

# RAPD 技术在葛属药用植物分类和鉴定中的应用

第二军医大学药学院 (上海 200433) 曾 明\* 严继舟\*\* 张汉明 郑水庆 苏中武

**摘 要** 为探讨葛属植物间的亲缘关系,并为分类和鉴定提供依据,采用 RAPD 技术对葛属 6 种植物进行分析,利用 RAPD (Version 4.0) 及 PHYLIP (Version 3.5 C) 软件包进行数据处理,UPGMA 法聚类分析得到系统树。结果发现,峨嵋葛与野葛间的遗传距离小,应归并为野葛,野葛与粉葛、山葛间的遗传距离大,粉葛、山葛应独立成种。DNA 指纹图谱可用于葛属植物间的鉴别。

**关键词** 葛属 分类 鉴定 RAPD

## Classification and Authentication of Plant *Pueraria* DC in China Using RAPD

College of Pharmacy, Second Military Medical University (Shanghai 200433) Zeng Ming, Yan Jizhou, Zhang Hanming, Zheng Shuiqing and Su Zhongwu

**Abstract** To explore the affinity relation of *Pueraria* DC plants and to provide evidence for their classification and authentication, RAPD analysis was performed on 6 species of *Pueraria* DC found in China. The DNA fingerprints was analysed with the aid of RAPD (Version 4.0) and PHYLIP (Version 3.5 C). The results showed that the genetic distance of *P. omeiensis* was close to *P. lobata*, while that between *P. lobata* and *P. thomsonii* and *P. montana* were longer in evolution. Therefore, it could be concluded that *P. thomsonii* and *P. montana* were not the variants of *P. lobata*, but was another independent species. RAPD amplification fingerprinting can also be used to identify *Pueraria* DC plants.

**Key words** *Pueraria* DC. classification authentication RAPD

葛根是一种常用的中药,来源于豆科植物野葛

*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 粉葛 *P. thomsonii* Benth. 的干燥的根。葛属植物中野葛 *P. lobata* (Willd.) Ohwi 粉葛 *P. thomsonii* Benth.、山葛 *P. montana* (Lour.) Merr. 及峨嵋葛 *P. omeiensis* Wang et Tang,由于植物形态的相近,在其分种的界限及亲缘关系上一直存在争议。90年代以来,RAPD 标记广泛应用于动植物遗传育种,基因诊断,居群遗传学,生物系统与进化研究。就传统方法而言,植物体内个体之间的遗传鉴定以及亲缘关系是综合考虑其形态学特征或是通过生物化学方法检测(如同工酶分析)来确定的。但这些方法容易受到环境的影响,而且人们对其评估遗传亲缘关系的总体可靠性也存在一些争议(Gotlieb<sup>[1]</sup>,Brown<sup>[2]</sup>),因此目前人们普遍认为 DNA 水平上的多态性信息对于评判遗传多样性来说是可靠而可行的。为此,我们试用 RAPD 技术对以上 4 种植物以及分种明确的葛属的其它 2 种植物进行了对比研究,以确定它们之间的分类位置,并为中药葛根的鉴别提供一种新的方法。

### 1 材料

取葛属 6 种植物的干燥成熟叶,拉丁学名经作

者鉴定,见表 1。

### 2 实验方法

#### 2.1 DNA 的提取

2.1.1 试剂: 2× CTAB 提取缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0); 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA; 2% 十六烷基三甲基溴化铵; 0.5% 2-巯基乙醇; 1.5% PVP (MW 40 000); 3 mol/L NaAc (pH5.2),异丙醇。TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA。5× TBE 缓冲液: 54 g Tris, 碱: 27.5 g 硼酸, 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0); 加蒸馏水至 1 000 mL。

引物由上海 Sangon 有限公司合成,见表 2。

2.1.2 方法: 参考文献<sup>[3]</sup>加以改进。硅胶干燥后的干叶,置研钵中,用液氮冷却碾碎。取 100 mg 加入 6 倍预热至 56℃ 的 CTAB 提取缓冲液,10<sup>μ</sup>L Proteinase K, 4<sup>μ</sup>L RNaseA 及 10<sup>μ</sup>L 2-ME 水浴中温育 30 min。加等体积 Cl<sub>2</sub>(24:1)抽提,1 500 g 离心 10 min。取上清液加 2/3 体积的异丙醇及 1/10 体积的 3 mol/L NaAc,倒置完全混匀,0℃ 放置 20 min,以 1 000 g 离心 10 min,倾去上清液,用 80% 和 70% 乙醇洗 DNA 两次,室温干燥 30 min,加适

\* Address: Zeng Ming, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai  
现在华东师范大学生命科学院博士后流动站

\*\* 第一军医大学热带病研究所

表 1 基因组 DNA的纯度和浓度

| 基 原                         | 产地   | 采收期<br>(年 月 日 ) | 凭证标本号 | 纯度    | 浓度<br>(ng $\mu$ L) |
|-----------------------------|------|-----------------|-------|-------|--------------------|
| 野葛 <i>Pueraria lobata</i>   | 四川峨嵋 | 1998-10-06      | 1301  | 1. 33 | 500                |
| 峨嵋葛 <i>P.omeinsis</i>       | 四川峨嵋 | 1998-10-06      | 3104  | 1. 19 | 1262               |
| 粉葛 <i>P. thomsonii</i>      | 广西平南 | 1998-09-06      | 6302  | 1. 65 | 810                |
| 山葛 <i>P. montana</i>        | 福建福州 | 1998-07-27      | 2103  | 1. 02 | 850                |
| 苦葛 <i>P. peduncularis</i>   | 四川峨嵋 | 1998-08-21      | 5103  | 1. 90 | 1031               |
| 三裂叶葛 <i>P. phaseoloides</i> | 广东广州 | 1998-09-06      | 4301  | 1. 23 | 579                |

表 2 RAPD扩增中使用的引物

| 名称     | DNA系列      | 名称     | DNA系列       |
|--------|------------|--------|-------------|
| OPA-02 | TGCCGAGCTG | OPH-12 | ACGCGCATGT  |
| OPA-03 | AGTCAGCCAC | OPH-13 | GACGCCACAC  |
| OPB-18 | CCACAGCAGT | OPH-14 | ACCAGGTTGG  |
| OPC-06 | GAACGGACTC | OPL-07 | AGGCGGGAAC  |
| OPD-02 | GGACCAACC  | OPL-09 | TGCGAGAGTC  |
| OPF-08 | GGGATATCGG | OPL-11 | ACGATGAGCC  |
| OPH-01 | GGTCGGAGAA | OP0-05 | CCCAGTCACT  |
| OPH-02 | TCCGACGTGA | OPR-02 | CACAGCTGCC  |
| OPH-03 | AGACGTCCAC | S632   | AACCGGGACT  |
| OPH-04 | GGAAGTCGCC | S680   | GTTGCCTTGA  |
| OPH-05 | AGTCGTCCCC | S726   | GAGGACAAAAG |
| OPH-11 | CTTCCGCAGT |        |             |

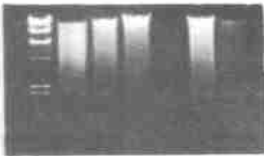
量 TE缓冲液溶解 DNA,存于 4℃ 备用。

2.2 DNA定性定量检测

2.2.1 DNA分子长度:取 5 $\mu$  L提取的 DNA溶液于 1% 琼脂糖凝胶上,用 0.5 $\times$  TBE电泳缓冲液在 10 V /cm电泳 1 h后,琼脂胶上 DNA谱带通过 EB染色后,在紫外光 ( 254 nm)下观察并照相 DNA分子长度与  $\lambda$  HindIII标记物(华美生物工程公司)比

M 1301 3104 6302 2103 4301 5103

N 1 2 3 4 5 6 M 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6



M  $\lambda$  Hind III DNA分子标记物

图 1 基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

2.5 数据分析:统计能产生多态位点的引物,在 DNA样品中扩增的 RAPD标记数与多态性 RAPD标记数记录原始数据,利用 RAPD(Version 4.0)及 PHYLIP(Version 3.5C)软件包进行数据处理,采用 UPGMA法聚类分析得到系统树。

3 结果

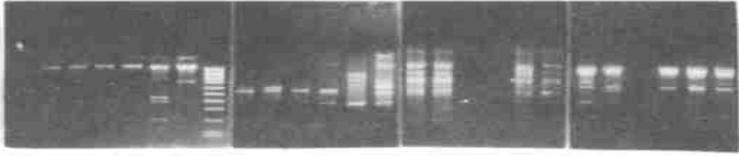
3.1 DIST 分析按 Cavalli-Sforza Arc Distance (AD)<sup>[4]</sup>计算得到的种群间的遗传距离 (AD上三角)和遗传一致(下三角)矩阵及 UPGMA系统树。

较(图 1)。

2.2.2 DNA溶液纯度及得率:取一定量 DNA溶液稀释后于 UV-265 FW上测定 A<sub>260</sub>及 A<sub>280</sub>值。DNA纯度按 A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub>之比值判断,得率按浓度 A<sub>260</sub> $\times$  50 $\mu$ g /mL值计算(表 1)。

2.3 DNA扩增:取约 10 ng样品 DNA,加入 0.2 mmol/L dNTPs 0.2 $\mu$  mol/L引物,1.5 mmol Mg-Cl<sub>2</sub>,1 U Tag DNA聚合酶及 10 $\times$  Tag 缓冲液,双蒸馏水使最终反应体积为 20 $\mu$  L,置于 480型 PCR扩增仪 (Perkin Elmers),按下述参数进行 1个 PCR循环:94℃,1 min 30 s;40个循环:94℃,1 min;36℃,1 min;72℃,1 min 1个循环:72℃,7 min 从近 50个随机引物中挑选出 22个扩增出的 DNA谱带能表现丰富的多态性的引物进行扩增。

2.4 PCR扩增产物检测:取 PCR反应 10 $\mu$  L于 1.5% 琼脂糖凝胶上用 0.5 $\times$  TBE电泳缓冲液电泳,PCR扩增产物长度与 100 bp DNA ladder( Fermentas Ltd.# SM0321-10)标记物比较(图 2)。



1-1301 2-3104 3-6302 4-2103 5-4301 6-5103 N-阴性对照

M-100 bp DNA ladder分子标记物

图 2 野葛和其它 5种植物的 RAPD指纹图谱

见表 3和图 3

3.2 DISTFF 分析按 Manhattan Distance (MD)<sup>[5]</sup>计算得到的矩阵及 UPGMA树 见表 4和图 4

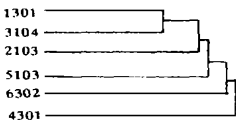


图 3 6种葛属植物 RAPD 聚类树系图 (AD)



图 4 6种葛属植物 RAPD 聚类树系图 (MD)

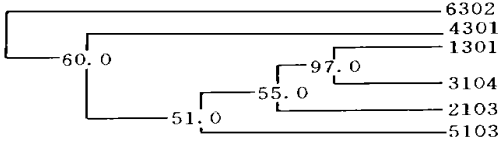
表 3 葛 6个种群间的遗传距离和遗传一致性 (AD)

|      | 1301   | 3104   | 6302   | 2103   | 4301   | 5103   |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1301 | 0.0000 | 0.6256 | 0.4208 | 0.5534 | 0.4732 | 0.5113 |
| 3104 | 0.4690 | 0.0000 | 0.5191 | 0.5630 | 0.4796 | 0.5191 |
| 6302 | 0.6856 | 0.6557 | 0.0000 | 0.5002 | 0.4639 | 0.4669 |
| 2103 | 0.5916 | 0.5745 | 0.6928 | 0.0000 | 0.4966 | 0.5582 |
| 4301 | 0.7483 | 0.7348 | 0.7681 | 0.7000 | 0.0000 | 0.5113 |
| 5103 | 0.6708 | 0.6557 | 0.7616 | 0.5831 | 0.6708 | 0.0000 |

表 4 6种葛间的遗传距离 (MD)和遗传一致性 (MD)

|      | 1301   | 3104   | 6302   | 2103   | 4301   | 5103   |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1301 | 0.0000 | 0.8025 | 0.6250 | 0.7047 | 0.5712 | 0.6376 |
| 3104 | 0.2200 | 0.0000 | 0.6505 | 0.7189 | 0.5827 | 0.6505 |
| 6302 | 0.4700 | 0.4300 | 0.0000 | 0.6188 | 0.5543 | 0.5599 |
| 2103 | 0.3500 | 0.3300 | 0.4800 | 0.0000 | 0.6127 | 0.7118 |
| 4301 | 0.5600 | 0.5400 | 0.5800 | 0.4900 | 0.0000 | 0.6376 |
| 5103 | 0.4500 | 0.4300 | 0.5800 | 0.3400 | 0.4500 | 0.0000 |

3.3 Bootstrapped 计算 100 次后得到的 consensus 树



4 讨论

4.1 DIST 分析分别按 Cavalli-Sforza Arc Distance(AD)<sup>[4]</sup>和 Manhattan Distance(MD)<sup>[5]</sup>两种方法计算得出遗传距离矩阵,并由此矩阵得到系统树(图 3和图 4),两种方法得出的结果是一致的。DIST 分析的可信度可用 Bootstrap 一致性分析<sup>[6]</sup>检验,若 Bootstrap 分数> 90%,则支持 DIST 所做出的推论,可信限大

4.2 峨嵋葛与野葛之间的遗传距离小,相似一致性大: Bootstrap 分析计算 100 次,二者有 97 次聚在一

起,未达到种间的差别,根据这一结果,峨嵋葛独立成种显然不合适,应归并为野葛。野葛与其它种间遗传距离远近顺序依次为三裂叶葛、粉葛、苦葛和山葛,相似一致性则相反,说明野葛与它们的亲缘关系远近依次为三裂叶葛、粉葛、苦葛和山葛。野葛与粉葛间的遗传距离大,野葛与山葛间的遗传距离虽较其它种间小,但不足以说明是种内差异: Bootstrap 运算的结果也支持这一结论,即粉葛、山葛应分别独立成种。综上所述,我们支持陈忠毅<sup>[7]</sup>的观点,即粉葛不应作为野葛的变种,而应独立成种;峨嵋葛作为一个独立的种,不能成立,但我们认为峨嵋葛应归属于野葛,而不是山葛。我们认为陈忠毅和 Van Der Maesen<sup>[8]</sup>将山葛作为野葛变种的处理值得商榷,山葛以独立成种较为合理

4.3 从 DNA 指纹图谱上可看出,各植物间有明显的差异, RAPD 扩增反应产生 DNA 指纹图谱可作为中药葛根及同属原植物鉴别的依据

致谢: 中国科学院植物研究所邹喻革教授、谢中稳博士及复旦大学遗传研究所盛小禹老师在本实验中给予热心指导和帮助,在此致以诚挚的谢意。

参考文献

- 1 Gotllied L D. Ann Mo Bot Gard, 1977, 64: 161
- 2 Brown A H D. Theor Appl Genet, 1979, 15: 1
- 3 Murray M G, Thompson W F. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321
- 4 Cavalli-Sforza. Evolution, 1967, 21: 550
- 5 Wright S. Evolution and Genetics of Populations. Vol 4. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 16
- 6 West D W. Heredity, 1996, 4: 25
- 7 陈忠毅,张奠湘. 热带亚热带植物学报, 1995, (1): 35
- 8 Maesen L J G, Van Der. Agr Univ Wagen Pap, 1985, (1): 37

(1999-11-23收稿)

## 黄瓜香的形态组织鉴定

湖北省襄樊市药品检验所 (441021) 张 勤\*

摘 要 对黄瓜香 *Tricyrtis maculata* (D. Don) Machide 药材性状、组织、粉末进行鉴定。黄瓜香茎横切面结构、叶上下表面特征及非腺毛为其鉴定特征。  
关键词 黄瓜香 药材性状 显微特征

### Pharmacognostical Identification of the Stem and Leaf of *Tricyrtis maculata*

Xiangfan Institute for Drug Control in Hubei (Xiangfan 441021) Zhang Qin

**Abstract** Pharmacognostical identification of *Tricyrtis maculata* (D. Don) Machide, including its

\* Address: Zhang Qin, Xiangfan Institute for Drug Control, Xiangfan  
张 勤 1982年 8月毕业于湖北中医学院中药系,获中药专业学士学位。旋即就职于湖北省襄樊市药品检验所中药室工作至今,现任副主任药师。先后有“草的形态组织鉴定”等 5 篇文章刊登在国家级自然科学核心期刊《中药材》上,有“三七片的掺伪鉴定”等 3 篇文章刊登在省级刊物《时珍国医国药》上