

莪术种质资源的 RAPD-PCR 分析

刘双利^{1,2}, 王晓慧^{2,3#}, 姜程曦^{2,4*}, 袁 玮^{4*}, 张金华⁴

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035

3. 吉林省农业科学院 农业资源与环境研究所, 吉林 长春 130033

4. 大理药业股份有限公司, 云南 大理 671000

摘要: 目的 探讨不同品种莪术的亲缘关系和遗传多样性, 对其进行分子标记鉴定。方法 采用 RAPD-PCR 标记方法研究来源于不同地域的 4 个种 42 个样本的莪术种质资源。采用 POPGEN32 分析其遗传相似系数和遗传距离, UPGMA 方法聚类。结果 90 个随机引物中筛选出 10 个引物, 共扩增出 83 个位点, 其中多样性位点 64 个, 占 77.5%, 遗传距离变化范围 0.22~0.58, 获得清晰的 RAPD-PCR 图谱, 建立了不同种莪术亲缘关系的树状结构图。结论 莪术群体中存在较丰富的遗传多样性, 具有明显的遗传分化, 这些遗传分化是莪术种质资源筛选的关键, 是莪术高效育种和生物技术开发的基础。

关键词: 莪术; 种质资源; RAPD; PCR; 分子标记鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)17-3098-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.023

RAPD-PCR analysis on different germplasm resources of *Curcumae Rhizoma*

LIU Shuang-li^{1,2}, WANG Xiao-hui^{2,3}, JIANG Cheng-xi^{2,4}, YUAN Wei⁴, ZHANG Jin-hua⁴

1. College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

3. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China

4. Dali Pharmaceutical Co., Ltd., Dali 671000, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity and genetic relationship in different cultivars of *Curcumae Rhizoma* (CR) and identified with molecular marker technique. **Methods** Forty-two samples in four cultivars of CR germplasm resources were studied with RAPD-PCR marker. The genetic similar coefficient and genetic distance were analyzed by POPGEN32 software and clustered by UPGMA method. **Results** Ten primers were selected from 90 random primers, a total of 83 loci were scored, among which 64 were polymorphic loci. The percentage of polymorphic loci was 77.5%. Genetic distance changed from 0.22 to 0.58. The dendrogram of different CR cultivars was clear. **Conclusion** The abundant diversity of CR from different populations exists with significant genetic differentiation, which is the key for screening the germplasm resources of CR and the basis for breeding and biotechnological development of CR.

Key words: *Curcuma Rhizoma*; germplasm resource; RAPD; PCR; molecular marker identification

莪术 *Curcuma Rhizoma* (CR) 为姜科 (Zingiberaceae) 植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Valeton、广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 或温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎, 主要分布于浙江、四川、福建、

广西等省区, 以根入药, 其味辛、苦、性温, 归肝、脾经, 具有行气破血、消积止痛的功效。莪术药用功能非常广泛, 临床用于治疗癥瘕痞块、瘀血经闭、食积胀痛; 早期宫颈癌等症^[1]。并且作为一种抗肿瘤、抗病毒、抗炎的重要药材, 莪术临床用量和工

收稿日期: 2016-06-06

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (2011BAI04B04); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY15H280014); 云南大理药业股份有限公司横向课题 (KJHX1603)

作者简介: 刘双利 (1980—), 男, 吉林长春人, 博士研究生, 研究方向为中药高效栽培。

*通信作者 姜程曦 (1971—), 男, 安徽青阳人, 副研究员, 博士, 研究方向为中药学。Tel: 18969715696 E-mail: jiangchengxi@126.com

袁 玮 (1970—), 女, 云南丽江人, 工程师。Tel: 13170609559 E-mail: yuanwei@daliyaoye.cn

#共同第一作者 王晓慧, 博士, 副研究员

业化生产用量十分巨大^[2]。

在研究植物多样性的众多分子标记技术中, RAPD (random amplified polymorphic DNA) 是应用最广泛的技术方法之一。RAPD 标记是 1990 年由 Williams 等^[3]和 Welsh 等^[4]同时推出的一种分子标记技术, 是以 PCR 反应为基础, 以随机碱基寡核苷酸为引物, 对基因组 DNA 进行扩增而显示出多态性的 DNA 指纹技术, 因操作简单易行、不需要事先知道材料的基因信息、能够覆盖整个基因组以及显性遗传标记等优点而被广泛应用于药用植物种内或种间亲缘关系核遗传多样性方面的研究^[5]。如用于中药基原动植物分类、遗传关系分析、遗传多样性评价、资源保护以及药材的鉴定等方面^[6-7]。本实验采用 RAPD-PCR 分子标记对蓬莪术、广西莪术、福建郁金(当地品种)及温郁金共 4 个种 9 个居群的遗传关系和多样性进行了研究。以期为莪术种质资源筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

样品为不同地域莪术的 4 个种, 经温州医科大学董建勇教授鉴定, 结果见表 1。选取莪术嫩叶, 每居群取样 4~5 个, 野外采集用冰壶和变色硅胶快速干燥, 带回实验室后置于-80 °C 下低温保存。

表 1 用于 RAPD-PCR 分析的 9 个莪术居群

Table 1 Analysis on CR from nine different populations by RAPD-PCR

编号	类型	居群	样本数
SC-1	蓬莪术 <i>Curcuma phaeocaulis</i>	四川崇州市三江镇	4
SC-2	蓬莪术	四川双流县金桥镇	5
GX-3	广西莪术 <i>Curcuma kwangsiensis</i>	广西灵山县陆屋镇	5
GX-4	温郁金 <i>Curcuma wenyujin</i>	广西贵港市桥圩镇	5
FJ-5	福建郁金 <i>Curcuma fujian</i>	福建省泉州市马甲镇	5
FJ-6	温郁金	福建省泉州市马甲镇	4
ZJ-7	温郁金	浙江瑞安市	5
ZJ-8	温郁金	浙江温州市苍南县	4
ZJ-9	温郁金	浙江乐清市	5

1.2 基因组 DNA 的提取

DNA 的提取与纯化采用改进的 CTAB 法^[5]。提取后用核酸蛋白质仪检测 DNA 浓度, 1.2% 琼脂糖胶电泳检查 DNA 的完整性。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增在 PC-818A PCR 仪上进行。反应体系 (25 μ L): Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 10 $\times$ PCR buffer

2.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 2 μ L, 引物 (20 μ mol/L) 1 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, 模板 DNA 1 μ L (DNA 量 1~2 ng), ddH₂O 16.2 μ L。

1.3.1 扩增程序 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 35 s, 36 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 42 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.3.2 电泳条件 吸取 6 μ L 反应液与 2 μ L 6 $\times$ 加样缓冲液混合, 扩增产物在含 0.5 μ g/ μ L 溴化乙锭 (EB) 的 1.5% 琼脂糖胶中电泳, 电极缓冲液为 0.5 $\times$ TAE, 5 V/cm 的电场强度下电泳 30 min 左右, 在紫外灯下观察并拍照。

1.4 引物的筛选和扩增

选择 4 个种的 10 个样本, 从 90 个引物中选出 10 个扩增条带数目适中、信号强、背景清晰、重复性好、样本间具有较多差异的引物 (表 2), 然后用于全部 DNA 样品的扩增, 每个选定的引物至少扩增 2 次。

表 2 莪术种质资源随机引物的扩增结果

Table 2 Amplification for random primers in germplasm resources of CR

引物	核苷酸碱基序列 (5'-3')	位点总数	多态性位点数	多态百分率/%
0163	TGCTCTGCCC	8	6	75.0
0165	GAGAGCCAAC	10	8	80.0
0172	ACCCGGTCAC	5	3	60.0
0176	AATCGGGCTG	15	12	80.0
0181	AGCCAGCGAA	4	4	100.0
0188	AAAGCTGCGG	7	6	85.7
0194	GGAGGGTGTT	8	5	62.5
0196	AGGTGACCGT	10	7	70.0
0201	GTTGCGATCC	5	4	80.0
0212	GGACACCACT	11	9	81.8
总数	—	83	64	77.5
平均数	—	8.3	6.4	77.5

1.5 RAPD 条带分析和数据处理

以 DL2000 Markers 作为相对分子质量标记的标准, 根据 PCR 扩增条带在琼脂糖凝胶上的迁移程度, 确定各品种莪术 RAPD-PCR 条带的位置和相对分子质量大小, 将每个样品的扩增条带按有或无来记录, 有此条带赋值“1” (含明带和暗带), 无此条带赋值为“0”, 按 Nei's 的方法统计条带数, 计算遗传相似系数 (GS) 和遗传距离 (GD)。

$$GS = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$$

$$GD = 1 - GS$$

N_{AB} 是样品 A 和样品 B 共有的条带数, N_A 和 N_B 分别是样品 A 和样品 B 具有的条带数

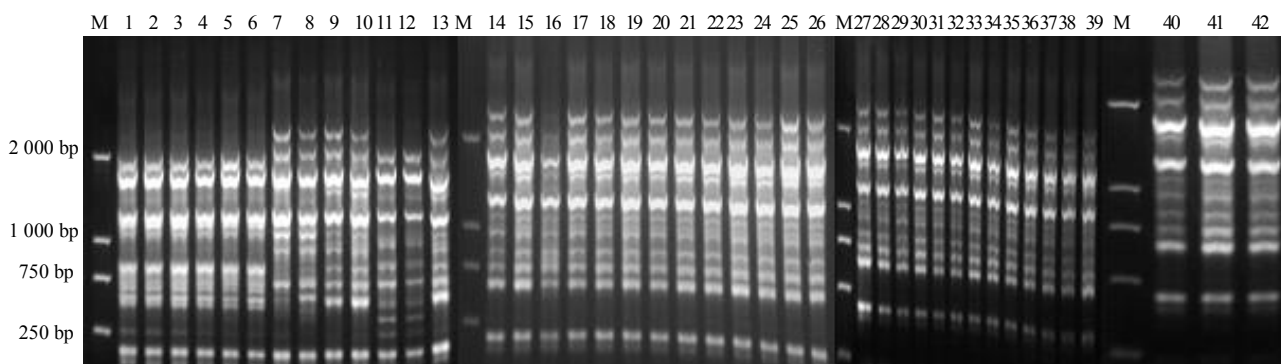
用 POPGEN32 软件进行统计分析, 根据遗传距离采用 UPGMA 法进行聚类分析, 建立树状结构图。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选和 RAPD 多态性

对购自上海英俊公司的 90 条 10 碱基随机引物进行筛选, 筛选出 10 条扩增产物较多、谱带清晰、多态性较好的引物, 用这些引物, 对 9 个

居群的莪术品种进行 PCR 扩增, 并对扩增片段进行统计分析 (表 2)。结果显示, 10 个引物共扩增出 83 个位点, 其中 64 个为多态性位点, 占 77.5%。平均每个引物所扩增的位点为 8.3 个, 多态性位点数 4~15, 平均 6.4 个位点。以引物 0165、0176、0172 和 0196 的扩增结果为代表, 见图 1~4。



M-Marker 1~5-SC-1 6~10-SC-2 11~16-GX-3 17~20-GX-4 21~25-FJ-5 26~30-FJ-6 31~34-ZJ-7 35~38-ZJ-8 39~42-ZJ-9, 下同
M-Marker 1~5-SC-1 6~10-SC-2 11~16-GX-3 17~20-GX-4 21~25-FJ-5 26~30-FJ-6 31~34-ZJ-7 35~38-ZJ-8 39~42-ZJ-9, same as below

图 1 引物 0165 的 RAPD 扩增

Fig. 1 RAPD amplification of Primer 0165

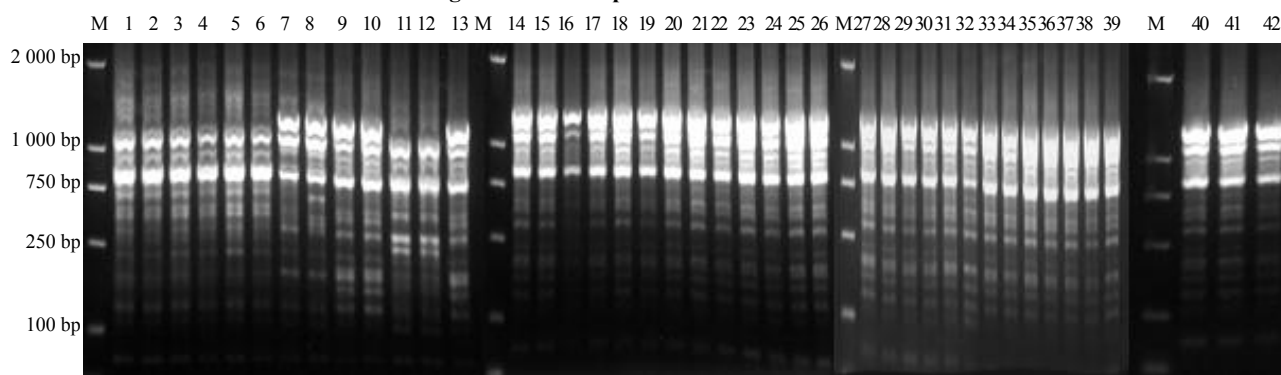


图 2 引物 0176 的 RAPD 扩增

Fig. 2 RAPD amplification of Primer 0176

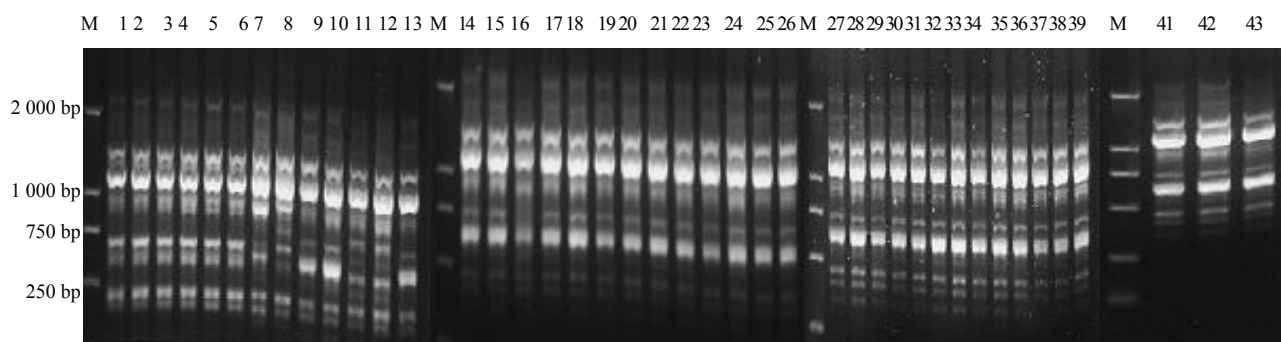


图 3 引物 0170 的 RAPD 扩增

Fig. 3 RAPD amplification of Primer 0170

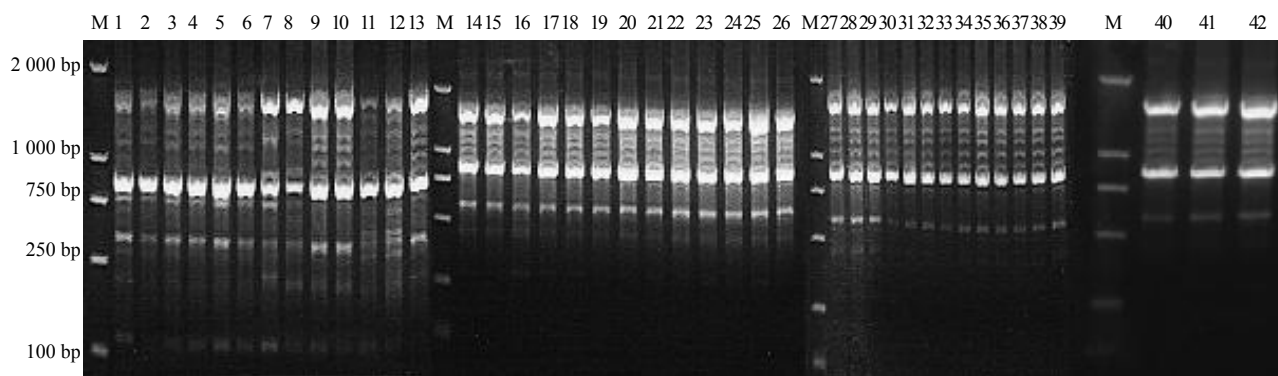


图 4 引物 0177 的 RAPD 扩增

Fig. 4 RAPD amplification of Primer 0177

2.2 莪术种质资源的 Nei's 相似系数和遗传距离

用 POPGEN32 计算莪术品种间的 Nei's 相似系数和遗传距离 (表 3), 由表 3 可知, 莪术的不同种之间的遗传多样性明显, 遗传距离大, 在 0.22~0.58, 蓬莪术和福建郁金之间的遗传距离最大, 为 0.573 3, 广西莪术和温郁金的遗传距离最

小, 也达到 0.222 1, 同一种之间的遗传距离较小, 四川的蓬莪术 2 个居群之间还没有形成分化, 温郁金各居群间的分化也不明显, 遗传距离最大的也只有 0.002 0, 所以, 不同种的居群间分化明显, 遗传距离大, 而同一个种的不同居群间还没有形成明显的分化类群。

表 3 莪术种质资源的 Nei's 相似系数和遗传距离

Table 3 Nei's Similarity coefficient and genetic distance for germplasm resources of CR

居群	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	—	1.000 0	0.627 9	0.578 7	0.563 6	0.581 8	0.587 6	0.578 7	0.585 5
2	0.000 0	—	0.627 9	0.578 7	0.563 6	0.581 8	0.587 6	0.578 7	0.585 5
3	0.465 4	0.465 4	—	0.800 0	0.617 1	0.799 2	0.800 5	0.800 0	0.800 9
4	0.547 0	0.547 0	0.223 2	—	0.625 9	0.998 4	0.998 0	1.000 0	0.999 0
5	0.573 3	0.573 3	0.482 8	0.468 6	—	0.618 2	0.617 9	0.625 9	0.622 1
6	0.541 6	0.541 6	0.224 1	0.001 6	0.481 0	—	0.998 8	0.998 4	0.998 2
7	0.531 7	0.531 7	0.222 6	0.002 0	0.481 4	0.001 2	—	0.998 0	0.999 6
8	0.547 0	0.547 0	0.223 2	0.000 0	0.468 6	0.001 6	0.002 0	—	0.999 0
9	0.535 2	0.535 2	0.222 1	0.001 0	0.474 6	0.001 8	0.000 4	0.001 0	—

左下为遗传距离 右上为相似系数

The bottom left is genetic distance, and the upper right is similarity coefficient

2.3 莪术种质资源的聚类分析

以 Nei's 相似系数为依据, 对不同种莪术的基因组 DNA 的扩增条带的编码数据进行编码矩阵和聚类分析, 构建莪术的 UPGMA 聚类图 (图 5)。从图 5 可知, 蓬莪术的 2 个居群, 温郁金的 5 个居群首先聚为一类, 然后再与其他种的莪术聚类, 验证了同种莪术的亲缘关系较近。聚类图中, 温郁金首先和广西莪术聚类, 然后和福建郁金聚类, 最后和蓬莪术聚在一起, 说明温郁金和广西莪术的亲缘关系最近, 和福建郁金的关系次之, 和蓬莪术的亲缘关系最远。瑞安市的温郁金和乐清市的温郁金首先聚为一类, 这与它们来自比较近的地理种源相吻合。广西的温郁金和浙江苍南的温郁金聚为一类, 福建的温郁金最后聚类。

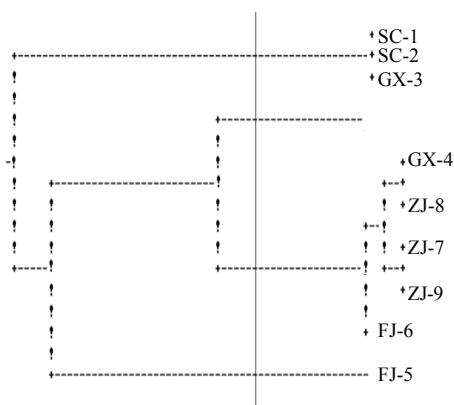


图 5 不同莪术种质资源的 RAPD 聚类分析图

Fig. 5 Dendrogram of RAPD cluster analysis for different germplasm resources of CR

3 讨论

遗传多样性决定物种进化和适应环境的能力,物种遗传多样性越丰富,对环境适应能力就越强,在进化过程维持其遗传多样性的水平就越高^[8]。本研究通过对莪术种质资源的研究,共扩增出 83 个位点,其中 64 个为多样性位点数,多态性达到 77.5%,遗传距离变化范围为 0.22~0.58,表明莪术不同种之间的遗传多样性丰富,遗传变异大,亲缘关系较远,而同种的莪术居群间则分化不明显,刘万水等^[9]对雷公藤属 3 种植物的遗传关系和遗传多样性的 RAPD 分析也表明不同种的雷公藤遗传分化明显,遗传多样性主要存在于居群间,而居群内的分化不明显。所以,应该加强莪术种质资源的保护,增加不同莪术遗传多样性及其农艺性状特征和遗传基础的研究,防止莪术遗传基础狭窄。

DNA 分子标记技术是基于生物个体间或种群间基因组 DNA 某一片段的不同而反应生物个体或种群间的差异,被广泛应用于遗传多样性分析。目前,应用较广泛的分子标记技术有 RAPD 和 ISSR 技术^[10]。每种分子标记技术都能从不同层次反映供试样品的遗传多样性,但均存在一些局限性^[11]。RAPD 技术是以单一随机寡核苷酸序列为引物进行 PCR 非定点扩增,特点是简单易操作,但对反应条件敏感、重复性差,且 RAPD 为显性遗传,多态性信息量较低^[12]; ISSR 是利用包含重复序列并在 3' 或 5' 锚定的单寡聚核苷酸引物对基因组进行 PCR 扩增的标记系统,具有多态性高、能实现全基因组无编码取样和无组织器官特异性等优点,但其标记大多为显性标记,不能区分显性纯合基因型和杂合基因型。本实验在前期利用 ISSR 标记分析不同种和居群莪术的基础上,进一步用 RAPD 标记技术对莪术的种质资源进行研究,证明了 ISSR 和 RAPD 分子标记技术均可用于温郁金种质资源遗传多样性的研究,2 种分子标记技术对温郁金的分类结果相似,均表明温郁金和蓬莪术的亲缘关系最远,广西莪术介于温郁金和蓬莪术之间,但是广西莪术与温郁金和蓬莪术的亲缘关系还有待进一步研究。

通常认为,不同种或种内居群的相似度大小一定程度上反映这些类群的亲缘关系远近。从聚类图和相似性系数分析结果来看,莪术的不同种之间的亲缘关系较远,同种不同居群之间的亲缘关系较近,且与地理分布有密切关系。伍莲等^[13]对金毛狗的研究也发现,居群间的遗传距离与地理种源密切相关,较近地理种源的居群间遗传相似性高,遗传距离小;较远地

理种源的居群间遗传相似性低,遗传距离大。地理种源影响居群间的遗传距离。李娟等^[14]的研究也表明同一产地的一种样品的 RAPD 图谱基本一致。地理分布越远,其遗传差距越明显。白音等^[15]对美花石斛种质资源的 RAPD 分析也表明,美花石斛的亲缘关系与其地理分布有一定的关系,与本实验对温郁金种质资源亲缘关系的研究结果相似。另外,本实验将福建郁金(地方品种)与蓬莪术、广西莪术和温郁金进行了亲缘关系分析,研究发现,福建郁金与蓬莪术的遗传距离最大,与广西莪术和温郁金的亲缘关系较近,但不属于广西莪术或温郁金,《中国药典》并未记载,福建郁金是否为一个新种,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 叶永浩, 郝虹, 蔡宇忆, 等. 广西莪术的栽培繁殖及分子鉴定研究进展 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2220-2222.
- [3] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Uncl Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [4] Welsh J, McClell M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18(25): 7213-7219.
- [5] 肖猛, 李群, 郭亮. 四川西部濒危植物桃儿七遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生态学报, 2015, 35(5): 1488-1495.
- [6] 樊洪泓, 李廷春, 邱婧, 等. 石斛属几种植物遗传关系的 SRAP 和 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 627-632.
- [7] 王剑锴, 李明杰, 王建明. 金线莲 RAPD-SCAR 标记的开发和种质遗传多样性评价 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 122-129.
- [8] 张锐, 赖钟雄, 刘生财, 等. 福建野生蕉 (*Musa* spp., AB Group) 3 个自然居群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2013, 42(3): 246-251.
- [9] 刘万水, 郭宝林, 陈玉婷, 等. 雷公藤属 3 种植物遗传关系与遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1615-1621.
- [10] 宗成堃, 宋振巧, 陈海梅, 等. 利用 SSR、SRAP 和 ISSR 分子标记构建首张丹参遗传连锁图谱 [J]. 药学学报, 2015, 50(3): 360-366.
- [11] 齐琳洁, 龙平, 蒋超, 等. 黄芩基因组 SSR 分子标记的开发及遗传多样性分析 [J]. 药学学报, 2015, 50(4): 500-505.
- [12] 王梦亮, 任晓琳, 崔晋龙, 等. 野生红景天的 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 469-473.
- [13] 伍莲, 邓洪平, 徐洁, 等. 金毛狗居群遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1468-1469.
- [14] 李娟, 万定荣, 陈科力. 8 种卷柏属药用植物的 RAPD 分析 [J]. 中药材, 2007, 30(4): 403-406.
- [15] 白音, 包英华, 王文全, 等. 不同居群美花石斛种质资源的 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 748-751.