

桔梗栽培及野生种质遗传多样性的 RAPD 分析*

□魏建和** 杨成民 陈士林 程惠珍

(中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100094)
(中国协和医科大学)

黄璐琦** (中国中医科学院中药研究所 北京 100700)

摘要:为了解桔梗栽培种质、野生种质的遗传背景,为桔梗育种及道地药材研究提供依据,采用 RAPD 方法分析了桔梗 20 份栽培种质、3 份野生种质及 5 份遗传材料共 92 个样品的遗传多样性。从 264 个随机引物中筛选出多态性较好的 6 个引物进行全部样品 PCR 扩增,得到多态性条带 58 条。所有种质的多态性位点比率(P)为 66.67%,Nei's 基因多样性指数 Ht 为 0.2099,栽培种质的 Ht 和 P 值 AT>AB>NC>SZ,野生和遗传材料中各份种质的 Ht 和 P 值很低,但总体值仍高;UPGMA 聚类和 SPSS 聚类可以将各种不同来源的种质很好地区分开来。结论:桔梗栽培种质在遗传背景上为混杂群体,纯系材料遗传背景均一,不同栽培产区桔梗种质已出现明显遗传分化。

关键词:桔梗 种质 遗传多样性 RAPD

遗传变异是中药材品种改良的基础,对种质遗传多样性的准确评价可以为亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平预测提供预见性的指导,这是关系到育种目标能否成功实现的关键;遗传多样性度量和保护同样是生物多样性研究的核心问题,也是保护生物学的重要内容。包括 RAPD 在内的 DNA 分子标记是 DNA 水平上遗传多态性的直接反映,已广泛用于植物遗传多样性和亲缘关系研究,近年在药用植物遗传多样性研究中也日趋增多,如银杏^[1]、丹参^[2]、人参^[3]、鱼

腥草^[4]、菊花^[5]、罗汉果^[6]、山药^[7]、红花^[8]等。

桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC)为桔梗科多年生草本植物,是我国销量最大的 40 种传统中药材之一,性平,味苦,辛,具有化痰止咳、利咽开音、宣畅肺气、排脓消痈的功效。我国、日本、韩国作药用,我国东北和韩国还大量食用,欧美、日韩也作为切花等园艺观赏植物^[9-12]。我国桔梗从 20 世纪 70 年代起开始栽培,种植技术已基本成熟,在山东淄博、安徽亳州、太和、内蒙赤峰形成三大道地种植产区。作为观赏植物和切花,国外培育出了 10 余个桔梗新品种^[9-12],韩国选育了药用“白花”桔梗品种^[13]。中国还没有桔梗优良品种,

收稿日期:2005-12-08

修回日期:2006-02-18

* 国家十五科技攻关项目(2004BA721A24):道地药材桔梗种质资源及其评价研究,负责人:魏建和;国家中药材扶持资金专项(2005):黄芩、桔梗品种选育及良种繁育基地建设,负责人:魏建和;北京市科技新星计划(2004A60):A 类,负责人:魏建和。

** 联系人:黄璐琦,本刊编委,研究员,博士生导师,主要研究方向:中药资源及道地药材,010-64014411-2955, huangluqi@263.net;魏建和,副研究员,博士,主要研究方向:药用植物栽培及遗传育种,010-62818841, jhwei@implad.ac.cn。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 37

我们正在选育杂交品种^[14-15],但桔梗栽培群体和野生群体遗传多样性研究还没有报道,为此开展本研究。

一、材料与方法

1. 植物材料

供试材料共 11 种 27 份种质 92 个样品(表 1)。4 种栽培种质来自我国桔梗主要栽培产区安徽亳州和太和、内蒙古、山东,共 20 份;3 种野生种质来自北京、河北承德、山东淄博,共 3 份;4 种育种遗传材料,共 4 份。栽培种质和野生种质以种子形式从各产地收集,播种于中国医学科学院药用植物研究所内。遗传材料来自同一份从安国市场购买的桔梗种子,通过多代自交将原群体中的紫、白、粉花植株纯化为花色不再分离的 3 个花色纯系,花色分离株为原始材料。7~9 月桔梗植株生长旺期采集新鲜叶片用于 DNA 提取。

2. 样本 DNA 的制备

采用 2.5%W/V CTAB (Cetyl trimethyl ammoniumbromide, 十六烷基三甲基溴化胺)法提取新鲜健康嫩叶的总 DNA,并保存于 0.1 倍 TE 中。

3. RAPD-PCR 程序设计与电泳检测扩增产物

(1) RAPD 反应体系。

RAPD 引物和 dNTP 购自上海生工生物工程技术有限公司,Taq 酶购自上海申能博彩科技有限公司。PCR 反应体系共 25 μ L,包括: ddH₂O 14 μ L, 10*buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ (25mM) 2 μ L, dNTP (2.5mM) 2 μ L, Primer (15ng/ μ L) 2.0 μ L, 模板 DNA (2ng/ μ L) 2.0 μ L, TaqE (2.5U/ μ L) 0.5 μ L。

(2) PCR 扩增。

PCR 反应在 Gene Amp PCR SYSTEM 9700 上进行。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性,4min;94 $^{\circ}$ C 变性,30s,35 $^{\circ}$ C,1min,72 $^{\circ}$ C,2min,45 个循环;72 $^{\circ}$ C,10min,整个反应程序约 4h。扩增结束后,用琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,溴化乙锭染色,凝胶成像系统拍照保存。

4. 多态性引物筛选

从北京延庆、山东淄博、安徽亳州/太和、内蒙赤峰种质中各取 1 份 DNA 样品对 264 条 10 碱基随机引物进行了初步筛选,252 条引物扩增出条带,80 条引物扩增出特异性条带,从中选 6 条重复性好、条带清晰的特异性引物(见表 2)对 92 个样品基因组 DNA 扩增。

5. 数据分析方法

对所扩增 DNA 条带量化为 1 或 0(条带存在为 1,条带不存在为 0),在相同实验条件下,迁移率相同的条带视为同源位点。遗传多样性采用两个指标表示:

指标 1:多态性位点比率 P(Percentage of polymorphic loci):多态性位点除以总位点数。

指标 2:Nei's 基因多样性指数(Ht)(或称总基因多样性、平均期望杂合度): $Ht=1-(1/m \sum_i \sum_j \rightarrow m P_{ij}^2)$, P_{ij} 为第 j 个位点的第 i 个等位基因的频率,m 为检测的位点总数。

表 1 供试桔梗种质及其来源

种质类型	原产地/种质背景	代码	种质份数	样品数		样品编号
				混样*	单株*	
栽培种质	安徽亳州	AB	4	4	8	1~12
	安徽太和	AT	4	4	8	13~24
	内蒙古赤峰	NC	8	8	16	25~48
	山东淄博	SZ	4	4	8	49~60
野生种质	北京延庆	BY	1	1	2	61~63
	河北承德	HC	1	-	6	64~69
	山东淄博	SB	1	-	6	70~75
遗传材料	自交白花纯系	PW	1	-	5	76~80
	自交紫花纯系	PP	1	-	5	81~85
	自交粉花纯系	PM	1	-	5	86~90
	原始花色种质	SP	1	-	1	91
		SW	-	-	1	92
合计	11 种		27 份	21 个	71 个	

注:混样:从 1 份种质中取分别取 20 单株叶片剪碎混合后提取 DNA;单株样:只从 1 个单株上取叶片剪碎提取 DNA。

表 2 用于全部桔梗样品 RAPD 扩增的 6 条引物

序号	引物	引物序列	序号	引物	引物序列
1	S52	CACCGTATCC	4	S345	CTCCATGGGG
2	S86	GTGCCTAACC	5	S470	TCCCGCCTAC
3	S332	TCAACGGGAC	6	S1002	CACTTCCGCT

遗传距离(Genetic distance)参考文献^[6]计算: $D=1-2N_{xy}/(N_x+N_y)$,其中 N_{xy} 为两基因型共同拥有的条带数, N_x,N_y 分别为 x 和 y 基因型各自的条带数。利用UPGMA(非加权配对算术平均法,unweighted pair group arithmetic averages method)聚类分析。上述分析采用POPGENE,“0”、“1”数据首先经DCFC软件^[7]进行处理,转化为POPGENE所用文件格式。

对所有单个样品,计算个体的RAPD标记表型值的欧氏距离(Squared euclidean distance),采用SPSS进行聚类分析。

二、结果与分析

1. 桔梗栽培、野生种质及遗传材料的遗传多样性

所有样品扩增条带的分子量为490~3100bp。92个样品共检测到87个位点,58个为多态性位点,占66.67%,Nei's基因多样性指数 $H_t=0.2099$ (表3)。4种栽培种质中AT多态性位点比率(P)最高,占29.89%,随后是AB、NC和SZ,分别为28.74%、28.74%、22.99%,合计47.13%。野生材料P值 $SB>BY>HC$,分别为12.64%、10.34%、6.90%,合计44.83%,比栽培种质遗传多样性略小一些。遗传材料中,PP、PW、PM的PPB分别为17.24%、5.75%、0%,表明经过人工选择后,遗传多样性明显降低,纯合度增加,特别是PM,个体间没有分化,遗传材料的总体P仍为39.08%,表明多态性基因仍然存在,各份遗传材料间遗传背景不同。Nei's基因多样性指数与多态性位点比率大小趋势一致。

2. 桔梗栽培、野生种质及遗传材料的遗传分化

按桔梗种质的来源对11种种质基于Nei's遗传距离,利用UPGMA法对种质进行聚类结果如图1。所有种质92份样品的RAPD表型值聚类结果如图2。图1和图2结果一致。分析样品按照它们的来源分别聚为一类,即按栽培种质、遗传材料和野生种质三大类区分开,在各类种质中,又按产地来源各自聚类。

在栽培种质中,安徽亳州(AB)、太和(AT)的遗传距离最小,部分样品在聚类时有相互交错,这两个地区相距约100km,产地之间种源和商品往来多,遗传距离分析结果很好地反映出这两个产地间种质的遗传背景

相似。山东(SZ)、内蒙(NC)两个北方栽培种质首先聚类,然后与安徽种质聚类,显示出种质间遗传距离与地理距离的关系。

野生种质中,来自河北承德(HC)和山东淄博(SB)的遗传距离较近,北京延庆(BY)野生种质较特殊,与其他两份野生种质的遗传距离较远,而与栽培种质的距离较近,具体原因尚不清楚。遗传材料中,白花纯系(PW)和粉花纯系(PM)、紫花纯系(PP)与原始材料首先聚为一类,反映出白花和粉花的遗传背景更相似,与紫花相对更大一些。

三、讨论

1. 桔梗种质的遗传多样性

研究表明桔梗栽培种质的遗传多样性较丰富(P值均在20%以上),反映出我国目前栽培桔梗种质还是一个混杂群体,存在丰富的变异类型,为了保证桔梗外观和药材品质的均一和稳定,有必要对现有栽培群体进行纯化;另一方面丰富的变异类型为品种选育提供了很好的基因资源,有望从中培育出符合人们需要的优良品种。但各产地种质遗传多样性表现不同,山东淄博桔梗栽培已有40余年历史,种源基本来自本产区,外调种子很少,生产上长期的自然选择,导致山东种质(SZ)的遗传多样性相对较低。而内蒙赤峰(NC)和

表3 桔梗不同种质 RAPD 标记的遗传多样性

材料类型	多态位点数	多态性位点比率%(P)	Nei's基因多样性指数(Ht)
栽培种质	AB	25	28.74
	AT	26	29.89
	NC	25	28.74
	SZ	20	22.99
	小计	41	47.13
野生种质	BY	9	10.34
	HC	6	6.90
	SB	11	12.64
	小计	39	44.83
	遗传材料	PW	5
	PP	15	17.24
	PM	0	0
	SP/SW	9	10.34
	小计	34	39.08
总计	58	66.67	0.2099

安徽太和(NT)等地种植桔梗有 20 余年,较短,同时与全国各地种源互换较频繁,遗传多样性相对较高。

我们对一份桔梗种质进行了人工定向纯化,RAPD 分析表明其遗传多样性已很低,表现为三个遗传纯系材料的多态性位点比率分别为 0%(PM)、5.75%(PW)、17.24%(PP),特别是 PM、PW 纯系,已基本成为纯系遗传材料或有希望培育成为新品种(经济性状良好)。野生桔梗种质 3 个居群(HC、SB、BY)的遗传多样性均很低,这可能与采样数较少有关,但反映出了各个分布区野生桔梗的遗传多样性不高。

2. 桔梗种质间的遗传分化

Tsuyoshi Saeki^[18]采用桔梗皂苷 A、C、D 的含量比例区分了来自中国、韩国和日本的桔梗。我们采用 RAPD 标记可以明显将中国主要栽培桔梗种质区分开来。遗传距离聚类结果表明我国安徽、山东、内蒙三大桔梗栽培主产区的种质已出现了明显的遗传分化,且与我们用于花色遗传纯化的材料,及各份野生种质的遗传背景不同。研究结果揭示出不同桔梗道地产区的种质类型不用,种质可能在不同产区药材品质差异中起到了重要作用。

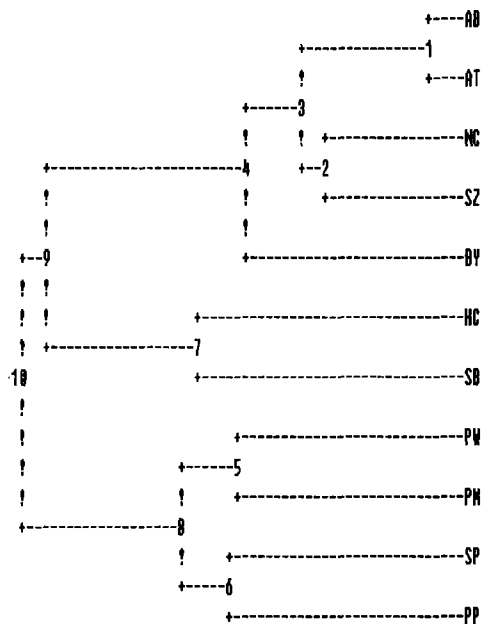


图 2 采用 SPSS 对 92 份桔梗样品的 RAPD 标记表型值的欧几里德距离平方和进行聚类

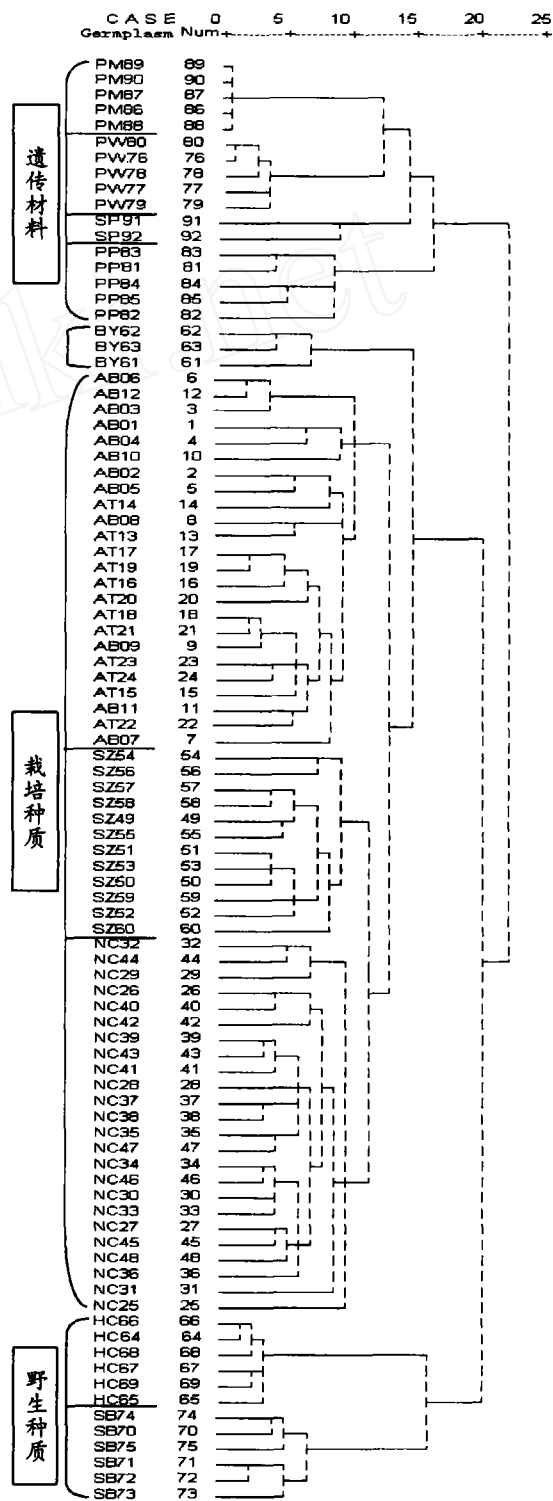


图 1 采用 UPGMA 法基于 Nei's 遗传距离对 11 种桔梗种质进行聚类

参考文献

- 曹福亮,黄敏仁,桂仁意,等.银杏主要栽培品种遗传多样性分析.南京林业大学学报(自然科学版),2005,29(6):1~6.
- 郭宝林,林生,冯毓秀,等.丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究.中草药,2002,33(12):1113~1116.
- 马小军,汪小全,徐昭玺,等.人参不同栽培群体遗传关系的 RAPD 分析.植物学报,2000,42(6):587~590.
- 吴卫,郑有良,陈黎,等.鱼腥草种质资源的 RAPD 分析.药学学报,2002,37(12):986~992.
- 徐文斌,郭巧生,王长林.药用菊花遗传多样性的 RAPD 分析.中国中药杂志,2006,31(1):18~21.
- 周俊亚,唐绍清.栽培罗汉果遗传多样性的 RAPD 分析.分子植物育种,2006,4(1):79~86.
- 周延清,景建洲,李振勇,等.用 ISSR 标记技术分析山药品种遗传多样性.实验生物学报,2005,38(4):324~330.
- 张磊,黄蓓蓓,开国银,等.中国红花遗传多样性的 AFLP 分子标记(英文).药学学报,2006,41(1):91~96.
- Halevy AH, Shlomo E, Ziv O. Improving cut flower production of balloon flower. HortScience, 2002, 37(5):759~761.
- Park BH, Oliveira N, Pearson S. Temperature affects growth and flowering of the balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. cv. Astra Blue). HortScience, 1998, 33(2):233.
- Goi M, Nagayama Y, Hasegawa A, et al. Year-round production of *Platycodon grandiflorum* A. DC. Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagawa University, 1994, 46(2): 87.
- Song CY, Roh MS, Chung SK, et al. Effect of temperature and light on growth and flowering of potted plant production of platycodon. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1993, 34(6):446.
- Kim HT, Seong JD, Kim GS, et al. A new high-yielding and white color balloon flower cultivar, "Jangbaek". Korean Journal of Breeding, 2004, 36(1):69.
- 魏建和,黄璐琦,陈士林,等.桔梗柱头、花粉活力及自交亲和性研究.中国中药杂志,2006,31(5):367~368.
- 魏建和,杨世林,李先恩,等.桔梗不同种质的比较研究—桔梗的杂交及花色、种色的新类型与分离.中草药,2002,33(5):455~458.
- Nei, M., Molecular evolutionary genetics. New York; Columbia Univ. Press, 1987.
- 张富民,葛颂. 2002. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD 数据的 AMOVA 分析. 生物多样性, 10: 438~444.
- Tsuyoshi S, Kazuo K, Tamotsu N. A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the root of *Platycodon grandiflorum* by HPLC analysis. Planta Medica, 1999, 65:428~431.

Analysis of genetic diversity of the cultivation and wild germplasms of *Platycodon grandiflorum* based RAPD markers

Wei Jianhe, Yang Chengmin, Chen Shilin, Cheng Huizhen

(Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences Chinese Peking Union Medical College, Beijing100094, China)

Huang Luqi (Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

To learn the information about the genetic background of the cultivation and wild germplasms of *Platycodon grandiflorum* assisting of its breeding and studies on genuine characteristics, the genetic diversity of 92 samples (including 20 cultivation and 3 wild germplasms, and 5 genetic materials) were analyzed by RAPD markers. 6 primers from 264 were selected and applied to the PCR amplification for all samples and 58 polymorphic bands were found. For all germplasms, the percentage of polymorphic loci (P) was 66.7%, and Nei's gene diversity index (Ht) was 0.2099. The number of P and Ht among cultivation germplasm were AT>AB>NC>SZ, which of each germplasm of wild and genetic materials were small, but of the population were still big. The dendrogram from the Cluster of UPGMA and SPSS of the RAPD genetic distance showed the good classification of all germplasms. The results showed the genetic background of cultivation germplasms of *Platycodon grandiflorum* is diversify, however which of genetic materials is uniform; Genetic differentiation between cultivation germplasm from different areas is obvious.

Keywords: *Platycodon grandiflorum*; germplasm; genetic diversity; RAPD

(责任编辑:郭 屹, 责任编审:果德安, 责任译审:廖永红)

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 41