

DNA 分子标记在药用植物中的应用

温海霞* 蔡家利 邹姝姝

(重庆工学院生物工程系, 重庆 400050)

摘要 对 DNA 分子标记技术在药用植物鉴定、中药质量标准化、遗传图谱构建和近缘物种进化关系等方面的研究进展进行了综述, 并展望了分子标记技术在药用植物研究中的发展前景。

关键词 分子标记; 药用植物; 应用

DNA 分子标记是继形态标记、细胞标记、生化标记之后的一种新的分子遗传标记方法, 它是以 DNA 多态性与性状间的紧密连锁关系为基础的遗传标记, 能够稳定遗传, 且遗传方式比较简单, 是基因型的真实反映, 能在不同发育阶段对不同组织 DNA 进行检测分析。

1 DNA 分子标记研究现状

DNA 分子标记可以根据来源与组成进行不同的分类, 主要有限制性片断长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、随机引物 PCR (AP-PCR)、序列标签位点(STS)、转录内间区(ITS)、微卫星 DNA(SSR)和 DNA 指纹技术(DAF)等。RFLP 是最早采用的分子标记, 是依据不同植物个体来源的 DNA 所形成的不同的谱带模型与低拷贝的 DNA 探针杂交得到 DNA 的限制性片段多态性, 它代表的是基因组 DNA 在限制性内切酶消化后产生的片段在长度上的差异。其结果稳定可靠, 重复性好, 但由于 RFLP 技术操作复杂, 费用高, 易造成污染, 在中药研究中应用较少。RAPD 是分子标记中最简便的一种, 它以 PCR 技术为基础, 只需少量的模板, 遗传变异检出率高, 安全快速, 不需要知道研究对象的序列背景, 具有良好的可操作性和实用性, 已广泛应用于种群间亲源关系、分类和系统发生研究。但由于 RAPD 是显性遗传标记, 不能识别纯合子和杂合子, 无法评估等位基因频率, 因而并不是构建遗传图谱最佳 DNA 标记。但因其方法上快速便捷, 所以应用 RAPD 标记构建遗传图谱已十分普遍。SSR 也称简单串联重复序列, 在所有真核生物基因组中随机分布, 由于重复次数的不同使所在的基因座位呈现一定的多态性。在分子系统学研究中, SSR 可以检测

RFLP 一般不能检测的基因组串联重复序列, 而且多态性高, 操作简单, 速度快, 比 RAPD 具有更好的稳定性和重复性, 克服了 AFLP 标记在基因组中的不均匀性及操作的复杂性。AP-PCR 方法不需要预知序列资料, 而且检测的基因组样本是任意的, 缺点是每个新的多态性都必须经纯化才能进一步使用, 并且在杂合体中只可辨别长度多态性。DAF 是一种改进的 RAPD 分析技术, 与 RAPD 技术不同的是 DAF 分析中所使用的引物浓度更高, 长度更短, 因此它比 RAPD 具有更高的多态性。

由于药材原物种在不同产地的种系与区系的发生发展过程中, 会因遗传、生态、技术等因素的作用而各自形成特异的产物, 表现出种内差异, 一些近缘种种间差异在药材外观形态、组织特征、化学成分等方面的表现往往非常近似。因此, 传统的根据中药形、色、味、质等鉴别手段已经难以适应现代中药的快速发展, 应积极探索准确区分种内居群变异和种群间群体差异性质的方法, 以确保中药材品质的稳定。DNA 分子标记作为基本的遗传分析手段, 较之传统的分析手段具有快速、微量、特异性强的特点; 不受生长发育阶段、供试部位、环境条件的影响, 特别适合近缘品种、破碎药材、腐烂药材及样品有限的植物模式标本、中药出土标本、古化石标本等珍贵样品的鉴定; 多态性强, 不存在表达与否的问题, 遍及整个基因组, 对被测材料的要求不高, 这些优点使 DNA 分子标记在中药鉴定学研究中展示了良好的应用前景。目前, DNA 分子标记主要用在中药鉴别、中药品质与标准化、中药进化关系及分类、基因筛选和构建遗传图谱等

收稿日期: 2004-06-11 接受日期: 2004-12-09

* 通讯作者。Tel: 023-68667792, Fax: 023-68667804, E-mail:

whx@cqit.edu.cn

方面。

2 DNA 分子标记在中药鉴别方面的应用

2.1 在药材道地性鉴定方面的应用

道地药材是指来源于特定区域的优质药材,是遗传物质和生态因子长期相互作用的产物,如四川的黄连,甘肃的当归,宁夏的枸杞等,然而道地药材的遗传学特征及“道地性”的本质至今尚未有充分的科学证据。肖小河^[1]认为道地药材是中药在长期复杂的系统演进过程中形成的最高级、最优化的物质形式,是该药材原物种在其产地的种系与区系的发展过程中,长期受着孕育该物种的历史环境条件与人类活动的影响而形成的特殊产物,表现出不同的生态宗、生态型、地方宗和地理宗等。探索“道地基因”,揭示道地药材的本质,评价其“道地性”生物的遗传多样性是药用植物研究的重点和难点。采用DNA分子标记诊断技术并辅以其他的生物技术,可以从分子水平上揭示药材的“道地性”。李军等^[2]用RAPD方法鉴别出宁夏枸杞与内蒙枸杞的差异,为枸杞道地品种鉴别提供分子水平上的依据。张艳波等^[3]收集了6种枸杞属(*Lycium*)植物,7个正品,4个混淆品种,运用RAPD技术进行分析,获得了枸杞属不同种的特异性DNA指纹图谱,从而将它们准确区别。胡珊梅等^[4]运用RAPD技术,以引物S168鉴别福建、江西、四川3种不同产地的泽泻,遗传距离分析结果表明,RAPD分析结果与传统道地药材的评价标准及多年来临床实践证明的结果是一致的,福建泽泻质量是最优的。陈林娇等^[5]应用RAPD技术发现2个不同产地的狭基线纹香茶菜居群的扩增产物并不完全一致,如D-20引物检测到广东瑶坪产的比广州产的多出一条1263 bp带,这为揭示道地药材的生物学本质提供了一些线索。Wen等^[6]对人参属12种植物的ITS区和5.8 S rRNA基因进行了序列分析,结果表明美洲东北部2个种西洋参*P. quinquefolius*与三叶人参中*P. trifolius*,西洋参与东亚种人参、竹节参*P. japonicus*、三七*P. notoginseng*具有更近的亲缘关系,而且ITS序列证明人参、西洋参和三七不是一个单系群。此外,DNA指纹图谱从在基因层面确认中药的道地性在灵芝的监测中也有应用,这是市场上第一项利用DNA指纹图谱确认的产品^[7]。

2.2 在近缘生药和易混生药品种鉴定方面的应用

近年来,由于DNA分子标记技术在植物学中

的广泛应用,使药用植物的鉴别工作也取得了空前的发展。传统的鉴定手段人为干扰因素较多,而DNA分子标记因为是从分子水平上客观地反映待测材料之间的差异,所以只要能反映生药“道地性”的“特征性基因”在DNA序列上存在着一定的差异,一般就能够通过杂交或电泳等方式直观地体现出来。丁小余等^[8]对束花石斛及其相似种玫瑰石斛、喇叭唇石斛、报春石斛、兜唇石斛等植物进行rDNA ITS区序列比较,结果显示:束花石斛及其相似种在rDNA ITS序列上存在着显著而稳定的差异。根据rDNA ITS区碱基序列差异,能准确鉴别束花石斛及其相似种植物及药材。王艇等^[9]采用DAF技术鉴别中药材厚朴、凹叶厚朴及其常见的伪品、混淆品,获得了清晰可靠的DNA指纹图谱。根据聚丙烯酰胺凝胶上显示的DNA带型差异可简便地区分出厚朴、凹叶厚朴和其他伪品、混淆品,证明DNF技术可以准确、快速地鉴别出中药材厚朴及其伪、混淆品,这在正确引种方面具有较高的价值。这是第一次采用分子生物学方法鉴别厚朴的真伪。高建平等^[10]采用邻接法(*neighbor-joining method*)构建邻接(NJ)系统树,比较、研究不同产地南五味子的基源植物:华中五味子及混淆品绿叶五味子的rDNA ITS碱基序列,分析结果显示:华中五味子ITS长度范围为691~692 bp,ITS1和ITS2分别为282 bp和246~247 bp;绿叶五味子ITS长度范围为694~695 bp,ITS1和ITS2分别为285~286 bp和246~247 bp。不同产地华中五味子与绿叶五味子在ITS1有3个稳定的差异位点。NJ树中,产于鸡公山3个居群的绿叶五味子和天目山的1个居群及引用的2条绿叶五味子ITS序列聚为一支,bootstrap支持率为68%。他们认为rDNA ITS序列可作为中药南五味子与混淆品绿叶五味子的一种良好的分子标记。傅荣昭等^[11]利用RAPD技术对五种药用八角莲的7个样品进行了分子鉴定。在筛选的42个引物中,12个引物产生的多态性条带,可靠地区分了这7个八角莲样品,包括3个不同地区的*D. versipellis*,1个*D. majorensis*,1个*D. pleiantha*,1个*D. furfuracea*和1个*D. veitchii*。每个样品都找到了1~3个稳定可靠的特异分子标记。他们发现*D. furfuracea*与*D. versipellis*的亲缘关系最远,与*D. veitchii*较近,而与*D. majorensis*最近。*D. veitchii*与*D. majorensis*的亲缘关系比与*D. versipellis*、*D. furfuracea*和*D. pleiantha*更近。结果表明RAPD技

术能够有效地用于这 7 个药用八角莲样品的分子鉴定。Fushimi 等^[12]通过变异等位基因扩增技术(MASA)对 mat K 基因片段测序发现, 人参 *P. ginseng* 与西洋参 *P. quinquefolius*、竹节参 *P. japonicus* 间的 mat K 基因片段上第 102 号核苷酸序列不同, 以此来鉴别人参、西洋参, 结果非常可靠。滕艳芬等^[13]的研究结果也显示: 通过 mat K 基因序列可以分析石斛及其混淆品间的遗传关系, 将正品与混淆品区别开来。

3 在研究药用植物进化关系方面的应用

RFLP 能区分纯合基因型和杂合基因型, 是居群内和居群间遗传变异、亲缘关系研究的重要工具, 目前应用 RFLP 在多源性中药材如伞形科北沙参、人参、豆科甘草属等的鉴定中已有报道^[14, 15]。Galgaro 等^[16] 釐盼 FLP 和 RAPD 方法研究了落花生属 *Arachis* 的 *Extranervosae*、*Caulorrhizae*、*Heteranthae* 及 *Triseminatae* 植物的亲缘关系, 结果表明 *A. piatrellii* 与 *A. villosulicarpa* 的亲缘关系较近, 而 *A. sp. aff. piatrellii* 与 *A. piatrellii* 关系较远, 可能是一新种。由于 RFLP 技术的局限性, 人们相继在 RFLP 的基础上寻找新的研究手段。RAPD 技术在探讨种间关系时只适合于物种数目不多的属、包括几个近缘种的复合体、属下物种数不多的组以及与栽培品种密切相关的物种等。RAPD 最适合于种下水平遗传型检测, 包括野生天然居群的遗传结构分析、种质资源的评估、栽培植物品种的鉴定等, 在这样的范围内便于居群采样。在药用植物主要居群遗传关系的研究中, RAPD 技术应用较多, 研究较深入的是对丹参、人参和西洋参等中药植物亲缘关系的分析, 在分子水平上比较了不同居群间的遗传多样性^[17, 18]。郭启荣等^[19]应用 RAPD 技术分析了 4 种木麻黄属的亲缘关系, 聚类分析结果表明: 木麻黄属 (*Casuarina*) 的普通木麻黄、粗枝木麻黄和细枝木麻黄的平均遗传距离为 0.30, 其中细枝木麻黄和粗枝木麻黄的遗传距离特别小, 为 0.19; 而异果木麻黄属 (*Allocasuarina*) 的滨海木麻黄与其他 3 种木麻黄的平均遗传距离为 0.65。RAPD 聚类分析结果表明, 四种木麻黄之间的亲缘关系与血清学和化学分类学的结果一致, RAPD 分子标记技术适用于木麻黄植物多样性研究。卞云云等^[20]采用 RAPD 技术对 12 个贝母样品进行了亲缘关系研究, 结果所有样品总 DNA 均为 21 kb 左右。从 20 个随机引物中筛选

出 5 个扩增稳定且谱带清晰的引物, 扩增产物共记录到 27 条谱带, 多态性片段 25 条, 扩增产物大小为 450 bp~1904 bp。认为种内相似性大于种间相似性, 安徽贝母和蒲圻贝母的亲缘关系最远, 浙贝母和蒲圻贝母的亲缘关系最近。此外, RAPD 技术在八角链^[12]、在牡丹^[21]、栝楼^[22]、松果菊^[23]和牛膝^[24]的研究中也获得相应的成功的应用。葛永奇等^[25]用 ISSR 分子标记技术, 对江苏泰兴、美国纽约的栽培银杏 (*G. biloba*) 群体和中国 3 个可能为野生的银杏自然群体 (浙江西天目山、贵州务川、湖北大洪山区) 的遗传多样性水平和群体遗传结构进行了研究。用 13 个引物对 5 个群体共 66 个样品进行扩增, 共得到 88 个清晰的扩增位点, 其中多态性位点 62 个, 多态位点百分率 (PPB) 为 70.45%。POPGENE 分析结果表明: 与其他裸子植物相比, 银杏具有丰富的遗传变异 ($H_e=0.2408$; $H_o=0.3599$)。贵州务川群体的遗传多样性水平最高 (PPB = 56.82%, $H_e=0.2089$, $H_o=0.3087$), 江苏泰兴栽培群体 (PPB = 34.09%, $H_e=0.1269$, $H_o=0.1858$) 和美国纽约的栽培群体 (PPB = 23.86%, $H_e=0.0884$, $H_o=0.1312$) 的遗传多样性水平较低。Nei's 的遗传多样性分析 AMOVA 分析表明, 3 个可能的自然群体间出现了一定程度的遗传分化, 可能是人为选择压力和基因流障碍引起的。UPGMA 分析表明美国纽约的栽培群体与湖北大洪山群体具有较近的亲缘关系, 它们可能为同一野生群体的后裔。曾明等^[26]测定并分析葛属 3 种植物的内转录间隔区 (ITS) 序列及 5.8S rRNA 基因序列, 系统树显示: 不同产地的野葛首先聚类。然后与粉葛聚在一起, 山葛最后聚类, 根据分子性状特征, 粉葛作为野葛的变种, 山葛独立成种较为合理, 曾明等认为 ITS 序列特征是中药葛根鉴别的有效分子标记。

4 在中药品质与标准化方面的应用

中医药是中华民族卓越的历史文化和现代文明的重要组成部分, 中药品质与标准化是中药现代化的重要内容, 现代生物学技术的发展为中药品质与标准化注入了生机。DNA 分子标记技术在中药品质方面的应用主要体现在中药“道地性”研究, 而中药“道地性”研究的结果有也为中药标准化提供了重要的理论依据和准绳^[26]。刘玉萍等^[27]人研究表明 DNA 测序技术也可成为山药基原鉴定准确而有效的分子方法。目前, 中药质量分析和品质评价应用较多的分子标记技术主要有两种: 分子杂交和聚合

酶链式反应(PCR),前者主要有以低拷贝序列为探针的RFLP、DNA指纹等,后者主要有RAPD、DNA直接测序等代表性的分子标记技术。DNA分子标记技术将会成为继光谱、色谱技术之后的中药质量标准研究领域又一常规技术方法,利用生物芯片技术可快速筛选高品质药材,并建立生药质量标准,筛选有效成分组成相近的稀有或濒危物种的替代者,开发新药资源,稳定药材和药品生产质量,阐明药效物质基础。可见DNA分子标记技术对促进中药现代化,促进中药进入国际市场,将起着不可替代的重要作用。

5 在其他方面的应用

高文远等^[28]应用随机扩增多态性DNA(RAPD)分子标记技术分析不同组曼陀罗基因组的变异情况。结果从65个供试引物中筛选出15个能够产生可重复多态性扩增产物的引物。与地面对照组相比,失重组共产生39条多态性片段,基因组的多态性频率23.1%;击中组共产生45条多态性片段,基因组的多态性频率为24.4%。多态性片段大小在200~1900 bp之间。结论是微重力引起曼陀罗一定程度的基因组变异,微重力和高能离子辐射的复合效应大于微重力本身对植物的影响。傅荣昭等^[29]利用RAPD技术研究失重与离子辐射/失重两个因素对太空飞行甘草的基因组的影响效果,结果表明:离子辐射/失重因素引发的基因组RAPD多态性水平大于失重因素RAPD多态水平,进而推测出失重确实

引起了较大程度的基因组变异,而离子辐射则略显加重了失重的诱变效应。

参考文献(References)

- [1] 肖小河等. *中国中药杂志*, 1995, **20**: 323
- [2] 李军等. *中医药研究*, 2002, **18**: 48
- [3] Zhang KY *et al. Planta Med*, 2001, **67**: 379
- [4] 胡珊梅等. *中草药*, 2002, **33**: 161
- [5] 陈林姣等. *中国中药杂志*, 1998, **23**: 328
- [6] Wen J *et al. Mol Phylogenet Evol*, 1996, **6**: 167
- [7] <http://www.hkbu.edu.hk/~scmweb/sim/rdd/lab/hlcl.htm>
- [8] 丁小余等. *中国中药杂志*, 2002, **27**: 407
- [9] 王艇等. *中药材*, 2001, **24**: 710
- [10] 高建平等. *中国中药杂志*, 2003, **28**: 706
- [11] Fu RS *et al. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2000, **9**: 57
- [12] Fushimi H *et al. Biol Pharm Bull*, 1997, **20**: 765
- [13] 滕艳芬等. *中国药科大学学报*, 2002, **33**: 280
- [14] 陈美兰等. *国外医学中医中药分册*, 2002, **24**: 304
- [15] Yamazaki M *et al. Biol Pharm Bull*, 1993, **16**: 1182
- [16] Galgaro L *et al. Genome* 1998, **41**: 445
- [17] 郭宝林等. *中草药*, 2002, **33**: 1113
- [18] 姜玉新等. *特产研究*, 1998, (1): 5
- [19] 郭启荣等. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2003, **42**: 378
- [20] 卞云云等. *中药材*, 2000, **23**: 13
- [21] 邹喻苹等. *植物分类学报*, 1999, **37**: 220
- [22] 王敏等. *中国中药杂志*, 1999, **24**: 336
- [23] 张英涛等. *中国中医药信息杂志*, 2002, **9**: 11
- [24] 郑喜珍等. *中国中药杂志*, 2002, **27**: 421
- [25] 葛永奇等. *生物多样性*, 2003, **11**: 276
- [26] 曾明等. *中国药学杂志*, 2003, **38**: 173
- [27] 刘玉萍等. *中草药*, 2001, **32**: 1026
- [28] 高文远等. *中国医学科学院学报*, 2000, **22**: 44
- [29] 傅荣昭等. *农业生物技术学报*, 1998, **6**: 318

Application of DNA Molecular Marker in Medicinal Plant

Hai-Xia Wen*, Jia-Li Cai, Shu-Shu Zou

(College of Bioengineering, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050, China)

Abstract The application of DNA molecular marker in the medicinal plant including identification of closely related medicinal plant species, distinguish easily confusable species, the standardization of quality control criteria, genetic linkage mapping, evolution analysis, and gene screening of medicinal plant is summarized. The prospects of DNA molecular marker in the medicinal plant are given.

Key words DNA molecular marker; medicinal plant; application

Received: June 11, 2004 Accepted: December 9, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-23-68667792, Fax: 86-23-68667804, E-mail: whx@cqit.edu.cn