株，通过与二倍体杂交获得三倍体后代，以拓宽育种资源。进一步研究不同倍性材料的生物学性状和薯蓣皂苷元量，筛选出高产、高薯蓣皂苷元量的最适倍性，有望解决目前盾叶薯蓣人工栽培后有效成分量下降的问题，振兴皂素工业。

References:

[1] Feng Y X, Zhou Z Q. Review and prospects for industrial production and resource of diosgenin in China [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1994, 6(3): 3.

[2] Li J C, Li X M, Guo X S. Advances in study of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(10): 1842-1848.

[3] Li Y H, Hu C G, Yao J L, *et al*. Studies on tetraploid *Dioscorea zingiberensis* inducement [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(3): 16-20.

[4] Zhou Y, Hu C G, Shi G, *et al*. Biological characters of tetraploid *Dioscorea zingiberensis* [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2005, 23(4): 358-362.

[5] Li H S. *Theory and Technology of Plant Physiology and Biochemistry* (植物生理学与生物化学理论与技术) [M]. Beijing: High Education Press, 2000.

[6] Liu Y, Deng S W, Yuan W P. Determination of diosgenin in *Dioscorea nipponica* by RP-HPLC [J]. *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med* (江西中医学院学报), 2004, 116(14): 42-43.

[7] Yang W Y, Xiong C M. RP-HPLC Determination of diosgenin in Chinese medicinal herb [J]. *Anal Lab* (分析实验室), 2002, 21(1): 74-75.

[8] Zhao Y. Analysis of superoxide dismutase, catalase and soluble protein content of tetraploid barley [J]. *J Chin Cereals Oils Associa* (中国粮油学报), 2001, 16(5): 33-35.

[9] Wu L J, Xu J B, Liu X X. Comparison of physiological index between diploid and triploid apples [J]. *Hebei Fruits* (河北果树), 2002(1): 4-5.

[10] Liu D L, Yu B C, Sun Y Y. Effects of the temperature stress on SOD and CAT activities and their isozymes of rice seedling [J]. *J Central China Normal Univ: Nat Sci* (华中师范大学学报：自然科学版), 1994, 28(4): 525-528.

[11] Xu H F, Jin Y M, Zhang C Y. Content of soluble sugar in sunflower leaves [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2000, 22(1): 23-25.

[12] Zhang J J, Yin L Q, Zhang W P. Features and heat-resistance of SHICAI (*Brassica campestris*) tetraploids [J]. *Acta Agric Shanghai* (上海农业学报), 1998, 14(2): 35-40.

[13] Shang H L, Guo Q G, Song M. A preliminary study of heat and cold-resistance of tetraploid Ginger (*Zingiber officinale*) [J]. *J Southwest Agric Univ* (西南农业大学学报), 2003, 25(3): 231-233.

山东产瓜蒌不同农家品种的 RAPD 研究

孙稚颖[1,2]，周凤琴[1]

(1. 山东中医药大学药学院，山东 济南 250014；2. 山东师范大学生命科学学院，山东 济南 250014)

摘 要：目的 探讨瓜蒌不同农家品种的遗传多样性和亲缘关系，对其进行分子标记鉴定。**方法** 用 25 个随机引物对山东瓜蒌不同农家品种、野瓜蒌及对照湖北栝楼进行 RAPD 分析。采用 NTSYS-pc 软件计算瓜蒌各农家品种(及种)间的 Jaccard 遗传相似系数，按非加权配对算术平均法(UPGMA)建立各品种间的聚类图。**结果** 共扩增出 266 个条带，其中多态带为 232 条，占 87.2%。聚类图显示，对照湖北栝楼与瓜蒌各农家品种和野生种间的差异最大，牛心瓜蒌与仁瓜蒌、大瓜蒌与八棱瓜蒌、小光蛋与野瓜蒌彼此间亲缘关系较近。**结论** RAPD 分子标记法可以在分子水平上规范、整理和鉴定瓜蒌的不同农家品种，揭示了瓜蒌种质资源的亲缘关系以及遗传背景，为山东道地药材瓜蒌的栽培育种及资源保护提供了重要参考。

关键词：瓜蒌；农家品种；RAPD；亲缘关系；遗传多样性

中图分类号：R282.7 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2006)03-0426-04

RAPD Analysis on farm cultivars of fruits of *Trichosanthes kirilowii* from Shandong Province

SUN Zhi-ying[1,2], ZHOU Feng-qin[1]

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;
2. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective To explore the genetic diversity and relationship of different cultivars of the fruits of *Trichosantheis kirilowii*, and determine them in molecular level. **Methods** Different fram cultivars and fruits in wild plant of *T. kirilowii* from Shandong Province and *T. hupehensis* were detected by

收稿日期：2005-05-16

基金项目：山东省中医药管理局课题(编号：2001-09)

作者简介：孙稚颖(1971－)，女，山东省滕州市人，讲师，在读博士，主要从事植物资源分类学研究工作。
Tel：(0531)2613292 E-mail：szyww@sohu.com

randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers with 25 randomized primers. The Jaccard coefficient was worked out by using NTSYS-pc software, and a cluster dendrogram of different samples was established based on unweighed pair-group method with arithmetic mean (UPGMA). **Results** The 25 selected primers produced 266 bands among which 232 bands (87.2%) were polymorphic. In the cluster dendrogram, *T. hupehensis* was far from the different cultivars and fruits in wild plant of *T. kirilowii*, but there was closer genetic relationship between Niuxin Gualou and Ren Gualou, Da Gualou, and Baleng Gualou, as well as Xiao Guang-dan Gualou and wild sample. **Conclusion** RAPD Markers can be used to standardize, arrange, and determine farm cultivars of fruits of *T. kirilowii* in molecular level, and indicate the genetic relationship and background, then provide important information for seed breeding and resourse protection of *T. kirilowii*.

Key words: the fruits of *Trichosanthes kirilowii* Maxim.; farm cultivars; RAPD; genetic relationship; genetic diversity

瓜蒌是山东重要道地药材，为葫芦科栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥果实[1]，药用历史悠久。临床具有清热涤痰、宽胸散结及润燥滑肠之功效，为中医常用治胸痹之要药，近年来又用于治疗糖尿病，用途广泛。栝楼是一种雌雄异株、异花授粉的植物，在山东各地具有悠久的栽培历史，长期的自然选择和人工选育，在各地形成了一系列的农家栽培品种，其中包括山东优质瓜蒌农家品种“仁瓜蒌”、“牛心瓜蒌”等。近年来，由于市场经济的灵活性，一些地区和药农盲目引种外省的瓜蒌品种，如“地瓜蒌”等，致使山东瓜蒌的种质资源出现混乱，瓜蒌药材的外观性状和内在质量也发生了较大变化，从而大大地威胁着山东优质瓜蒌农家品种的纯度，甚至生存。到目前为止，对瓜蒌农家品种的鉴定尚缺乏准确可靠的方法，对各农家品种的遗传背景和亲缘关系也了解甚少。

RAPD 分子标记技术自 20 世纪 90 年代以来，被证明是一种在动植物遗传多样性研究以及属下、种下系统学研究方面甚为便捷和有效的方法[2,3]。本研究在全面调查山东瓜蒌种质资源的基础上，采用 RAPD 分子标记技术分析瓜蒌各农家品种间的亲缘关系，并与野生栝楼和山东误引种的湖北栝楼作对比，提供 DNA 分子水平的鉴定资料，为明确山东道地药材瓜蒌种质资源的遗传多样性、鉴定山东瓜蒌不同的农家品种以及合理保护和利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料：收集山东产瓜蒌各农家品种的成熟果实，取出种子，洗净晾干，次年 3 月份种于山东中医药大学药圃。取新鲜嫩叶，每品种取 5 个以上个体，混合。供试样品来源见表 1。样品经山东中医药大学药学院周凤琴教授鉴定，1～8 号为山东产瓜蒌的农家栽培品种，原植物为栝楼 *T. kirilowii* Maxim.，9 号为栝楼野生种的果实，采自山东长清马山小山坡，10 号为湖北栝楼 *T. hupehensis* C. Y. Cheng et Yueh 的果实。

表 1 实验材料的来源

Table 1 Source of materials tested

编号	代码	品种	产地	收集或采收时间
1	NX	牛心瓜蒌	山东肥城红五村	2004 年 1 月
2	RE	仁瓜蒌	山东肥城红五村	2004 年 1 月
3	MP	明皮	山东肥城红五村	2004 年 1 月
4	DA	大瓜蒌	山东曲阜	2003 年 10 月
5	DI	地瓜蒌	山东平邑	2004 年 1 月
6	BA	八棱瓜蒌	山东曲阜	2003 年 10 月
7	XG1	小光蛋 1	山东曲阜	2003 年 10 月
8	XG2	小光蛋 2	山东平邑	2003 年 12 月
9	YE	野瓜蒌	山东长清马山	2003 年 12 月
10	HB	湖北栝楼	山东菏泽	2004 年 1 月

1.2 仪器和试剂：冰冻超速离心机(BECKMAN，J2-21M 型)、离心机(Eppendorf Centrifuge 5417R，德国)、数显恒温水浴锅(HH-2 型，国华电器有限公司)、PCR 仪(System-9700 仪，德国)、电泳仪(DYY Ⅱ型电泳仪，北京六一仪器厂)、Gene Genius 凝胶紫外成像系统(SYNGENE 公司)、dNTP、TaqDNA 聚合酶、随机引物(上海博亚公司)、100bp Marker (大连赛恩斯公司)、琼脂糖、EB(上海 Sangon 公司)，其余试剂均为分析纯。

1.3 DNA 的提取：采用 CTAB 法[2]。

1.4 PCR 扩增及产物检测：反应体系为 25 μL：含 20 ng DNA，1.0 μmol/L 引物，2.5 μL 10×Taq 缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.4，500 mmol/L KCl，15 mmol/L $MgCl_2$，1 mg/mL BSA)，200 μmol/L dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)，1 U Taq 酶。反应程序：94 ℃、5 min，94 ℃、1 min，36 ℃、1 min，72 ℃、2 min，45 个循环后于 72 ℃延伸 10

min，扩增完成后置于 4 ℃保存。扩增产物于 1.5% 琼脂糖（内含 1 μg/mL EB）凝胶电泳检测（5 V/cm，1～2 h），用 100 bp DNA Ladder Marker 作相对分子质量标记，观察记录结果，分析扩增谱带。

1.5 数据分析及品种的鉴定：每个样品的扩增带按有或无记录，“有”赋值为 1（包括强带和重复性好的弱带），“无”赋值为 0，从而得到原始数据矩阵，计算多态性条带比率，用 NTSYS-pc 软件（Version 2.00）计算各品种间的 Jaccard 遗传相似系数，按非加权配对算术平均法（UPGMA）建立各品种间的聚类图。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果：从 200 多个 Operon 公司的随机引物中筛选出 25 个能扩增出清晰且具多态性条带的引物，用以对 10 份材料进行扩增，结果扩增出 266 个条带，其中多态带为 232 条，占总扩增条带数的 87.2%。扩增条带长度范围多集中在 300～1 500 bp。

2.2 瓜蒌不同品种的聚类分析（图 1）：由聚类图看出，野瓜蒌和所有瓜蒌农家品种均与湖北栝楼相差很远，在遗传相似系数为 0.40 处即分开，表明不同的物种遗传差异较大。农家品种牛心瓜蒌与仁瓜蒌、大瓜蒌与八棱瓜蒌、小光蛋 1 与小光蛋 2 彼此首先聚在一起，表明亲缘关系较近。在遗传相似系数为 0.82 处，各品种被分为 4 组，第 1 组包括牛心瓜蒌与仁瓜蒌；第 2 组为明皮；第 3 组为大瓜蒌与八棱瓜蒌；第 4 组包括地瓜蒌、小光蛋 1 与小光蛋 2 以及野瓜蒌。

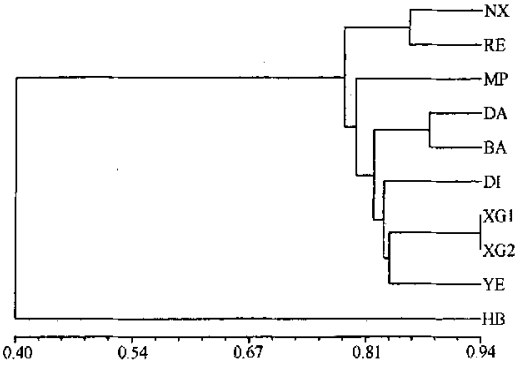

图 1 瓜蒌不同品种基于 RAPD 分析数据的聚类图

Fig. 1 Cluster dendrogram of different cultivars of fruits of *T. kirilowii* based on RAPD data

2.3 瓜蒌农家品种的分子鉴定：从 RAPD 扩增带谱中，发现瓜蒌各农家品种对于不同引物或多或少都有自己的特有谱带，重复实验证明，稳定性良好。如图 2，引物为 OPO-03，明皮在 550、1 000 bp 处、地瓜蒌在 800 bp 处各有一扩增产物，而其他品种在此 3 处都无扩增产物；大瓜蒌与八棱瓜蒌在 300、350 bp 处各有两条特异扩增带，此外，除了特异扩增带，还有特异缺失带，如牛心瓜蒌与大瓜蒌在 1 550 bp 处都有一条缺失条带，这为瓜蒌农家品种的鉴定提供了一定的分子依据，但能否作为各品种分子鉴定的特异标记，尚待进行个体取样研究重复，以进一步确证。

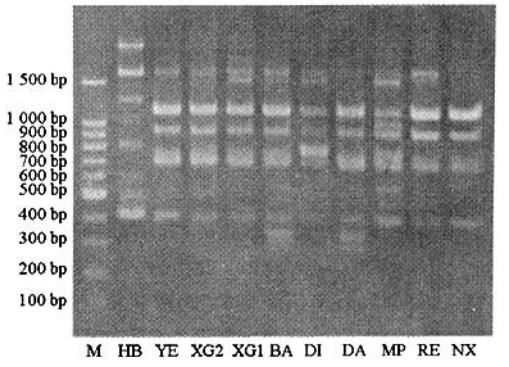

图 2 引物 OPO-03 扩增的 RAPD 带谱

Fig. 2 RAPD Bands amplified by Primer OPO-03

3 讨论

3.1 RAPD 技术在瓜蒌农家品种研究中的应用：RAPD 扩增结果表明，瓜蒌农家品种间多态性较高，具有丰富的遗传多样性，这正是栝楼形成多农家品种的分子基础，RAPD 分子标记作为一种有效鉴别工具，可以在分子水平上规范、整理和鉴定瓜蒌的农家品种，揭示瓜蒌种质资源的亲缘关系以及遗传背景，对于指导今后瓜蒌的栽培育种工作及资源的合理保护无疑是十分有意义的。

3.2 仁瓜蒌与牛心瓜蒌：仁瓜蒌是山东著名的道地药材，产量大、质量优，历来是道地产区药农推崇的优质瓜蒌农家品种。药材表面棕红色至橙红色，果皮皱缩，果瓤及种子多，体重，糖分足。牛心瓜蒌是道地产区仁瓜蒌田内较少见的一个农家品种，果实形似仁瓜蒌，但先端渐尖，形似牛心，故名。产区药农根据经验，认为牛心瓜蒌与仁瓜蒌一样，也是优质农家品种。聚类分析结果仁瓜蒌与牛心瓜蒌最先聚在一起，表明仁瓜蒌与牛心瓜蒌亲缘关系最近，这与王敏等[4]的报道一致。二者与野瓜蒌的距离甚远，说明通过长期的人工栽培和驯化，人工选择和自然选择使两个农家栽培品种的遗传基因在野生种的基础上发生了相当大的变化，突显了植物体的优良特性，使外观特征及内在质量等遗传性状稳定，形成了优质的农家栽培品种。实验结果为仁瓜蒌和牛心瓜蒌优质

农家品种的划分与鉴定提供了分子水平的依据。

3.3 小光蛋、野生瓜蒌与明皮：小光蛋是山东产区药农对栽培栝楼中个小色黄、类球形、果皮光滑、种子及果瓤少的一类农家品种的称呼。小光蛋 1 与小光蛋 2 是来自不同产地的同一农家品种，RAPD 研究结果表明，二者的遗传相似性系数极高，达到 0.94，这说明瓜蒌农家品种内的差异远远小于农家品种间的差异，同时也证明了 RAPD 分子标记技术用于种下农家品种分类上的可靠性，实验结果支持了不同产区对小光蛋这个农家品种划分的标准。

野瓜蒌外形和质量极似小光蛋，在各产区民间使用。实验结果表明野瓜蒌与小光蛋的亲缘关系最近，它们最先聚在一起，说明它们体内遗传物质的相似程度最大。是否可以这样理解，小光蛋是由野生栝楼经药农人工栽培而形成的较为初级的、原始的农家品种类型，其进化方式和遗传背景尚待研究。

明皮是山东产区形似小光蛋的一类农家品种，果实类球形，个较小，色橙黄至橙红，果皮光滑，有的产区由于其外形似小光蛋也把其归入小光蛋类型，使其名称混乱。RAPD 分子标记分析表明，明皮是明显区别于小光蛋的一个独立的农家品种类型，聚类分析结果明皮与小光蛋的亲缘关系甚远，而与仁瓜蒌和牛心瓜蒌的亲缘关系较近。实际上，明皮常混种于仁瓜蒌产区，大小似仁瓜蒌，干燥后体较重，药农因其果皮不皱缩而光滑特称其为明皮，一般认为质量次于仁瓜蒌和牛心瓜蒌。因此，明皮应明确为一个农家栽培品种，不能与小光蛋混为一谈。

3.4 大瓜蒌与八棱瓜蒌：大瓜蒌与八棱瓜蒌是山东产区两个栽培品种，大瓜蒌特点是个大，椭圆形或类球形，果皮橙黄色或黄色，光滑无皱，果皮薄，果瓤少，水分大，种子少，干燥后体轻。八棱瓜蒌表面具有八条纵棱或凹沟。RAPD 分子标记分析表明，大瓜蒌与八棱瓜蒌亲缘关系最近，在整个聚类分析中，位于明皮和地瓜蒌之间，分子水平的分析与这两类农家品种的外观质量相吻合。这说明药材的质量可以直接受到遗传基因的影响。

3.5 地瓜蒌：地瓜蒌是山东产区引自河北安国的一个农家品种，山东原不产。原产地通常采用与小麦轮种，不搭架，直接种于麦田中，生长期短于山东产区，即麦收后种植至种麦前采收。由于生长期短，药材通常不成熟就采收，质量差。引种到山东后多搭架栽培或种于院墙篱笆旁，生长期增长，山东产区常加工成瓜蒌仁和瓜蒌皮。果实呈宽纺锤形，两端稍尖，果皮棕色或棕红色，粗糙，凹凸不平，果瓤及种子较多，干燥后果皮厚，不皱缩，体轻。药农认为质量远不如山东的仁瓜蒌和牛心瓜蒌。RAPD 分子标记结果的聚类分析表明，地瓜蒌应属于仅次于小光蛋的一个较初级、较原始的农家栽培品种，亲缘关系与小光蛋和野瓜蒌最近，而远离仁瓜蒌和牛心瓜蒌。

3.6 湖北栝楼：湖北栝楼 *T. hupehensis* 产于湖北、湖南以及四川。山东各地有误种，其集中引种地为菏泽、泰安等，由于本种地下块根生长迅速，产区称其为“改良栝楼”，误将其作为“天花粉”，种子作为“瓜蒌仁”，分别称为“改良天花粉”和“改良瓜蒌子”。但二者均有毒，尤其是根，服后有不良反应，不宜药用[5]。本实验也证明湖北栝楼与栝楼的野生种及各农家品种之间的遗传背景差异极大，两个不同的种很早即被分开。这表明 RAPD 分子标记法用于种间分类差异更明显。

References:

[1] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1, 2005.

[2] Zhou Y P, Ge S, Wang X D. *The Molecular Marker among Systematic and Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记) [M]. Beijing: Science Press, 2001.

[3] Fang F, Guo S L, Huang H, *et al*. RAPD Analysis of eight populations in plants of *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Kudo from Zhejiang Province. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): 553-556.

[4] Wang M, Huang L Q, Fu G F. RAPD Analysis on approximate genetic relationships of three varieties of *Trichosanthes kirilowii* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(6): 336-337.

[5] Huang L Q, Yang B, Yue C X. The Chinese Medicinal species of the genus *Trichosanthes* L. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(4): 195-196.

欢迎订阅《中草药》杂志 2002 年增刊

2002 年第 33 卷增刊以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容，收载论文 107 篇，共 218 页（约 40 万字）。国内研究的热点“中药指纹图谱”为专论重点，刊登相关综述及实验论文 10 余篇。另有中药化学成分、制剂分析、药理实验和临床，以及中药材方面的科研论文和综述文章。

每本定价 60 元，另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅，款到寄刊。

编辑部地址：天津市南开区鞍山西道 308 号 **邮编**：300193 **网址**：www.tjipr.com

电话：(022)27474913 23006821 **传真**：(022) 23006821 **E-mail**：zcyzzbjb@tjipr.com