

不同产地白及遗传多态性的 RAPD 分析

朱学鑫¹, 陈锐铎², 高承贤², 丁志山², 金波^{2*} (1.余姚市中医医院, 浙江 余姚 315400; 2.浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究国内不同产地白及的遗传多样性和亲缘关系。方法 利用随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)引物, RAPD 分子标记技术分析国内 50 个不同产地的白及。结果 RAPD 技术扩增产物经琼脂凝胶电泳检测, 从 50 条引物中筛选出 10 条(S8, S9, S14, S19, S23, S25, S28, S29, S30, S31)条带清晰的引物, 10 条引物共扩增出 88 条 DNA 条带, 其中多态性的 DNA 条带数目为 81 条, 占总数的 92.05%。每个引物能扩增出 5~11 条 DNA 条带, 平均可扩增出 8.8 条; 扩增最少的引物为 S19, 扩增出 5 条 DNA 条带; 扩增最多的引物为 S29, 扩增出 11 条 DNA 条带。而每个引物能扩增的多态性 DNA 条带数为 3~11 条, 平均可扩增出 8.6 条。结论 不同产地的白及具有较丰富的遗传多样性, RAPD 可有效应用于白及的遗传多样性研究。

关键词: 白及; 随机扩增多态 DNA; 聚类分析; 遗传多样性

中图分类号: R282.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)13-1648-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.13.010

引用本文: 朱学鑫, 陈锐铎, 高承贤, 等. 不同产地白及遗传多态性的 RAPD 分析[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1648-1651.

RAPD Analysis for Genetic Diversity of *Bletilla Striata* from Different Habitats

ZHU Xuexin¹, CHEN Nipi², GAO Chengxian², DING Zhishan², JIN Bo^{2*} (1.Yuyao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yuyao 315400, China; 2.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the genetic diversities and relationship of *Bletilla striata* from different habitats. **METHODS** Random amplified polymorphic DNA(RAPD) primers were used to analyze the *Bletilla striata* from 50 different areas with RAPD molecular marker technique. **RESULTS** The clear bands of S8, S9, S14, S19, S23, S25, S28, S29, S30 and S31 amplified by RAPD molecular marker technique and analyzed by agarose gel electrophoresis were screened from 50 primers. The 88 DNA fragments were amplified by these 10 primers and 92.05% of these DNA fragments were polymorphic. Each primer was able to amplify 5 to 11 DNA fragments with an average of 8.8 amplified. The amplification number of S19 primers was the least, only 5 fragments and the amplification number of S29 primers was the most with 11 fragments. Each primer was able to amplify 3 to 11 polymorphic DNA fragments with an average of 8.6 amplified. **CONCLUSION** There is obvious polymorphism and genetic difference among the *Bletilla striata* from different areas. RAPD markers exhibit efficiencies for fingerprinting *Bletilla striata* genotypes.

KEYWORDS: *Bletilla striata*; RAPD; cluster analysis; genetic diversity

白及(*Bletilla striata*)为兰科植物白及的干燥块茎, 归肺、肝、胃经, 有收敛止血、消肿生肌之功效^[1]。白及属于多年生草本植物, 别名连及草、紫兰、甘根等, 主要分布在浙江、贵州、四川、湖南、云南、安徽、陕西等地。现代研究表明, 白及含有大量的黏胶质, 具有止血活血、抗菌、抗溃疡、抗氧化、抗肿瘤、促进创面愈合等广泛的药理作用^[2-3]。白及外观清新优雅, 用药历史悠久, 既有较高的药用价值, 又有较高的观赏价值, 是我国现代医药和化妆品的重要原材料之一。

近年来, 随着白及市场需求的不断增加, 野生资源日渐枯竭, 且人工种植还未达到一定规模,

白及药材的价格不断上涨, 其混淆品也日渐增多, 使得药材质量参差不齐, 严重影响白及的开发利用与临床疗效, 然而传统的鉴别方法又无法提供药材间的本质差异及道地性, 故需寻找一种新的鉴别方法。随着分子生物学的发展, 分子标记技术已广泛应用于中药遗传关系的研究中, 为药材物种的分类鉴定和道地性研究提供了更为准确的途径。随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术便是常用的 DNA 分子标记技术之一, 是一种用来研究物种基因组多态性的新方法, 能反映群体或物种之间基因组的微小差异^[4-5], 具有操作简单、灵敏度高和多态

基金项目: 国家中医药管理局中药饮片质量保障体系研究(201507002)

作者简介: 朱学鑫, 男, 博士 Tel: 13666600557 E-mail: 13666600557@163.com *通信作者: 金波, 女, 副教授 Tel: (0571)86613666 E-mail: jinbo@zcmu.edu.cn

性丰富等优点, 常用于药用植物种内、种间系统学研究。

因此, 本实验采用 RAPD 技术对 50 个不同产地白及的遗传多样性进行研究, 探讨品种之间的亲缘关系, 为更加科学地鉴别白及提供新方法, 为白及良种选育和综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 本实验所用的白及样品来源于安徽、陕西、湖北、江西、浙江等 50 个不同地域, 由浙江中医药大学丁志山教授进行鉴定, 50 个样品的产地和种属见表 1。

表 1 50 个白及样品的产地和种属

Tab. 1 Sources of 50 populations of *Bletilla striata*

编号	来源地	编号	来源地
1	安徽省黄山市黄山区	26	湖北十堰(白花)
2	安徽省宣城市泾县琴溪镇	27	浙江丽水缙云县
3	云南文山	28	安徽(巨茎)
4	湖北黄冈市(紫花)	29	重庆市綦江区中峰镇
5	湖北襄阳市保康县(紫花)	30	四川巴中市大巴山
6	陕西汉中(白花)	31	河南省南阳市西峡县西坪镇
7	湖南张家界(紫花)	32	四川宜宾江安县怡乐镇薄刀岭
8	江西萍乡(紫花)	33	湖北荆门市京山县(紫花)
9	湖北武穴市梅川镇	34	湖北荆门市京山县(白花)
10	浙江龙泉市	35	湖北襄阳市保康县(白花)
11	安徽宣城	36	云南丽江
12	陕西留坝县玉皇庙	37	四川宜宾屏山县 B(小块茎)
13	陕西镇安县回龙镇	38	陕西留坝勉县家种
14	河南卢氏县(紫花)	39	贵州正安
15	陕西渭南	40	广西钦州
16	云南楚雄	41	湖北五峰土家族自治县牛庄乡
17	广西桂林	42	湖北省蕲春县
18	安徽金寨	43	江西宜春
19	浙江台州天台县街头镇	44	安徽铜陵
20	陕西留坝县野生(紫花)家种	45	贵州六盘水市六枝特区堕脚乡
21	湖北(黄花)	46	广西河池市南丹县
22	湖北随州	47	陕西安康市旬阳县
23	四川广元	48	云南红河建水(小块茎)
24	贵州省赤水市旺隆镇	49	浙江杭州淳安县威坪镇
25	浙江龙泉市	50	浙江金华磐安县安文镇

1.1.2 仪器与试剂 FFG02HSD PCR 仪(英国 Techne 公司); ZF-90 型暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂); 冷冻台式高速离心机(德国 Heraeus 公司); 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); PB602-N 电子精密天平(Mettler-Toledo)。

Agarose(西班牙 BIOWEST, 批号: 111860); RAPD Primers、Taq 酶(批号: 20170822)、dNTP(批号: 20170718)和 100 bp marker(批号: 20160921)均来自宝生物工程有限公司; Tris base(批号:

2352C062)、Arc(批号: 2175T325)和 Bis-arc(批号: 2179T347)均购自美国 Amersco 公司; 溴酚兰(上海赛百胜公司, 批号: 150818)。

1.2 方法

1.2.1 样品基因组 DNA 的提取与纯度检测 每个产地的白及分别随机取 5 株以上的幼嫩叶, 约 50 mg, 置研钵中碾碎, 期间不断加入液氮, 磨成细粉, 放入 1.5 mL 离心管中, 采用改进过的十六烷基三甲基溴化铵(cetyltriethyl ammonium bromide, CTAB)法提取试验材料的基因组 DNA。取提取的样品 DNA 溶液 10 μ L 在 1.0%琼脂糖上进行电泳分析, 并在紫外灯下进行观察拍照。

1.2.2 RAPD-PCR 引物筛选 利用宝生物工程有限公司合成的系列引物共 50 条, 25 μ L 反应体系进行扩增筛选。每条引物用若干样品 DNA 模板筛选出电泳条带清晰、稳定、多态性强、重复性好的 10 条引物用于后续遗传多态性分析。

1.2.3 RAPD-PCR 扩增 以 50 个不同产地的白及 DNA 为模板, 分别用 10 条不同引物进行扩增。RAPD 反应总体系为 25 μ L: ddH₂O 15.5 μ L, 10 $\times$ Reaction Buffer 2.5 μ L, 4 种 dNTP 混合物 2.0 μ L, 随机引物 2.0 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, Taq 酶 1.0 μ L。在 PCR 扩增仪中进行扩增, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 条件预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s、37 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取扩增产物 10 μ L 在 1.0%琼脂糖进行电泳分析, 最后在紫外灯下进行结果观察并拍照。

1.2.4 数据处理 统计扩增后多态性条带数及总条带数, 标记电泳图谱上的每一条条带, 若是有着相同的位点, 则认为不同样本凝胶上的泳动距离是相同的。将所有的位点根据分子标记法标记有或无, 通过二元数据表示, 无带的记“0”, 有带的记“1”(无论强弱), 采用 NTsys-pc 2.1 软件中聚类分析方法进行分析, 遗传距离用任意的 2 个样品之间的遗传相似性系数表示, 最后根据得出的遗传距离推断出 50 个不同产地白及间的遗传关系树状图^[6-7]。

2 结果

2.1 样品基因组 DNA 提取结果

将来自 50 个不同产地的白及嫩叶, 经改良 CTAB 法提取获得白及样品基因组 DNA, 1.0%琼脂糖电泳检测发现白及样品的基因组 DNA 主带明

显，并在紫外灯下进行观察拍照，部分样品结果见图 1。经紫外分光光度计检测，提取的基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.71~1.92，说明 DNA 质量较高，有利于进行下一步的 RAPD 扩增试验。



图 1 部分白及样品基因组 DNA 电泳图
Fig. 1 Electropherogram of template DNA from part samples of *Bletilla striata*

2.2 RAPD 扩增结果

对 50 条随机引物进行筛选，结果显示共有 39 条引物能扩增出条带，占总数的 78%，并从中挑选出 10 条能扩增出清晰、重复性好的多态性条带的引物(S8, S9, S14, S19, S23, S25, S28, S29, S30, S31)，部分引物筛选见图 2。

10 条引物(具体碱基序列见表 2)用于后续 50 个不同产地白及基因组 RAPD 扩增，扩增结果在琼脂糖凝胶电泳上进行电泳分析，部分结果见图 3。10 条引物进行扩增共得到 88 条条带，平均每个引物产生 8.8 条，其中多态性谱带 81 条，多态性比率为 92.05%，扩增条带数最少的为引物 S19, 5 条；扩增条带数最多的为引物 S29, 11 条。而每个引物能扩增的多态性 DNA 片段为 3~11 条，平均可扩出 8.6 条。

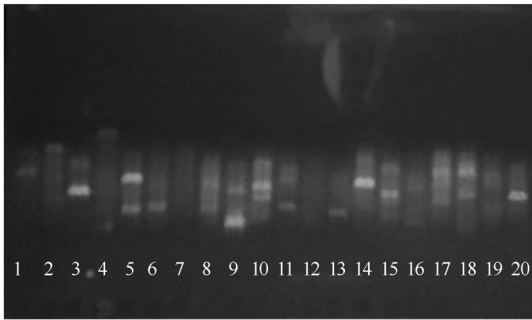


图 2 部分引物筛选图
Fig. 2 Results of primer screening

2.3 RAPD 系统聚类分析

依据遗传相似性系数，计算不同产地白及间的遗传距离，遗传距离越小，则表明白及的亲缘关系越近，遗传距离越大，则表明白及的亲缘关系越远。利用 NTsys-pc 2.1 软件对 10 条引物的扩增结果进行聚类分析，绘制出不同产地白及样品间的聚类系统图，见图 4。

表 2 10 条条带清晰、多态性明显的 RAPD 引物

编号	碱基序列(5'-3')
S8	AGTCAGCCAC
S9	AGGGGTCTTG
S14	TGGGGGACTC
S19	CTGCTGGGAC
S23	GTTTCGCTCC
S25	GTCCACACGG
S28	AATCGGGCTG
S29	AGCCAGCGAA
S30	TGCCGAGCTG
S31	GACCGCTTGT

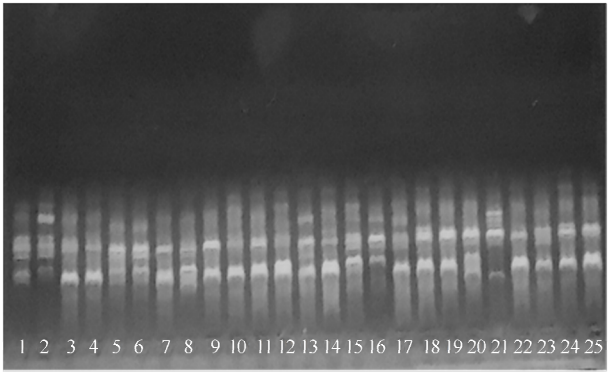


图 3 部分白及样品 RAPD 扩增结果
Fig. 3 RAPD amplification results of primers for part of *Bletilla striata*

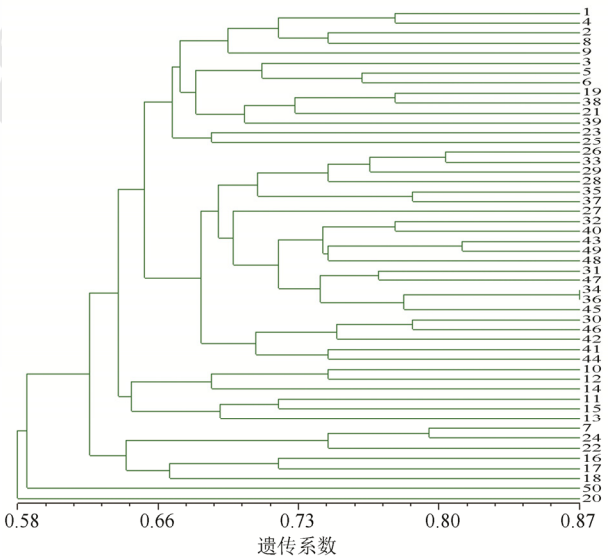


图 4 聚类分析结果图
Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis result

结果显示，50 个白及样品在遗传系数 0.58 的水平上共聚类为 2 大类群：I 类和 II 类。II 类为 20 号样品，来自陕西留坝县野生(紫花)家种，与其他样品的遗传距离较远。其他白及样品均为 I 类，在相似性系数 0.66 标准时，又可将剩余样品进一步分为 7 小类，第一类仅有 50 号样品；第二类为 16, 17, 18 号样品；第三类为 7, 22, 24 号样品；第四类为 11, 13, 15 号样品；第五类为 10, 12,

14 号样品; 第六类为 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 号样品; 第七类为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 19, 21, 23, 25, 38, 39 号样品。

3 讨论

白及是我国珍贵的中药材之一, 近年来, 随着白及市场需求的不断增加、价格也快速上涨, 由于人们过多采挖, 使白及野生资源遭到毁灭性的破坏^[8]; 而白及种子发育不完全, 在自然界中很难萌发, 且生长年限较长; 使市面上白及的来源复杂, 以次充好, 混乱现象较为严重, 因此对白及种质资源的有效评价和保护势在必行。目前对白及的种质资源研究主要集中在形态学方面, 对于亲缘关系较近且形态学性状差异较小的白及, 无法区别亚种间的亲缘关系, 因此迫切需要寻找新的、有效的鉴别方法来进行遗传关系方面的研究。

种质资源是植物育种和遗传改良的基础, 其多样性主要是由植物 DNA 片段的改变而导致物种间和物种内的遗传多样性^[9]。分子标记技术不受环境和植物发育期间的影响, 是揭示 DNA 序列多态性和检测基因变异的理想研究方法, 常作为重要研究手段广泛应用于植物资源研究中。其中, RAPD 技术是一种基于遗传物质 DNA 扩增后进行多态性及其指纹研究的分子标记技术, 与其他 DNA 技术相比较, 具有操作简便、灵敏度高、多态性丰富等优点, 是研究遗传多样性的重要技术^[10]。由于生物的进化, 使基因组 DNA 的某些区域表现出一定的保守或变异并产生遗传上的多样性。因而在扩增条件相同的情况下, 不同种属的个体基因组成相差明显, 扩增产物呈现不同电泳条带类型, 同种内不同个体由于基因突变、插入、缺失或置换来影响引物的特定结合位点, 导致 DNA 扩增条带增多、减少或长度改变, 而同一引物的扩增产物中电泳迁移率一致被认为具有同源性, 因此它不仅反映生物个体之间的遗传稳定性, 同时也能清晰敏感地反映出变异性。RAPD 方法可以检测物种的遗传多样性, 研究物种之间的亲缘关系和进化趋势; 可以在遗传水平上了解中药多样性与物种、生态与地理分布的关系, 挖掘潜在资源^[11-14]。

本研究收集了 50 个不同产地的白及, 利用筛选出的 10 条引物进行 RAPD 分析, 结果表明, 50 个不同产地白及表现出丰富的遗传多样性, 10 条 RAPD 引物获得的多态性比率为 90.25%, 遗传相

似系数 0.58~0.87, 其中 34 号湖北荆门市京山县(白花)白及与 36 号云南丽江白及的遗传距离较近, 遗传相似系数为 0.87, 而 20 号陕西留坝县野生(紫花)家种白及, 与其他样品的遗传距离较远, 遗传相似系数为 0.58。

利用 RAPD 技术对常见的白及品种进行遗传多样性研究, 并对现有白及样品的亲缘关系进行分析, 为现有白及的优良种质资源研究奠定基础, 有利于白及野生资源的保护和白及资源的可持续开发利用。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2015: 103.
- [2] WANG C Q, XIA T, CHEN H, et al. Metabolism of militarine component of the effective fractions of *Bletilla striata* in zebrafish [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(4): 467-472.
- [3] WAN D Q, ZHAO R Q, LIU H, et al. The constituents, pharmacological action and clinical application of *Bletilla striata* [J]. China Pharm(中国药业), 2017, 26(2): 93-96.
- [4] KALKIŞIM O, OKCU M, OKCU Z, et al. Relationships among some pears genotypes(*Pyrus communis* L.) based on ISSR and RAPD analysis [J]. Erwerbs-Obstbau, 2016, 58(4): 259-264.
- [5] WANG P F, LI L F, DU J J, et al. Genetic diversity among wild Chinese dwarf cherry from different regions and its closely related plant species based on RAPD analysis [J]. J Plant Genet Resour(植物遗传资源学报), 2015, 16(1): 119-126.
- [6] XU P, LIANG W Q, ZHOU J, et al. Research on DNA molecular markers in germplasm resources of *Paeonia lactiflora* Pall. [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2017, 35(4): 949-953.
- [7] 王健胜, 侯桂玲, 谢永凤. 国内外苜蓿品种遗传多样性 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 35-38.
- [8] 周涛, 江维克, 魏升华, 等. 野生白芨的资源调查和利用现状分析[C]//中华中医药学会第九届中药鉴定学术会议论文集. 浙江建德, 2008: 270-279.
- [9] LU X X. Design and construction of plant germplasm Banks [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 2006, 23(1): 119-125.
- [10] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [11] TAN Y, LI Z H, LI J L, et al. Application of RAPD molecular marker technology in plant research [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2013, 41(25): 10236-10238.
- [12] MA Y Z, CHEN G P. Analysis of genetic diversity in eleven varieties of *Schizonepeta tenuifolia* by RAPD [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2017, 40(2): 311-314.
- [13] LI M, HUANG L M, CHEN Q. The screening of *Ohplopogon Japonicus* molecular marker by RAPD analysis [J]. J Zhejiang Univ Technol(浙江工业大学学报), 2014, 42(5): 504-508.
- [14] HU T M, HAN B, HU X N, et al. Analysis of genetic relationship of 42 Alfalfa varieties by RAPD [J]. J Northeast Agric Sci(东北农业科学), 2017, 42(5): 30-35.

收稿日期: 2018-06-15

(本文责编: 曹粤锋)