序列及生物碱含量比较J. 中药材,2001,24(3):157-159.
- [13] VERA H, DAGMAR W. Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Mithida incana*) [J]. *Gene*, 1988, 62: 165-169.
- [14] GOLDSBROUGH P B, ELIIS T H N, LOMONOSOFF G P. Sequence variation and methylation of the Hax 5S rRNA genes[J]. *Nucl Acids Res*, 1982, 10: 4501-4514.
- [15] GANAL M, HEMLEBEN V. Comparison of ribosomal RNA genes in four closely related cucurbitaceae[J]. *Hort Syst Evol*, 1986, 154: 63-77.
- [16] SASITHI K C. An overview of evolution in plant 5S DNA[J]. *Hort Syst Evol*, 1992, 183: 169-176.
- [17] MIZUKAMI H, HAO B S, TANAKA T. Nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacer region in *Angelica acutiloba* [J]. *Natural Medicines*, 1997, 51(4): 376-378.
- [18] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物DNA标记辅助育种M. 北京: 科学出版社, 2002: 38-39.

- 录第一册[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [2] 广东省植物研究所. 初步揭示沉香结香的秘密J. 植物学报, 1976, 18(4): 287-291.
- [3] 严小青, 惠富平. 古代岭南地区土沉香的生产及其社会影响J. 史学月刊, 2007(4): 122-124.
- [4] 傅立国. 中国植物红皮书——稀有濒危植物M. 北京: 科学出版社, 1992: 670-671.
- [5] 汪松, 谢焱. 中国物种红色名录M. 北京: 中国高等教育出版社, 2004: 369.
- [6] 刘军民, 徐鸿华. 国产沉香研究进展J. 中药材, 2005, 28(7): 627-632.
- [7] 杨峻山, 王玉兰, 苏亚伦. 国产沉香化学成分的研究J. 药学学报, 1990, 25(3): 186-190.
- [8] 叶勤法, 戚树源, 林立东. 白木香组织培养及快速繁殖J. 植物学通报, 1997, 14(S): 60-63.
- [9] 申彦晶, 谭雪梅, 赵, 等. 白木香的遗传差异及ISSR分子鉴定J. 解放军药学学报, 2008, 24(1): 1-4.
- [10] 赵树进. 白木香基因组DNA提取方法研究J. 河南工业大学学报, 2006, 27(3): 13-16.
- [11] 林万明. PCR操作技术与应用指南M. 北京: 人民医学出版社, 1993: 7-14.
- [12] 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.
- [13] 张志红, 谈凤笑, 何航航, 等. 红树植物海漆ISSR条件的优化J. 中山大学学报: 自然科学版, 2004, 43(2): 63-66.
- [14] WEISING K, NYBOM H, WOLFF K, et al. DNA fingerprinting in plants and fungi[M]. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995.
- [15] 王建波. ISSR分子标记及其在植物遗传学研究中的应用J. 遗传, 2002, 24(5): 613-616.