

正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析

曹雅男, 李庆章, 孙 岳, 李 璐, 王大威, 李景鹏*

(东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:目的 用 RAPD 和 ISSR 方法分析了 4 种正品龙胆的亲缘关系及遗传多样性, 为正品龙胆的品种鉴定及栽培育种提供了分子生物学依据。方法 优化 RAPD 及 ISSR 的 PCR 反应体系, 对产物琼脂糖凝胶电泳结果进行数据统计。结果 从 100 个 RAPD 引物和 32 个 ISSR 引物中分别筛选出 10 个 RAPD 引物和 4 个 ISSR 引物。通过遗传距离系数 UPGMA 聚类法分析数据, 构建类聚关系树系图。结论 RAPD 及 ISSR 的 PCR 反应体系可以获得理想的实验结果, 适用于龙胆品种遗传多样性及亲缘关系的分析。

关键词: RAPD; ISSR; 正品龙胆; 遗传多样性

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0100-04

Analysis of genetic diversity in certified *Radix Gentianae* by RAPD and ISSR

CAO Ya-nan, LI Qing-zhang, SUN Yue, LI Lu, WANG Da-wei, LI Jing-peng

(College of Life Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150070, China)

Abstract: **Objective** To analyze the sibling relationship and genetic diversity of four certified *Radix Gentianae* (RG) species by RAPD and ISSR methods. It provided molecular biological proof for species identification and breeding of certified RG. **Methods** PCR reaction systems of RAPD and ISSR were optimized, and the agarose gel electrophoresis results were analyzed into statistic data. **Results** Ten RAPD primers and four ISSR primers were selected respectively from 100 RAPD primers and 32 ISSR primers. The statistic data were analyzed to construct cluster analysis dendrogram by genetic distance UPGMA method. **Conclusion** The PCR reaction systems of this experiment gets ideal RAPD and ISSR results that suit to the analysis of certified RG species in genetic diversity and sibling relationship.

Key words: RAPD; ISSR; certified *Radix Gentianae*; genetic diversity

龙胆为龙胆科龙胆属多年生草本植物, 以根入药。龙胆属全世界约有 400 种, 中国约 247 种。《中华人民共和国药典》2000 年版^[1]中确定正品龙胆有 4 种, 龙胆 *Gentiana scabra* Bge., 条叶龙胆 *G. manshurica* Kitag., 三花龙胆 *G. triflora* Pall., 坚龙胆 *G. rigescens* Franch.。前 3 种传统上统称“北龙胆”, 后一种称“南龙胆”, 中药中统称为龙胆, 其性苦、寒, 主要功能是清热燥湿、泻肝胆火。

随机引物扩增多态 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)^[2], 创立于 20 世纪 90 年代。是一种以 10 b 短寡核苷酸为引物的 PCR 技术, 由于 RAPD 具有灵敏、快速, 不需要知道被检基因组序列且对模板质量要求不高等特点, 在药用植物系统学研究上有独到的优势。它能够通过不同的引物给出整个基因组的多态性信息, 避免了生长环境和发育时期不同的影响, 并从 DNA 水平上对分

类群比较分析, 确定药用植物种、品种的亲缘关系, 绘制系统发育树状图^[3]。

简单序列重复区间扩增多态 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 是 Zietkiewicz 等^[4]1994 年创建的, 也是一种以 PCR 技术为基础的分子标记技术, 其引物是根据基因组内某一重复序列设计出一系列特异性引物, 包括双核苷酸、三核苷酸和四核苷酸等微卫星片段。这种技术除具有 RAPD 优点外, 比 RAPD 技术更具有明确的针对性, 同时由于 PCR 扩增条件中的退火温度较高 (52℃ 左右), 保证了 PCR 扩增的可重复性。

本实验即探讨了这 2 种 DNA 分子标记技术用于龙胆时的 PCR 反应条件, 并通过分析 PCR 反应的结果, 对其种内及种间的遗传多样性进行了研究。

1 实验材料

实验样品由哈尔滨师范大学王臣老师进行了植

* 收稿日期: 2004-05-14

基金项目: 黑龙江省教委重大资助项目 (95512002)

作者简介: 曹雅男 (1978—), 女, 现在东北农业大学生命科学学院攻读硕士研究生。

* 通讯作者 Tel: (0451) 5190645 Fax: (0451) 5303336 E-mail: Ljingpeng@hotmail.com

物学鉴定。实验材料取其根,洗净阴干备用,样品情况见表1。

表1 样品来源表

Table 1 Origins of samples

序号	品种	拉丁学名	来源
D1~D20	条叶龙胆	<i>G. manshurica</i>	黑龙江省泰康(采集)
S1~S10	三花龙胆	<i>G. triflora</i>	黑龙江省牡丹江(采集)
C1~C10	龙胆	<i>G. scarbra</i>	黑龙江省牡丹江(采集)
N1~N3	坚龙胆	<i>G. rigeslens</i>	云南(采购)

2 方法

2.1 仪器及试剂: 低温高速离心机(Beckman USA), Ultraspac 1000 分光光度计(Amersham Pharmacia Biotech Sweden), PCR 仪(Biometra Germany), 凝胶成像仪(UVP USA)。Taq 酶、RNase A、Marker DL 2000 购自宝生物工程有限公司(大连), BSA、SDS(Sigma 美国), RAPD 及 ISSR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

2.2 总DNA的提取: 采用 SDS 法^[5]略有改进。称取 0.2 g 干燥药材, 加入液氮迅速研磨至粉末, 快速加入有 900 μ L 提取缓冲液(NaCl 500 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, Tris·HCl 100 mmol/L, β -巯基乙醇 10 mmol/L, SDS 1%)的 Ep 管中, 55 $^{\circ}$ C 水浴处理 20 min, 间隔摇动 2~3 次; 加入 5 mol/L 的 KAC 160 μ L 摇匀后冰浴 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 15 min; 取上清液加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)反复摇匀, 4 $^{\circ}$ C、8 000 $\times$ g 离心 10 min; 取上清液加入 2/3 体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇, 摇匀后放置 30 min, 4 $^{\circ}$ C、10 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃去上清液, 所得沉淀用 70% 乙醇洗 2 次; 干燥 15 min, 溶于 50 μ L TE 缓冲液(Tris 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8.0); 加 2 μ L 的 RNase A (10 μ g/ μ L) 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其降解情况后, 紫外分光光度计测定吸光度(A), 根据 A₂₆₀ 和 A₂₈₀, 计算其浓度及纯度。

2.3 RAPD 分析: 反应体系总体积 25 μ L, 其中 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L (Mg²⁺ 15 mmol/L), DNA 模板 5 ng, dNTPs 1 μ L (10 mmol/L), 引物 1 μ L (10 mmol/L), BSA 1 μ L (25 mg/mL), 1.25 U 的 Taq 酶, 其余以无离子水补足。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 37 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、60 s 45 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。产物在 4 V/cm 电压下用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外检测拍照。

2.4 ISSR 分析: 反应体系总体积 25 μ L, 其中 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L (Mg²⁺ 15 mmol/L), DNA 模板 2 ng, dNTPs 1 μ L (10 mmol/L), 引物 1 μ L (10

mmol/L), BSA 1 μ L (25 mg/mL), 1 U 的 Taq 酶, 其余以无离子水补足。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 52 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、90 s 45 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。电泳及检测条件同 RAPD。

2.5 数据统计分析: 根据 PCR 产物结果记录条带, 按照 Nei 氏片段共享公式^[6], 计算不同基因型片段遗传相似系数(F)和遗传距离(D)进行 UPGMA 法聚类分析。

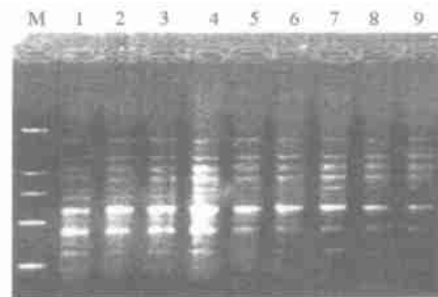
$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y), D = 1 - F$$

式中 N_{xy} 表示 x、y 2 个个体共有的 RAPD 或 ISSR 标记数, N_x 和 N_y 分别为 x 和 y 个体所具有的标记数

3 结果与分析

3.1 RAPD 扩增体系的优化

3.1.1 DNA 模板的浓度: 选择 9 个不同浓度的基因组 DNA 作为模板进行扩增(图 1)。1~9 号中模板(条叶龙胆样品 D-18 模板稀释为不同浓度)在体系中用量分别为 200、100、50、40、20、10、5、1、0.5 ng。其中 1~6 号由于模板浓度较大, 条带不清, 不利于进一步的分析; 8、9 号条带也不清且一些弱带不可见; 而 7 号(5 ng)条带较清晰, 一些弱带也清晰可见, 最终选择 RAPD 总体系中模板用量为 5 ng。



M: Marker DL 2000

图1 不同浓度的DNA模板的RAPD扩增结果

Fig. 1 RAPD amplified products of different concentration of DNA templates

3.1.2 DNA 模板的纯度: 选取 8 个不同纯度的 DNA 模板(分别为条叶龙胆样品 D-21、22、23、16、17、11、18、1 其纯度见表 2, 其中 D-21、22、23 因质量较低未用于正式实验), 进行 RAPD 扩增(图 2)。由电泳图可见当 DNA 纯度在 1.2~2.0 时都可以得到理想的结果, 可见在这个区间内 DNA 的纯度对反应的影响不大, 但为保证模板的质量, 实验样品的纯度选在 1.6~2.0。

3.1.3 其他条件的优化: 实验除了优化 DNA 模板的浓度和纯度条件外, 还对反应体系中 dNTPs、引物及酶的浓度都进行了优化, 并在体系中加入 BSA (1 μ g/ μ L)^[7], BSA 可以阻止多酚化合物及蛋

表 2 模板 DNA 的纯度
Table 2 Purity of DNA templates

编号	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	0.537	0.441	1.218
2	0.723	0.542	1.334
3	0.768	0.551	1.394
4	0.730	0.480	1.521
5	0.660	0.410	1.610
6	1.000	0.580	1.724
7	0.792	0.441	1.796
8	0.814	0.391	2.082



M Marker DL 2000

图 2 不同纯度的 DNA 模板的 RAPD 扩增结果

Fig. 2 RAPD amplified products of different purity of DNA templates

白质与 Taq 酶结合,从而提高酶的活性。反应程序在 Williams 的程序上略有改进,特别是将循环中各步的时间改为 94 、30 s, 37 、30 s, 72 、1 min, 使反应在 2.5 h 内完成,缩短了反应时间。

3.2 ISSR 扩增体系的优化: 选择 5 个不同浓度(样

品 D-18 模板稀释为不同浓度)的基因组 DNA 作为模板进行扩增(图 3)。1~5 号模板用量分别为 10、5、2、1、0.5 ng。其中 1、2、4、5 号由于模板浓度不合适,条带不清或多态性不强,不利于进一步的分析,而 3 号(2 ng)条带较清晰,多态性强,最终选择 ISSR 总体系中模板用量为 2 ng。反应体系中 dNTPs、引物及酶的浓度也进行了优化,反应程序的优化是在文献^[8~10]的基础上加以改进。



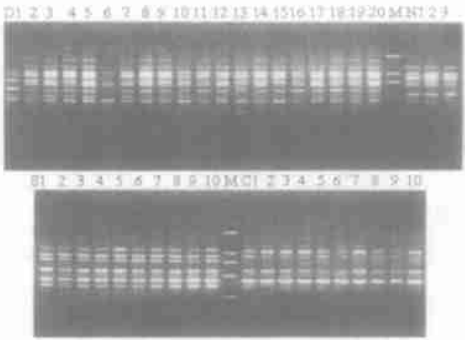
图 3 不同浓度 DNA 模板的 ISSR 扩增结果

Fig. 3 ISSR-amplified products of different concentration of DNA templates

3.3 遗传多样性的分析结果: 从 100 个 RAPD 引物筛选出 10 个用于遗传多样性分析,共检测出 120 个位点,其中 116 个(96.67%)显多态性,图 4 列举 RAPD 引物 SBSE-20 的电泳结果。

从 32 个 ISSR 引物中筛选出 4 个引物用于遗

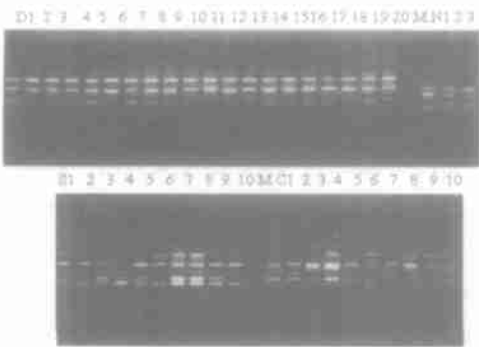
传多样性分析,共检测出 45 个位点,其中 44 (97.78%)显多态性,图 5 列举 ISSR 引物 5 (AC)₈T 3 的电泳结果。



D1~20-条叶龙胆 N1~3-坚龙胆
S1~10-三花龙胆 C1~10-龙胆
D1—20-*G. manshurica* N1—3-*G. rigeslens*
S1—10-*G. triflora* C1—10-*G. scarbra*

图 4 RAPD 引物 SBSE-20 扩增结果电泳图

Fig. 4 Electrophoresis products of RAPD primer SBSE-20



D1~20-条叶龙胆 N1~3-坚龙胆
S1~10-三花龙胆 C1~10-龙胆
D1—20-*G. manshurica* N1—3-*G. rigeslens*
S1—10-*G. triflora* C1—10-*G. scarbra*

图 5 ISSR 引物 5 (AC)₈T 3 扩增结果电泳图

Fig. 5 Electrophoresis products of ISSR primer 5 (AC)₈T 3

对扩增产生的条带进行 0.1 统计(有带记为 1, 没有带记为 0)^[11],利用 MVSP3.2 软件分别得到 RAPD 和 ISSR 的类聚分析树系图(图 6、7,坐标显示为 Nei 氏相似系数),从图 6、7 都可见坚龙胆与三花龙胆、龙胆、条叶龙胆的遗传距离较远,为传统上的“北龙胆”和“南龙胆”分类提供了分子生物学依据。而三花龙胆、龙胆、条叶龙胆 3 种中三花龙胆和龙胆亲缘关系较近。而在 4 个种群的内部也可见丰富的遗传多样性,从遗传学的角度来看丰富的遗传多样性意味着比较高的适应能力,蕴涵着比较大的进化潜能以及比较丰富的育种和遗传改良能力,这

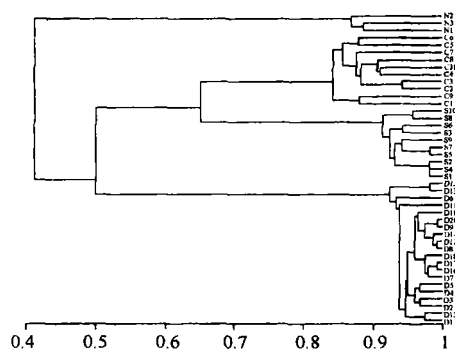


图 6 基于 RAPD 的 UPGMA 类聚分析树系图

Fig. 6 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on RAPD

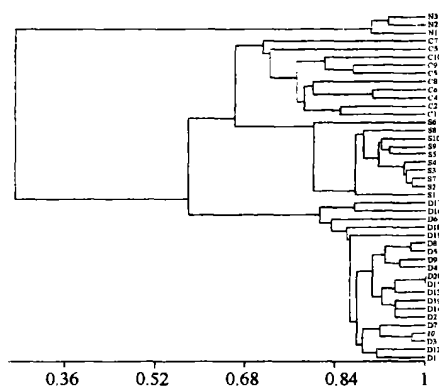


图 7 基于 ISSR 的 UPGMA 类聚分析树系图

Fig. 7 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on ISSR

为今后的栽培育种提供了依据。

4 结论

4.1 RAPD 和 ISSR 优化后的 PCR 反应体系和反应程序所得到的扩增结果条带清晰, 重复性好, 适用于药用植物龙胆。

4.2 对 RAPD 和 ISSR 指纹图谱进行量化分析后, 发现 ISSR-PCR 高于相对应的 RAPD-PCR 扩增产生的多态位点的百分比, 这说明 ISSR-PCR 更能反映遗传的多样性。

4.3 对 4 个正品龙胆品种 43 个个体的 RAPD 及

ISSR 的 PCR 电泳结果进行分析所得的类聚分析树图中可见坚龙胆与三花龙胆、龙胆、条叶龙胆的遗传距离较远。而三花龙胆、龙胆、条叶龙胆 3 种中三花龙胆和龙胆亲缘关系较近。而在 4 个种群的内部也可见丰富的遗传多样性, 以上实验结果为正品龙胆的品种鉴定及栽培育种提供了分子生物学依据。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [2] Williams J G K, Kubrlík A R, Livak J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers [J]. *Nuc Ac Res*, 1990, 18 (20): 6531-6535.
- [3] Shu Y Q, Bai S M, Chen Y H. The Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in medicinal plants [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(2): 147-151.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, et al. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genom*, 1994, 20: 176-183.
- [5] Wang G L, Fang H J. *Theory and Technique in Gene Engineering* (植物基因工程原理与技术) [M]. 1st ed. Beijing: Science Press, 1998.
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [7] Bian C M, Li J M, Jin Z X, et al. Effect of BSA of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in plants [J]. *Hereditas* (遗传), 2002, 24(3): 279-282.
- [8] Ratnaparkhe M B, Santra D K, Tullu A, et al. Inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 348-353.
- [9] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea series* Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1050-1060.
- [10] Jiang S Y, Chen Q F, Fang X J. RAPD and ISSR analysis between photoperiod sensitive genic male sterile rice nongken 58s and its original variety nongken 58 [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2000, 8(1): 63-66.
- [11] Xu K, Zheng M, Cao Y, et al. RAPD on natural populations in *Ophiopogon japonicus* in Sichuan Province [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(7): 648-652.

《中草药》杂志被收录为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

中国科学技术信息研究所经过多项学术指标综合评定及同行多位专家评议推荐, 本刊被收录为国家科技部“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”, 并在 2004 年 3 月颁发证书。