

· 基础研究 ·

SCoT 分子标记对不同产地白芍亲缘关系的研究[△]

席秀丽, 胡珊*, 邬龙怡, 钟旺琴

(广州市香雪制药股份有限公司, 广东 广州 510663)

[摘要] 目的: 本研究采用 SCoT 分子标记技术对分布于浙江磐安, 安徽亳州, 四川中江, 山东菏泽共 22 个居群的白芍样品进行亲缘关系的研究。方法: 通过提取白芍 DNA, 正交设计寻找白芍 SCoT 分子标记最佳 PCR 反应体系, 筛选获得白芍 PCR 扩增的 SCoT 引物, 应用 NTSYS2.10e 软件并采用 UPGMA 法进行聚类分析。结果: 发现 SCoT 引物碱基序列共扩增出 121 条带, 其中多态性条带有 77 条, 多态百分率为 63.6%, 各品种间的相似系数在 0.78~0.94 之间, 不同产地白芍分别聚为一类。结论: 不同产地白芍有着丰富的遗传多态性, 且 SCoT 分子标记适用于不同产地白芍亲缘关系的研究, 有效区分不同产地白芍品种, 这为白芍药材种质资源的引种和规范栽培提供了有力参考。

[关键词] SCoT; 白芍; 正交; 遗传多态性

Study on the Genetic Relationship of *Paeonia lactiflora* from Different Regions by SCoT Molecular Markers

XI Xiu-li, HU Shan*, WU Long-yi, ZHONG Wang-qin

(Xiangxue pharmaceutical co. LTD of Guangzhou, Guangzhou 510663, China)

[Abstract] **Objective:** This study used SCoT molecular marker technique to find the relationship between the 22 groups of *Paeonia lactiflora* samples, which were distributed in the Zhejiang panan, Anhui haozhou, Sichuan zhongjiang and Shandong heze. **Methods:** Extracted *Paeonia lactiflora* DNA, Optimal PCR reaction system and found the best suitable for SCoT molecular marker of *P. lactiflora* by orthogonal design. Screened the SCoT primers obtained from PCR amplification. Finally, applied the NTSYS2.10e software and the UPGMA method was used for cluster analysis. **Results:** Found that SCoT primer sequence amplified out 121 bands, included 77 polymorphism bands, polymorphic percentage was 63.6%, the varieties of similarity coefficient between 0.78~0.94, *P. lactiflora* of different regions were respectively divided into category. **Conclusion:** The results showed that there was a rich genetic polymorphism of *P. lactiflora* in different habitats, and the SCoT molecular marker was suitable for the study of the relationship between *P. lactiflora* from different sources. The effective differentiation of *P. lactiflora* varieties from different habitats provided a strong reference for the cultivation and standardization of germplasm resources of *P. lactiflora*.

[Keywords] SCoT; *Paeonia lactiflora*; orthogonal; genetic polymorphism

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171227007

白芍, 别名芍药, 《中华人民共和国药典》2015 年版载其原植物为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。其性味苦、酸, 微寒。归肝、脾经。养血调经, 敛阴止汗, 柔肝止痛, 平抑肝阳。用于血虚萎黄, 月经不调, 自汗, 盗汗, 胁痛, 腹痛, 四肢挛痛, 头痛眩晕等症^[1]。白芍主产于中国安徽、四川、浙江、山东等地^[2]。浙江磐安、安徽亳州、四川中江和山东菏泽作为白芍的传统产区, 在长期的引种和交流中, 种质资源较为混杂, 导致白芍种质资源的遗传结构有较大幅度的差异,

品种退化严重, 栽培种质混杂^[3]。白芍是中国传统常用大宗中药材, 需求量大, 且品种繁多, 而种质资源的混杂严重影响了白芍规范化生产的发展。因此有必要从源头即白芍种质资源、种植规范方面严格要求, 搞清白芍药材的地道性, 建立品种质量标准, 从而指导 GAP 中药材生产质量管理规范标准化生产。

目标起始密码子多态性分子标记(Start codon targeted polymorphism, SCoT)是 Collard 和 Mackill 开发的基于 SPAR(单引物扩增反应)的新的目的基因分子标记方法。其原理是根据植物基因中 ATG 翻译起始位点侧翼

[△] [基金项目] 广东省中药(香雪)工程技术研究中心(2015S-P095)

* [通信作者] 胡珊, 研究方向: 中药种质资源鉴定; E-mail: hush@xphcn.com

序列的保守性设计单引物,对基因组进行扩增,产生偏向候选功能基因区的显性多态性标记^[4]。SCoT 标记结合了 ISSR 标记和 RAPD 标记的优点,操作简单,成本低,引物设计简单且可以通用,多态性丰富,可用于分子辅助育种^[5]。目前 SCoT 已被成功应用于柑橘^[6]、铁皮石斛^[7]等作物,在种属间、品种间的遗传多样性分析及杂交后代的遗传分析等研究中取得较多进展。本研究利用 SCoT 分子标记对四川中江、浙江磐安、安徽亳州、山东菏泽四大传统产地的 22 个居群的白芍样品进行亲缘关系研究和遗传多样性检测。目的是从分子水平上研究 22 个白芍居群的亲缘关系及遗传多样性,为白芍药材的引种和栽培提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采集来自浙江,安徽,四川,山东共 22 个不同居群白芍样品,经广州中医药大学黄海波副教授鉴定为白芍 *Paeonia lactiflora* Pall., 凭证标本保存于香雪制药有限公司研发中心。详细记录样品信息及编号,用 75% 乙醇清洁叶表面后保存于 -80 ℃ 冰箱备用,具体样品信息如下。

表 1 样品信息表

样品编号	样品名称	拉丁名	产地	采样时间/年-月
A1	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	安徽亳州	2017-4
A2	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	安徽亳州	2017-4
C1	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	四川中江	2017-4
C2	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	四川中江	2017-4
C3	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	四川中江	2017-4
C4	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	四川中江	2017-4
C5	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	四川中江	2017-4
C6	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	四川中江	2017-4
Z1	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	浙江磐安	2017-4
Z2	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	浙江磐安	2017-4
Z3	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	浙江磐安	2017-4
Z4	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	浙江磐安	2017-4
A	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
B	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
C	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
D	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
E	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
F	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
G	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
H	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
I	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4
J	白芍	<i>P. lactiflora</i> Pall.	山东菏泽	2017-4

1.2 仪器和试剂

分析天平,核酸蛋白测定仪(Implen Nanophotometer),PCR 仪(BIO-RAD),离心机(Eppendorf),超低温冰箱(Thermo 902-ULTS),电泳仪、电泳槽(BIO-RAD),制冰机,水浴锅,凝胶成像仪(BIO-RAD)。

dNTPs、ExTaqDNA 聚合酶、Mg²⁺、10x ExTaq Buffer、Loing Buffer(Takala),Maker3(广州东盛生物科技有限公司),琼脂糖(Biowest),Golden View 核酸染料(北京博凌科为生物科技有限公司),TAE (50×)(生工),植物基因组提取试剂盒(天根生化),参考 Collard 和 Mackill 提供的 36 条 SCoT 引物序列。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取与检测

采用天根植物基因组试剂盒提取所有材料的基因组 DNA。用微量紫外核酸仪检测 DNA 浓度和纯度。将合格样品 DNA 浓度稀释至 20 ng·μL⁻¹后置于 -20 ℃ 保存备用。

2.2 SCoT-PCR 反应体系正交优化

选用 L16(5⁴) 正交试验设计(表 2),对 Mg²⁺、dNTPs 浓度、ExTaq DNA 聚合酶、引物和 DNA 用量进行 5 因素 4 水平的正交试验。以山东编号为 J 的 DNA 为模板,随机挑选 S6 号引物作为扩增引物,反应总体积 20 μL,含有 10×PCR Buffer 2 μL,每个处理重复 2 次。

表 2 PCR 反应正交体系浓度表

因素组别	Mg ²⁺ / mmol·L ⁻¹	dNTP / mmol·L ⁻¹	Taq / U·20 μL ⁻¹	引物 / μmol·L ⁻¹	DNA / ng·20 μL ⁻¹
1	1.5	0.10	0.50	0.3	30
2	1.5	0.15	0.75	0.4	40
3	1.5	0.20	1.00	0.5	50
4	1.5	0.25	1.25	0.6	60
5	2.00	0.10	0.75	0.5	60
6	2.00	0.15	0.50	0.6	50
7	2.00	0.20	1.25	0.3	40
8	2.00	0.25	1.00	0.4	30
9	2.5	0.10	1.00	0.6	40
10	2.5	0.15	1.25	0.5	30
11	2.5	0.20	0.50	0.4	60
12	2.5	0.25	0.75	0.3	50
13	3.00	0.10	1.25	0.4	50
14	3.00	0.15	1.00	0.3	60
15	3.00	0.20	0.75	0.6	30
16	3.00	0.25	0.50	0.5	40

2.3 SCoT-PCR 引物筛选

根据正交试验结果选择最佳反应体系对 36 条引物进行筛选, 设平行组。

2.4 退火温度筛选

对筛选后的引物进行温度筛选, 在 PCR 仪上设定 50 °C ~ 60 °C 温度区间, 即 50 °C, 50.9 °C, 52.3 °C, 54 °C, 56.3 °C, 58.1 °C, 59.3 °C, 60 °C, 8 个温度梯度进行退火温度筛选。

2.5 SCoT-PCR 反应体系的验证与多态性引物筛选

选择浙江、四川、安徽三个不同产地的白芍 DNA 为模板, 按照上述优化的 SCoT-PCR 体系进行 SCoT 分子标记, 筛选出多态性好、条带清晰的引物。

2.6 SCoT-PCR 扩增与检测

PCR 扩增反应在 PCR 仪上进行, 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 最后 4 °C 保存。扩增反应结束后, 取 10 μ L 扩增产物加入 2 μ L 6 $\times$ loading buffer 用 2.0% 琼脂糖凝胶, 在 1XTAE 电极缓冲液, 120 V, 30 min 电泳下检测条带, 凝胶成像仪下拍照。

2.7 数据分析

根据 PCR 扩增产物的电泳结果, 对清晰且易于辨认的条带采用“0/1”系统记录其位置, 建立 SCoT 标记的 0/1 矩阵。用 NTSYS-pc2.10 e 软件计算样品间的相似系数, 并用不加权重对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

3 实验结果

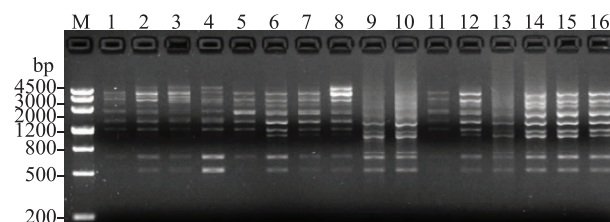
3.1 DNA 提取结果

将提取的所有样品在超微量紫外分光光度计下测量其浓度和纯度, 得到其 A260/A280 均在 1.7 ~ 2.0 之间, 说明 DNA 纯度较高, 符合 PCR 技术要求。

3.2 SCoT-PCR 反应体系正交优化结果分析

使用引物 S6 对反应体系优化的电泳结果见图 1, 参考桂腾琴^[14]直观评价法依次对 16 个实验组结果多态性进行评分, 条带数量丰富、清晰的计 16 分, 涂布或无条带的计 1 分, 反应 1 ~ 16 组体系的平均整数计分依次为: 4、8、5、9、7、12、7、6、8、9、3、

10、5、15、16、14 分。依照计分原则, 以第 15 组计分最高, 条带最为清晰明亮。因此考虑体系最终为 1 $\times$ PCR buffer, 3 mmol $\cdot$ L⁻¹ Mg²⁺, 0.2 mol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs, 0.6 μ mol $\cdot$ L⁻¹ primer, 0.75 U ExTaq 酶, 30ngDNA 模板。

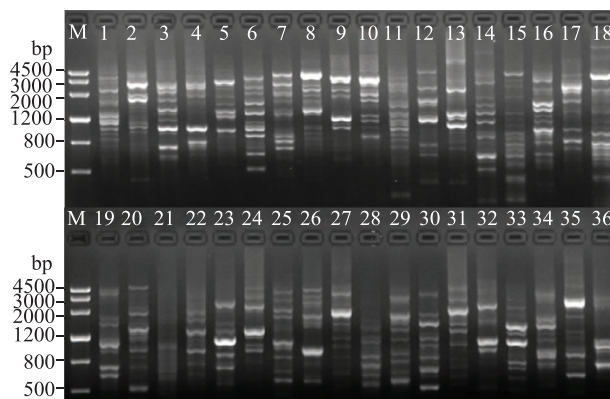


注: 1 ~ 16 分别为正交 1 ~ 16 组不同 PCR 反应体系。

图 1 SCoT 正交体系优化电泳图

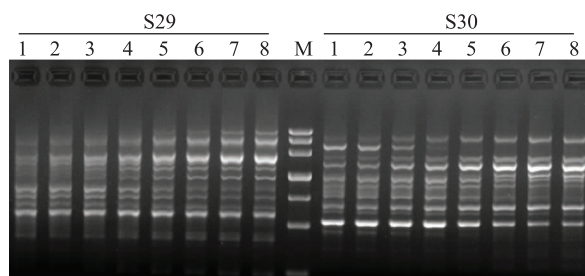
3.3 引物筛选及退火温度优化

以最佳反应体系对 36 条 SCoT 通用引物进行筛选, 重复 2 次初筛选出 14 条引物见下图 2, 进行 8 个退火温度梯度筛选, 根据信号强度判断条带, 采用区间温度对筛选的引物进行匹配最终获得在 53 °C, 56 °C, 57 °C, 59 °C 四个温度扩增下的 13 条引物。其中 S29 和 S30 号引物的退火温度梯度筛选如下图 3。



注: 1 ~ 36 分别为 S1 ~ S36 号引物。

图 2 36 条引物初筛电泳图

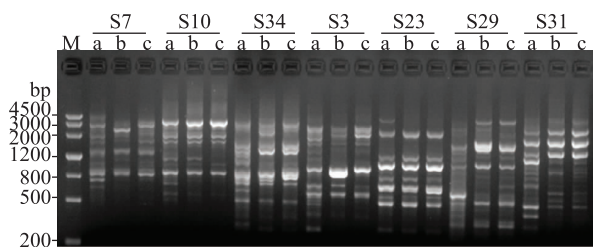


注: 1 ~ 8 分别为 50 °C ~ 60 °C 梯度温度。

图 3 S29 和 S30 在 8 个温度梯度下扩增电泳图

3.4 SCoT 扩增的多态性分析

以浙江, 四川, 安徽三个地域差异大的样品对退火优化后的 13 条引物进行多态性筛选, 最终获得 12 条扩增带型完整、清晰、多态性丰富的引物 (表 3)。利用这 12 条引物对 24 份材料进行 SCoT 扩增, 共获得总条带 121 条, 其中多态性条带共 77 条, 多态位点百分率共占 63.6%, 多态性比率较高, 在分子水平证实了白芍具有丰富的种内遗传多样性。

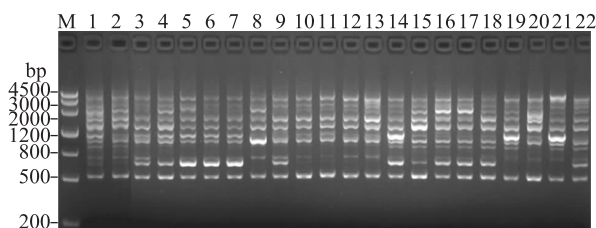


注: a. 安徽白芍; b. 四川白芍; c. 浙江白芍。

图 4 部分 SCoT 引物多态性筛选

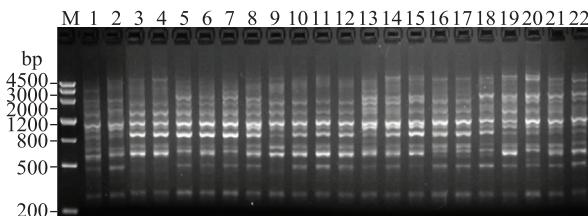
表 3 SCOT 引物扩增结果

引物名称	序列 (5'-3')	退火温度 (°C)	扩增条带数	多态性条带数	多态性比率 (%)
S3	CAACA ATGGC TACCA CCG	59	7	3	42.9
S6	CAACA ATGGC TACCA CGC	57	11	8	72.7
S10	CAACA ATGGC TACCA GCC	56	7	4	57.1
S16	ACCAT GGCTACCACC GAC	57	11	7	63.6
S20	ACCAT GGCTA CCACC GCG	53	10	8	80
S23	CACCA TGGCT ACCAC CAG	59	10	3	30
S25	ACCAT GGCTA CCACC GGG	57	12	8	66.7
S29	CCATG GCTAC CACCG GCC	59	13	9	69.2
S30	CCATG GCTAC CACCG GCG	53	11	9	81.8
S31	CCATG GCTAC CACCG CCT	59	10	7	70
S33	CCATG GCTAC CACCG CAG	57	10	7	70
S35	CATGG CTACC ACCGG CCC	56	9	4	44.4
合计			121	77	63.6



注: 1~22 为样品表中依次排序的 A1~J 号样品。

图 5 S6 引物对 22 份材料 SCoT-PCR 扩增电泳图



注: 1~22 为样品表中依次排序的 A1~J 号样品。

图 6 S25 引物对 22 份材料 SCoT-PCR 扩增电泳图

3.5 SCoT 标记的遗传相似性及聚类分析

利用 NTSYS 软件构建全部材料基于 SCoT 数据的 UPGMA 树状图, 结果如图 7。22 份材料两两之间的相似系数在 0.78~0.94 之间, 以相似系数 0.82 为阈值可将 22 份材料划分为 5 组, 浙江的 4 个样品 Z1-Z4 聚为一支; 四川的 4 个样品 C3、C4、C5、C6 聚为一支; 安徽 A1、A2 与四川 C1、C2 聚为一支, 说明安徽与四川白芍亲缘关系较近, 从地理位置分析可能由于白芍地方引种和杂交导致, 因此安徽白芍与四川白芍差异不大; 山东 B、C、J 三个样品聚为一支, 且与四川和安徽白芍亲缘关系较近, 可能因山东白芍多来源于栽培, 而栽培品种来源混杂, 从聚类树上可以初步认为部分山东白芍由四川或者安徽引种得来; 剩下 7 个的山东样品则聚为一组。

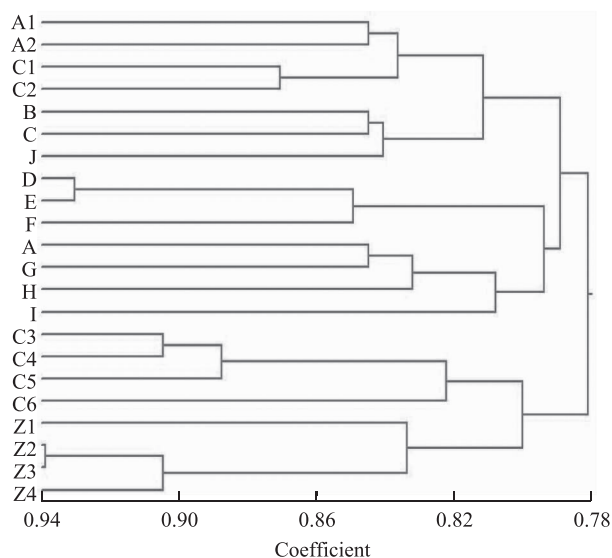


图 7 22 个不同产地白芍样品的聚类分析图

4 讨论

近年来, 采用分子生物技术对药材鉴别已成为趋势, 目前白芍及品种的分子鉴定仅出现 AFLP^[9]、

RAPD^[10-11]、ISSR^[12-13]、DNA 条形码^[14]的研究,然而尚未有关 SCoT 标记在白芍亲缘关系鉴定中应用的研究报道。其中周佐斌^[11]使用 ISSR 分析对白芍种质资源的遗传多态性分析,主要对浙江磐安白芍为主要研究对象,并以花色特征的种内变异为研究内容,发现浙江磐安白芍与外省居群分支明显。徐攀^[13]等人采用 DNA 条形码技术和随机多态性 RAPD 分子标记技术对 12 个不同品种白芍种质资源进行遗传多样性研究,发现 DNA 条形码分子标记在种内水平中并不能很好的区分相关的品种和品系,而 RAPD 分子标记的结果也证明了现有的白芍种质资源中存在较为丰富的遗传多样性。

SCoT 标记作为一种新型的基因分子标记,结合了 ISSR 和 RAPD 的优点,操作简单、重复性好、引物通用性强,实验成本较低。本实验从 36 条 SCoT 通用引物中最终筛选出 12 条清晰、条带丰富的作为不同产地白芍的 SCoT 分子标记的引物,验证了其稳定性及可靠性。引物扩增多态位点百分率占 63.6%,在分子水平证实了不同产地白芍具有丰富的种内遗传多样性,本研究通过 NTSYS 软件进行相似系数和 UPGMA 聚类分析,实现了对不同产地白芍 22 份样品的初步区分。不同地区白芍样品在聚类树上基本聚为一类,浙江、安徽白芍在聚类图上的聚类相对明显,且同产地内的白芍相似系数高。而安徽白芍与四川部分白芍则出现混种现象,同时部分山东白芍样品与安徽,四川两地部分样品亲缘关系近,这可能由于白芍经过短期引种和驯化导致品种间混杂现象。这对比研究结果表明 SCoT 技术能从分子水平上检测不同产地和居群之间白芍的基因差异,可以从基因水平把不同地区植株外型相似的白芍品种区分开,对新品种的选育有很大的意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:105.
- [2] 查良平,杨俊,彭华胜,等. 四大产地白芍的种质调查. 中药材. 2011,34(7):1037-1040.
- [3] 徐攀,梁卫青,周洁,等. 白芍种质资源的 DNA 分子标记研究[J]. 中华中医药学刊,2017,35(4):49-53.
- [4] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating genotyped markers in plants[J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27(1): 86-93.
- [5] 熊发前,唐荣华,陈忠良,等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点目的基因标记技术[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638.
- [6] 蒋巧巧,龙桂友,李武文,等. SCoT 结合克隆测序鉴别湖南甜橙变异类型[J]. 中国农学通报, 2011, 27(6): 148-154.
- [7] 赵瑞强,高燕会,章晓玲,等. 铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系构建及优化[J]. 核农学报, 2012, 26(4): 648-655.
- [8] 朱红霞. 牡丹、芍药品种 DNA 指纹图谱绘制的初步研究[D]. 北京:北京林业大学, 2004.
- [9] 陈丙奎,杭悦宇,周义峰,等. 白芍传统品种原植物遗传多样性及亲缘关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 17-21.
- [10] 来明达,陈莹,朱振洪,等. 不同居群白芍的 DNA 随机扩增多态性研究[J]. 中国现代医药杂志, 2012, 14(12): 4-6.
- [11] 周佐斌. 白芍原植物种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[D]. 南昌:南昌大学, 2007.
- [12] 蒋雨晗,张丽萍,周学刚,等. ISSR 分子标记在白芍亲缘关系的应用研究[J]. 世界科学技术, 2011, 18(3): 429-433.
- [13] 徐攀,梁卫青,周洁,等. 白芍种质资源的 DNA 分子标记研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(4): 429-433.
- [14] 桂腾琴,孙敏,乔爱民,等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系[J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108-112.

(收稿日期 2017-12-27)