

# 川白芷种质的 RAPD 遗传标记研究\*

□马逾英\*\* 熊英 贾敏如  
唐声武 王梦月 蒋桂华

(成都中医药大学 成都 610075)

**摘要:**目的:对川白芷生长过程中不同形态的4个类群及杭白芷进行基因组DNA多态性分析,试图从分子水平为其栽培及种质鉴定提供依据。方法:以40个10碱基随机引物进行RAPD分析。结果:共扩增出314个条带,其中多态性条带96条,占31%。结论:川白芷叶柄颜色的不同与是否抽薹无明显的相关性,而产地的差异对遗传变异的影响大于因其叶柄颜色不同所造成的影响。

**关键词:**川白芷 RAPD 聚类分析 多态性

白芷 (*Radix Angelicae dahuricae*) 为常用中药,具有散风除湿、通窍止痛、消肿排脓的功效。全国主流商品白芷按产地分为祁白芷(产于河北)、禹白芷(产于河南)、杭白芷(产于浙江)和川白芷(产于四川),均为栽培的伞形科当归属植物的根。川白芷是著名的川产道地药材,产量约占全国商品白芷的70%,质量上乘,畅销国内外<sup>[1]</sup>。关于白芷的分类历来争议较多,现多认为川、杭白芷为白芷的变种(*Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *for-*

*mosana* (Boiss.) Shan et Yuan.)。黄璐琦<sup>[2]</sup>等对兴安白芷、祁白芷、杭白芷进行了RAPD分析,认为祁、杭白芷应属同一类群,与野生白芷有一定区别。据报道<sup>[3-6]</sup>和深入产区实地调查,在白芷生长过程中,早期抽薹率达10%~30%,早期抽薹的白芷习称“公白芷”,用公白芷种子繁殖的下一代更易发生早期抽薹的现象,影响白芷的产量和质量;并认为在白芷的生长过程中,其叶柄颜色(青或紫)与是否早期抽薹有一定的关系。目前大田生产中多为紫色叶柄的白芷,认为紫色叶柄的植株不易抽薹,而在定苗时就应将生

长过旺、叶柄呈青白色的大苗拔除,以防止提早抽薹开花。为配合川白芷生产质量管理规范(GAP)的研究及基地建设,我们采用RAPD技术对川白芷栽培过程中出现的青柄、紫柄、过渡类型(半青半紫或青紫夹杂)的植株及公白芷进行研究,旨在找出其表现型与基因型之间的关系,为良种选育与质量评价提供依据。

## 一、材料和仪器

### 1. 材料

川白芷植株于2002年7月分别采自四川遂宁不同白芷基地;杭白芷植株于2002年9月采自成

收稿日期:2003-09-22

修回日期:2003-11-20

\* 四川省科技厅资助项目(川科农[2001]22号):川白芷的规范化种植研究及基地建设,负责人:贾敏如。

\*\* 联系人:马逾英,副教授,从事中药品种质量研究与资源开发工作, Tel: 028-87786511, E-mail: ma-yuying@sohu.com

76 [ *World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica* ]

表 1 实验材料

编号	类型	来源
1	公白芷	四川遂宁市南强镇三洲村
2	公白芷	四川遂宁市永兴镇钟灵寺村
3	公白芷	四川遂宁市永兴镇中脊村
4	过渡类型	四川遂宁市南强镇三洲村
5	过渡类型	四川遂宁市永兴镇钟灵寺村
6	紫杆白芷	四川遂宁市南强镇三洲村
7	紫杆白芷	四川遂宁市永兴镇钟灵寺村
8	紫杆白芷	四川遂宁市永兴镇中脊村
9	青杆白芷	四川遂宁市南强镇三洲村
10	青杆白芷	四川遂宁市永兴镇钟灵寺村
11	杭白芷	浙江磐安的种子栽于成都中医药大学植物园

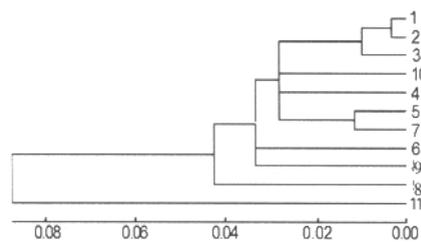


图 2 11 个白芷样品的 RAPD 聚类树状图

都中医药大学植物园,其栽培用种子为作者于 2001 年 8 月自浙江磐安购得。上述材料均由作者鉴定为 *A. dahurica* (Fisch.) Benth. et Hook. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan.。取各材料的新鲜幼嫩的叶子,用液氮处理后,编号,置于  $-70^{\circ}\text{C}$  备用。见表 1

## 2. 仪器和试剂

PCR 仪 (PTC-100™ MJ RESEARCH, INC 美国); Bio Imaging System (GENE GENIUS 美国); LBK ultrospec 紫外分光光度计 (Pharmacia 公司); DDY-III 型电泳仪; dNTPs、RnaseA (TaKaRa 公司); TaqDNA 聚合酶、10mer 引物 (赛百盛基因技术公司),其余试剂为分

析纯。  
 100mg,加入液氮研碎,迅速加入 DNA 提取缓冲液 ( $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCL pH8.0,  $50\text{mMEDTA}$ ,  $0.5\%$  SDS,  $0.2\%$   $\beta$ -巯基乙醇),混匀,于  $56^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min (其间轻轻地上下颠倒 2~3 次),然后加入等体积的苯酚-氯仿 (1:1) 提取 15 min,再在  $5000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  冷冻离心 15 min,上清液加入等体积的苯酚-氯仿 (1:1) 重复抽提 1 次,同样条件离心后,取上清液加入 1/10 体积的  $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的醋酸钠和 2 倍体积的冷无水乙醇 ( $-20^{\circ}\text{C}$  以下),沉淀 15 min 后,  $14000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  冷冻离心 15min,弃上清液,用 70% 的乙醇洗两次,沉淀自然风干后,用无菌双蒸水  $100\mu\text{l}$  溶解,溶液加入 Rnase A 液  $5\mu\text{l}$ ,水浴 30min,用分光光度计测定 DNA 浓度,在  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

## 2. PCR 扩增

扩增反应液的总体积为  $25\mu\text{l}$ ,其中引物为  $1\mu\text{K}$  ( $20\text{pmol}/\mu\text{l}$ ), dNTP (each  $2.5\text{mM}$ )  $2\mu\text{l}$ , Taq 酶

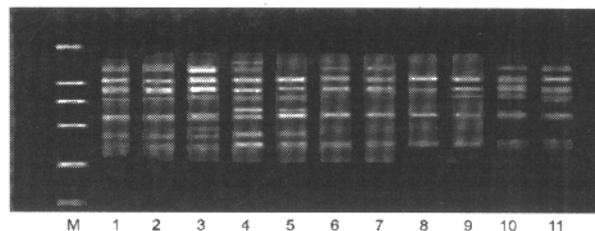


图 1 7 号引物 RAPD 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

析纯。

## 二、实验方法

### 1. DNA 提取和浓度测定

#### 取样品各

$0.2\mu\text{K}$  ( $5\mu/\mu\text{l}$ ), 模板 DNA  $0.25\mu\text{l}$  ( $100\text{ng}/\mu\text{l}$ ), ddH<sub>2</sub>O  $19.05\mu\text{l}$ 。PCR 循环参数:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30s,  $38^{\circ}\text{C}$  退火 45s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1min, 35 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  保温 10min  $4^{\circ}\text{C}$ 。取扩增产物  $5\mu\text{l}$  在含 EB 的 1% 琼脂糖凝胶,  $1\times$  TBE 缓冲液中电泳,用凝胶成像系统观察照相 (图 1)。

### 3. 数据分析

对不同的个体所扩增 DNA 条带量化为 1 或 0 (条带存在为 1, 条带不存在为 0),在相同条件下,迁移相同的条带视为同源位点,统计的二元数据用 Philip 的 RAPD 聚类软件分析,得到各样品间的遗传距离 (表 2) 和聚类树状图 (图 2)。

## 三、结果与讨论

1. 从筛选出的 40 个 10 碱基随机引物 (表 2) 共扩增出 314 条带,其中多态性条带 96 条,占 31%

这表明,供试白芷样品之间的遗传多样性较低。

2. 由遗传距离可知,杭白芷、川白芷间的遗传距离 ( $0.147\sim 0.217$ ) 大于川白芷栽培居群间及居群内各个体间的遗传距离 ( $0.006\sim 0.129$ )

过渡类型叶柄植株间的遗传距离为  $0.080$ ;紫色叶柄植株间的

表 2 11 个白芷样品间的遗传距离

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.000										
2	0.006										
3	0.019	0.019									
4	0.080	0.086	0.080								
5	0.032	0.039	0.032	0.080							
6	0.066	0.073	0.066	0.107	0.052						
7	0.049	0.056	0.049	0.090	0.023	0.062					
8	0.093	0.100	0.093	0.129	0.073	0.086	0.062				
9	0.069	0.076	0.069	0.097	0.056	0.062	0.046	0.042			
10	0.062	0.056	0.056	0.118	0.062	0.097	0.073	0.090	0.059		
11	0.185	0.193	0.193	0.216	0.162	0.155	0.158	0.147	0.151	0.189	0.000

表 3 40 个随机引物的扩增结果

编号	引物序列	总条带(多态性条带)	编号	引物序列	总条带(多态性条带)
1	GGTCGGAGAA	11(6)	21	TTCGAGCCAG	7(2)
2	TCGGACGTGA	11(4)	22	GTGAGGCGTC	4(0)
3	AGACGTCCAC	10(6)	23	CATCCCCCTG	8(0)
4	GGAAGTCGCC	6(2)	24	CCGCATCTAC	10(3)
5	AGTCGTCCCC	8(4)	25	GATGACCGCC	7(4)
6	ACGCATCGCA	5(2)	26	GAACGGACTC	8(1)
7	CTGCATCGTG	12(2)	27	GTCCCCGACGA	5(1)
8	GAAACACCCC	9(3)	28	TGGACCGGTG	6(0)
9	TGTAGCTGGG	9(2)	29	CTCACCGTCC	12(3)
10	CCTACGTCAG	2(1)	30	TGTCATCCCC	10(3)
11	CTTCCGCACT	5(0)	31	AAGCCTCGTC	10(1)
12	ACGCGCATGT	15(3)	32	TGCGTGCTTG	6(4)
13	GACGCCACAC	4(1)	33	GACGGATCAG	10(4)
14	ACCAGGTTGG	6(3)	34	CACACTCCAG	6(5)
15	AATGGCGCAG	13(0)	35	TTCCCCCAG	7(0)
16	TCTCAGCTGG	5(1)	36	TGAGTGGGTG	10(0)
17	CACTCTCCTC	12(0)	37	GTTGCCAGCC	7(5)
18	GAATCGGCCA	8(1)	38	ACTTCGCCAC	5(0)
19	CTGACCAGCC	10(3)	39	GCCACCAACC	7(4)
20	GGGAGACATC	9(5)	40	GGACTTACAT	7(7)

遗传距离为 0.062 ~ 0.086，青色叶柄植株间的遗传距离为 0.059，3 种不同颜色叶柄植株间的遗传距离为 0.062 ~ 0.129；产于钟灵

寺村的植株间的遗传距离为 0.023 ~ 0.073，产于三洲村的植株间的遗传距离为 0.062 ~ 0.107；不同产地间的植株遗传距

离为 0.006 ~ 0.129。由此表明，不同叶柄类型遗传差异大于同一叶柄颜色内的遗传差异。不同产地居群，由于人工选择和环境因子作用的影响，其居群内的遗传纯化程度不一样，表现出明显的不同居群的遗传特性差异。以产地居群而言，产于三洲村居群的遗传差异性较大。

3. 根据 RAPD 带谱的聚类分析表明，基本上聚为二类，即川、杭白芷

由于二者的分布区域相距较远，气候、土壤等地理环境相差较大，在一定程度上已产生了遗传分化，说明产地的差异对遗传变异的影响大于因叶柄颜色、抽薹与否产生的影响。当截距取 0.03 左右时，川白芷不同产地，不同叶柄类型的 5、7、4、10、1、2、3 均聚为一类，无法将不同产地，不同叶柄类型区分开。当截距取 0.01 时，1、2、3、号公白芷聚为一类，三者相似性高，表明公白芷具有共同的遗传基础，初步证明了用公白芷的种子繁殖的下一代更易发生早期抽薹，白芷抽薹特性主要是由遗传因素决

定的；白芷叶柄颜色（青或紫、过渡类型）与抽薹无明显的相关性。

4. 据申明亮等认为，白芷为

### 自交不孕,是异质杂合的群体

生产中白芷主要是通过种子繁殖。因此,在白芷群体中,植株多为杂合植株,个体差异大。由上述聚类分析和遗传距离分析也说明同一群体不同植株间存在很大的遗传差异,证实了上述观点。由遗传距离分析得知,不同叶柄类型植株间遗传距离差异大,表明不同叶柄类型植株间存在遗传差异。由于本实验所用引物较少,未有

效筛选出不同叶柄颜色间的差异扩增引物,有待深入研究,探寻叶色的遗传差异的物质基础。

致谢 四川大学生命科学院李云峰博士、唐琳老师及莫敏同学等协助工作。

### 参考文献

- 1 王梦月,熊英,贾敏如等. 白芷的产销概况. 华西药学杂志,2002,17(4):305.
- 2 黄璐琦,王敏,付桂芳等. 中药白芷种质资

源的 RAPD 分析. 中国中药杂志,1999,24(8):457.

- 3 罗光明,肖宏浩,刘能俊. 白芷的栽培技术. 中国野生植物资源,1996,(2):40.
- 4 杨富荣,杨海莹,郭敦志. 白芷早薹及防止方法初探. 中药材,2000,24(10):708.
- 5 申明亮,卢进,陈兴福,等. 早期抽薹白芷的遗传性观察. 中草药,2000,31(增刊):163.
- 6 彭菲. 白芷独活. 北京:中国中医药出版社,2001. 15.

(责任编辑:刘维杰)

## 欢迎参加中医药及天然药物国际交流与合作考察团访问澳大利亚、新西兰

澳大利亚自 2000 年通过中医药立法 (Chinese Medicine Re-givstration ACT 2000) 至今,已为我国中药产品及中医药领域的一些高校、研究机构和医院在发展各自的海外教育产业、开办诊疗机构及开展临床科研方面提供了广阔的合作空间。由于澳大利亚属于英联邦国家之一,该国也是中医药通往其它英联邦国家乃至整个欧洲和北美国家的大门,我国中药产品一旦进入澳洲市场,一般较容易通往上述其它国家。因此,澳大利亚是我国中医药全面走向西方社会的一个重要的战略通道。为了帮助我国相关领域企、事业单位的高层管理人员深入了解澳大利亚和新西兰中医药发展情况,充分利用自己的产品、资源与优势,在药品注册与营销、教育产业、诊疗服务产业、临床实验研究等方面的国际交流与合作中寻找商机与对策,探讨相应的经营管理模式,中国高技术产业发展促进会拟于 2004 年组织该领域的高校、科研、企业、医院、相关管理部门的人员赴澳大利亚、新西兰访问。

### 一、出访日期与考察地点:

1. 出访时间:拟定 2004 年 7~8 月境外时间为 15 天;2. 考察地点:澳大利亚(墨尔本、布里斯班、悉尼、堪培拉等)。新西兰(奥克兰、奥玛拉玛、基督城等)。

二、考察范围:1. 考察澳洲的药品注册与管理机构、有关法律文献及补充医学产业的发展前景,寻找我国中医药的发展商机与对策;2. 考察中国产品在澳、新的注册、通关和流通情况,以及其它英联邦国家有关药品的通关情况;3. 访问澳洲著名教育机构,了解其教育体系中中医药学科的建设进展、基础设施建设,探讨我国教育产业拓展、开展远程教育及学术交流的可能性;4. 访问有关医疗机构,考察其医政管理体系、诊疗与临床实验研究体系,探讨

进一步交流与合作的可能性。

联系人:刘萍

通信地址:北京 872 信箱 中国高技术产业发展促进会

邮政编码:100080 电话:010-62616352 010-62652762

传真:010-62652762 E-mail:wst@mail.casipm.ac.cn

## 欢迎参加天然药物产业及生物技术应用考察团访问西欧

为了帮助我国企业、研究机构和相关主管部门,学习和引进国外医药领域先进的技术、工艺装备及管理经验,及时了解和借鉴国外前沿学科的发展趋势及其研究方法,提高技术创新能力和经营管理水平。中国高技术产业发展促进会拟于 2003 年组织一次,2004 年组织一次天然药物与生物技术领域的企业、科研与管理部门人员进行出国学习和考察:

一、出访日期与考察地点:1. 出访时间:拟定 2004 年 7~8 月,境外时间 15 天;拟定于 2004 年 7-8 月,境外 15 天;2. 考察地点:西欧七国;

二、考察范围:1. 考察西欧重点研究机构中的天然产物有效活性成分的分离纯化技术和相关装备;2. 访问著名高校与医药研究机构,了解生物技术在医药领域的研究与应用情况;3. 考察医药公司 GMP 等相关管理规范及管理经验;4. 了解国际对于天然药物生产、经销的管理法规和天然药物贸易体系。

联系人:张志华、刘萍 E-mail:wst@mail.casipm.ac.cn

通信地址:北京 8712 信箱 中国高技术产业发展促进会

邮政编码:100080 电话:010-62616352,010-62652762

传真:010-62652762

(*Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094*)

The fundamental research of modernization of the cultivation of Chinese medicinal herbes should be deeply carried out in the following areas: (1) the selection and breeding and the conservation of germplasm resources of medicinal herbes, (2) the relationship between the method of cultivation and the field management of medicinal herbes and the content of their effective components, (3) measures of preventing and controlling plant diseases and insect pests which are able to ensure that either diseases and pests can be controlled or the pesticide residues of medicinal herbes do not exceed their set standards, (4) the impact of the application of agricultural chemicals on the growth and effective components of medicinal herbes, (5) the relationship between large quantities of various nutrients and trace elements to be applied to medicinal herbes and the trends of the growth and the accumulation of effective components of medicinal herbes, (6) continuous cropping, (7) the control of external harmful substances, and (8) the exploitation of new modes and channels of production of Chinese medicinal materials.

**Key Words:** Chinese medicinal herbes, cultivation, modernization

**Study on RAPD Genetic Markers of Germenplasm of Radix Angelicae Dahuricae**

*Ma Yuying, Xiong Ying, Jia Minru, Tang Shengwu, Wang Mengyue and Jiang Guihua*

(*Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075*)

**Objective:** To analyze DNA polymorphism of the genomes of four populations with different forms of Radix Angelicae dahuricae in growth, trying to provide a basis for their cultivation and germenplasm identification at the molecular level. **Method:** To analyze RAPD by 40 random primers of 10 basic groups. **Result:** 314 bands have emerged, of which 96 are of polymorphism, accounting for 31%. **Conclusion:** There is no marked relativity between the difference of colours of the leaf stalks of Radix Angelicae dahuricae and its bolting. The influence of regions in which it grows on its hereditary variation is, however, greater than the influence exerted by the difference of colours of its leaf stalks.

**Key Words:** Radix Angelicae dahuricae, RAPD, cluster analysis, polymorphism

欢迎订阅 2004 年期刊, 欢迎投稿,  
欢迎参加交流与讨论。