

# 野葛种质资源的随机扩增多态性 DNA 技术分析

纪宝玉, 裴莉昕, 陈随清\*, 董诚明, 冯卫生  
(河南中医学院药学院, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的: 建立野葛 RAPD 分子标记技术并对野葛种质资源遗传背景进行探讨。方法: 结合葛根素的测定, 应用 RAPD 技术对 11 个产地野葛进行遗传多样性分析。结果: 葛根素含量在 3.26% ~ 7.10%, 8 条引物共扩增出 45 条带, 其中 37 条呈多态性, 发现 RAPD 多态位点为 82.22%, 证明在野葛种质资源中存在较丰富的遗传多样性。结论: 我国野葛具有明显的遗传分化, 这些遗传分化是野葛种质资源筛选的关键。

**[关键词]** 野葛; 葛根素; 遗传多样性; 随机扩增多态性 DNA

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0056-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160056

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0947.112.html>

**[网络出版时间]** 2014-06-26 10:37

## RAPD Analysis of Germplasm Resource in *Pueraria lobata*

Ji Bao-yu, PEI Li-xin, CHEN Sui-qing\*, DONG Cheng-ming, FENG Wei-sheng

(School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study aimed to establish the RAPD molecular marker system and to probe into the genetic background of *Pueraria lobata*. **Method:** RAPD analyses of selected plants from eleven various habitats in China were carried out using arbitrary primers, in combination with the chemical investigation of puerarin. **Result:** The percentage of puerarin ranged from 3.26% to 7.10%. A total of 45 DNA fragments were obtained using 8 primers, 37 of which were polymorphic, accounting for 82.22%, which can tell that the samples had a high level of genetic diversity. **Conclusion:** *P. lobata* has significant genetic differentiation that further support the prospects for germplasm selection.

**[Key words]** *Pueraria lobata*; puerarin; genetic diversity; random amplified polymorphic DNA

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi 的干燥根, 有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻之功效<sup>[1]</sup>。研究证实, 葛根含有多种异黄酮类成分, 主要活性成分有葛根素、大豆苷、和大豆苷元等化合物<sup>[2-3]</sup>, 具有扩张冠状动脉血管、增加冠状动脉血流量、降低血压等作用。野葛在我国分布广, 资源丰富, 但因产地不同而导致药材质量参差不齐<sup>[4-5]</sup>。随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术是 Williams<sup>[6]</sup> 和 Welsh<sup>[7]</sup> 于 1990

年在聚合酶链式反应 (PCR) 基础上发展起来的一种新型遗传标记技术。它以任意顺序寡核苷酸单链为引物, 对所研究的基因组 DNA 进行随机扩增, 通过对 PCR 产物的检测和比较, 可以识别基因组 DNA 多态性片段<sup>[8]</sup>。其技术简便易行, 可用于不同物种基因组的分析。在研究生物多样性、物种进化关系、遗传图谱作图、目的基因定位等方面发挥了巨大的作用。RAPD 分子标记技术由于其检测涉及整个基因组, 位点多, 不受材料和环境条件的影响而被广泛

**[收稿日期]** 20130922(006)

**[基金项目]** 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21000); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A360557)

**[第一作者]** 纪宝玉, 硕士, 讲师, 从事中药规范化种植及质量标准研究, Tel: 13607669844, E-mail: 584810680@qq.com

**[通讯作者]** \* 陈随清, 博士, 教授, 从事中药品种整理及质量标准研究, Tel: 0371-65676686, E-mail: suiqingchen@sohu.com

应用于作物遗传育种的各个方面。

本研究结合葛根素含量测定,应用 RAPD 技术分析全国各地主产区野葛间的遗传多样性及相互关系,筛选优质的野生葛根种质资源,对将来野葛的规范化种植、选育、生物技术应用等方面都有重要意义。

## 1 材料

**1.1 样品** 2008 年 7 月采集 11 个地区野葛,每个地区随机选取 10 株成熟植株,取幼嫩叶片,用变色硅胶快速干燥,用于 RAPD 分析;采挖其根,用于葛根素测定。采集地分别为:辽宁鞍山市( $G_1$ )、浙江天台市( $G_2$ )、河南栾川县( $G_3$ )、河南西峡县( $G_4$ )、河南南召县( $G_5$ )、湖北恩施州( $G_6$ )、河南安阳市( $G_7$ )、河南灵宝市( $G_8$ )、河南平顶山市( $G_9$ )、河南辉县市( $G_{10}$ )、云南普洱市( $G_{11}$ )。

**1.2 仪器与试剂** 9700 型 PCR 扩增仪(GeneAmp PCR System, Applied Biosystems),凝胶分析系统(AmpGene,北京鼎永科技有限公司),DYY-III-12B 型三恒多用电泳仪和电泳槽(北京六一仪器厂),KDC-160HR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),琼脂糖(Agarose,OXOID 公司,批号 900570),*Taq* DNA 聚合酶,10xBuffer,  $MgCl_2$ , dNTP, 溴酚蓝, DNAMarke: DL1000(批号分别为 090112, 090712, 090712, 314J1012, 100722, 100813) 随机引物均由上海生工提供。

## 2 方法

**2.1 总 DNA 提取** 分别精密称取 1.1 项下样品 0.25 g 放入研钵,加入 10% PVP 粉末,倒入液氮,研磨成粉末状,置入 5 mL 离心管中,加入 3 mL 冷藏的提取缓冲液( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.00),混匀,冰上放置 10 min;离心,弃去上清液,重复操作 1 次,加入 3 mL 65 °C 预热的  $2 \times$  CTAB( $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-cl pH 8.0,  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, pH 8.0, 2% CTAB) 抽提液和 80  $\mu\text{g}$   $\beta$ -巯基乙醇,65 °C 水浴保温 2 h(其间每 20 min 摇动 1 次);将离心管放置在冰上降温至 55 °C,离心,取上清液,加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24:1),混匀,4 °C,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min;取上清液,加入等体积三氯甲烷/异戊醇,混匀,4 °C,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min;重复三氯甲烷/异戊醇抽提 3~5 次;取上清液,加入 0.6~1.0 倍体积的异丙醇,放置 -20 °C 冰箱中 30 min,观察沉淀生长,4 °C,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min;收集沉淀,加入 200  $\mu\text{L}$  75% 乙醇洗涤沉淀,4 °C,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,弃上清液;重复洗涤 1 次,得沉淀;将装

有沉淀的离心管放在真空干燥器中干燥 10 min,以抽干乙醇(不能太干燥,否则 DNA 不易水溶);用 50  $\mu\text{L}$  去离子水溶解 DNA 沉淀,-20 °C 冰箱保存。

**2.2 引物筛选** 选取了 100 个上海生工公司生产的 S 系列引物进行筛选,从中选出 8 个条带清晰、重复性好、多态性强的引物,进行全部样品的 PCR 扩增。筛选出的 8 个随机引物及碱基序列见表 1。

表 1 8 个随机扩增引物及 RAPD 标记数

引物	序列	总带数	多态性带数
S17	AGGGAACGAG	7	6
S24	AATCGGGCTG	5	4
S201	GGGCCACTCA	5	4
rS632	AACCGGGACT	8	7
rS680	GTTGCCTTGA	6	5
rS1053	CAGCCGTTCC	5	4
rS1058	GGCTAGGTGG	6	5
rS1307	AGCCCCAAG	3	2
rTotal	8	45	37

**2.3 PCR 反应** 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ :模板 DNA ( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ ,引物 ( $2 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 5.0  $\mu\text{L}$ ,*Taq* 聚合酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ ,dNTP ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2.0  $\mu\text{L}$ , $MgCl_2$  ( $25 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 1.2  $\mu\text{L}$ ,10 × Buffer 缓冲液 2.0  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 6.9  $\mu\text{L}$ 。

扩增程序为:预变性 94 °C,4 min;40 个循环为 94 °C,1 min;36 °C,1 min;72 °C,1 min;后延伸 72 °C,7 min;4 °C 保温。

检测:取 10  $\mu\text{L}$  扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溴乙锭),在凝胶成像系统中紫外显色照相。

**2.4 数据处理** 根据形成的“0”与“1”的数据矩阵(强带计为 1,弱带或无带计为 0),利用 NTSYSpc (2.10) 软件统计数据,按照 UPGAM (unweighted pair-group method arithmetic mean) 方法进行聚类分析,用 Treeplay 功能建立样品间的亲缘关系树状图。

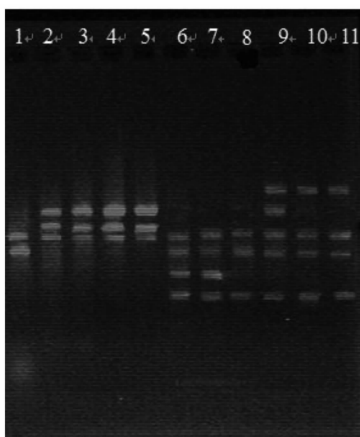
**2.5 葛根素含量测定** 按照《中国药典》方法测定<sup>[1]</sup>,方法学考察结果均符合要求。

## 3 结果与分析

**3.1 不同地区葛根中葛根素含量测定** 结果分别为 4.82% ( $G_1$ ),4.06% ( $G_2$ ),6.61% ( $G_3$ ),5.92% ( $G_4$ ),4.57% ( $G_5$ ),7.10% ( $G_6$ ),6.78% ( $G_7$ ),5.13% ( $G_8$ ),3.26% ( $G_9$ ),4.24% ( $G_{10}$ ),5.39% ( $G_{11}$ )。

各地区中葛根素差异较明显,各地区间相差达 2 倍多,含量较高的样品 ( $>6.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ),分别出现在 3 个地区(河南栾川、湖北恩施、河南安阳),其中湖北恩施的葛根素含量达最高值 ( $7.10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )。浙江天台、河南平顶山地区葛根素含量较低 ( $4.24, 3.62 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )。葛根素含量高的野葛在生长环境上有一定区别,主要表现为生长环境海拔高、水源和阳光充足,并且大面积生长在一起。在含量最高的湖北恩施,山区里的野葛成片生长,每片面积大约有 300 ~ 500 亩。叶片大小明显大于其他地区。葛根素含量较低的野葛生长环境一般为低海拔地区,虽然水源和阳光相对充足,但野葛生长面积少,一般只是 2 ~ 4 棵生长在一起。

**3.2 多态性分析** 选用了上海生工公司生产的 100 个 S 系列引物进行了筛选,从中选出了 8 个条带清晰、重复性好、多态性强的引物,进行全部样品的 PCR 扩增,总计扩增出 45 条带,其中多态性谱带 37 条,多态性比率为 82.22%。见图 1。



1 ~ 11. 样品

图 1 引物 S17 对不同产地野葛扩增结果

**3.3 聚类分析** 由扩增结果对不同产地葛根药材的进行聚类分析,见图 2。

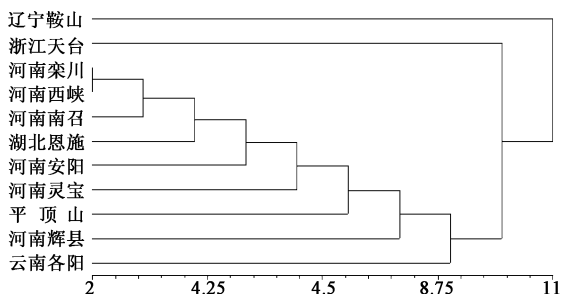


图 2 不同产地野葛的 RAPD 聚类分析

由图 2 可以看出,不同产地葛根药材聚为三大类,河南地区和湖北地区聚为一类,辽宁和浙江各自聚为一类。这说明亲缘关系和地理分布距离相关,河南与湖北相邻,遗传关系最近,而且与整个河南地区聚为一类,辽宁和浙江分别位于河南东北部和南部,3 个省的地理分布距离较远,所以分别聚为一类。地理分布距离越近的样品,在聚类树状图上的距离越近,说明他们之间的遗传背景差异越小,亲缘关系越近,反之越远。

**3.4 与葛根素含量相结合的 RAPD 分析** 由图 2 可以看出,湖北恩施 (7.10%) 与河南安阳 (6.78%) 葛根素含量最高,成分间差异不显著,遗传关系也最近。而葛根素量高的地区如湖北恩施 (7.10%) 与葛根素量低的地区如河南南召 (4.57%) 之间遗传相似性水平也接近。同样,河南灵宝 (5.13%) 与河南平顶山 (3.26%) 遗传相似性也较高,但葛根素含量差异却较为明显。以此可说明不同地区葛根药材中葛根素含量与样品间的遗传相似性无显著关系。

#### 4 讨论

野葛属于缠绕性植物,山区中小气候较多,植被种类多,可供缠绕攀附的高大木本植物也相对较多,因此在山区野葛属于优势群落;而在丘陵、平原或盆地地区,可供其攀附的植物较少,其缠绕他物的生长习性就会受到抑制,植物外观的形态学特征也会发生相应的变化。野葛长期受不同地区的气候、土壤等各种生态环境的影响,形成不同的遗传分化<sup>[9]</sup>。因药用植物的生长发育会按其固有的遗传信息所编排的程序进行,每一种植物都有自己独特的生物发育节律,植物遗传差异是造成品质变化的内因。正所谓量变决定质变,基因型变化,药用植物的化学成分必然会随之改变<sup>[10]</sup>。可见,野葛的化学成分含量必然会受此影响而降低。因此,药用植物在进行规范化种植、异地引种和野生抚育时应充分尊重药用植物本身的生态适应性、生物习性和产地适宜性原则。

在对药材质量形成机制的研究中,有学者认为主要的机制有:种质主导型、生境主导型、技术主导型、传媒主导型和多因子关联决定型<sup>[11]</sup>,从实验的研究结果看,葛根药材的质量影响因素中,各地区野葛质量的形成机制可能属于种质主导型<sup>[12]</sup>。因我国除青海、新疆、西藏以外的各省区均有自然分布,这结论非常符合野葛分布广、适应性很强的特点,说明我国野葛群体中虽具有较丰富的遗传多样性,但这些遗传分化对化学成分的影响却不明显,基

因型与环境之间相互作用力也较差。当一个种具有较广的分布区时,它的各个不同地区的居群往往具有不同的基因型,或称为地方性特化基因型(local specialized genotype),而这些基因型是由于不同的生态和地理的条件长期选择作用塑造而成,是产生“道地药材”的遗传本质<sup>[13]</sup>。本研究在道地药材和葛根素“高产育种”的基础上筛选优质的野葛种质资源,为将来在规范化栽培、优良品种选育、现代最前沿生物技术应用以及在全国各地成功推广种植提供理论依据,以达到“安全、有效、稳定、可控”的最终目的。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:312.
- [2] 董英,徐斌,林琳,等. 葛根的化学成分研究[J]. 食品与机械,2005,21(6):85.
- [3] 李晓明,杨滨,黄璐琦,等. 高效液相色谱-质谱联用分析鉴别葛根的异黄酮成分[J]. 中国中药杂志,2008,33(11):1337.
- [4] 迟霁菲,张国刚. 高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素的含量[J]. 中南药学,2006,4(4):307.
- [5] 仲英,丁杏苞,左春旭,等. 高效液相色谱测定葛根不同生长季节葛根素的含量与质量[J]. 中草药,1992,23(6):294.
- [6] Williams JG K, Kubelik A R K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful gene markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(10):6531.
- [7] Welsh J, McClell, M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18:7213.
- [8] 李艳萍,赵熙,侯宗柳. 现代分子生物技术在现代中药学中的应用[J]. 云南中医中药杂志,2003,24(6):36.
- [9] 郑丽屏,王剑文,谭仁祥. 黄花蒿种质资源的 RAPD 分析[J]. 中草药,2007,38(4):602.
- [10] 郭巧生. 药用植物栽培学[M]. 北京:高等教育出版社,2004.
- [11] 肖小河,夏文娟,陈善墉. 中国道地药材研究概论[J]. 中国中药杂志,1995,20(6):323.
- [12] 石张燕,陈千良,赵宇玮,等. 陕西产秦艽质量变异与遗传多样性研究[J]. 中草药,2010,41(10):1705.
- [13] 黄璐琦,杨滨,王敏,等. 当前我国药用植物资源开发利用研究中几个问题的探讨[J]. 中国中药杂志,1999,24(2):70.

[责任编辑 顾雪竹]

## 参考文献的正确书写格式

文献类型标识:期刊[J],普通图书[M],专利[P],学位论文[D],会议录[C],汇编[G],标准[S],报告[R]

### 1 期刊

[1] 王静,袁子民,张振秋,等. 五味胃康胶囊的质量标准研究[J]. 中成药,2008,30(12):1870.

### 2 论著

[2] 张志耘. 中国植物志. 第69卷[M]. 北京:科学出版社,1990:125.

### 3 专利

[1] 西安电子科技大学. 光折变自适应光外差探测方法:中国,01128777. 2[P]. 2002-03-06[2002-05-28]. <http://211.152.9.47/sipoasp/zljs/>

### 4 电子文献

[1] 萧钰. 出版业信息化迈入快车道[EB/OL]. (2001-12-19)[2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/200112190019.htm>.