

地黄品种遗传多样性 RAPD 分析

张进忠^{1,2}, 王永芬³, 王建波^{1*}

(1. 武汉大学生命科学学院, 湖北 武汉 430072; 2. 河南职工医学院, 河南 郑州 450003;

3. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450011)

摘要: 用 CTAB 法提取 10 个地黄品种幼叶的基因组 DNA, 用紫外分析法和琼脂糖凝胶电泳方法检测基因组 DNA 的纯度、大小和浓度。结果表明, 从 80 条 RAPD 引物中分别筛选出适合于地黄 RAPD 标记分析的引物 17 条。17 条 RAPD 引物对 10 个地黄品种(系)扩增出 177 条带, 多态条带比率(PPB)为 61.58%, 平均多样性指数(I)为 0.3135, 遗传相似系数(GS)在 0.63~0.93, 平均 GS 为 0.7545。RAPD 标记的聚类分析结果, 将 10 个地黄品种分为 2 类: 第 1 类含有 6 个品种, 包括组培 85-5、大田 85-5、组培 9302、金白地黄、金状元和大田 9302; 第 2 类含有 4 个品种, 包括北京 1 号、大红袍、地黄 9104 和野生地黄。

关键词: 地黄; RAPD 标记; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S567.23 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2006)06-0097-04

Analysis of Genetic Diversity of *Rehmannia glutinosa* Based on RAPD Markers

ZHANG Jin-zhong^{1,2}, WANG Yong-fen³, WANG Jian-bo^{1*}

(1. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Henan Medical College for Staff and Workers

Zhengzhou 450003, China; 3. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China)

Abstract: The DNAs were extracted from 10 cultivars (lines) of *Rehmannia glutinosa* Libosch by means of CTAB method to establish an efficient RAPD-based genetic diversity detection system. The genomic DNA, from a young regenerated plant of *Rehmannia glutinosa* Libosch f. hueichingensis (Chaoet schih) Hsiao, was used as a template to optimize RAPD-PCR amplification conditions for *Rehmannia glutinosa* Libosch. The results were as follows: 17 ones from 80 RAPD primers tested were selected for the RAPD analyses of *Rehmannia glutinosa* Libosch, 177 polymorphic bands were amplified by 17 RAPD primers and average proportion of polymorphic loci was 61.58%. The Shannon's index was 0.3135. Genetic similarity value was from 0.63 to 0.93 and the average was 0.7545. 10 *Rehmannia* cultivars (lines) could be divided into two groups: one contained 6 cultivars (lines) such as Zupei 85-5, Datian 85-5, Zupei 9302, Datian9302, Jinzhuangyuan and Jinbai, the other was composed of 4 cultivars (lines) such as Beijing No. 1, Dahongpao, Dihuang9104 and wild dihuang. The results of principal component analysis were very consistent to that by the RAPD markers.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch; RAPD marker; Genetic diversity; Cluster analysis

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)为玄参科(Scrophulariaceae)地黄属(*Rehmannia*)多年生草本

植物。河南是地黄的地道产区, 每年都有大量地黄产品销往国内市场, 出口东南亚和日本等国, 它已经

收稿日期: 2006-04-11

作者简介: 张进忠(1964-), 男, 河南郑州人, 副教授, 在读硕士研究生, 从事生物学和分子遗传学教学与研究工作。

通讯作者: 王建波(1963-), 男, 河南新郑人, 教授, 主要从事植物细胞及分子遗传学研究。

成为产区重要的经济来源之一。近年来,国内外市场对怀地黄的品质、纯度等提出更高要求。然而,目前市场上的地黄产品来源比较复杂,优劣品种混杂;仍采用传统的形态特征和系谱来源对其分类研究和遗传分析。为准确鉴定和应用怀地黄,克服传统鉴定方法不易区分品种的不足,进而为新品种选育提供理论依据,笔者采用 RAPD 分子标记对地黄种质遗传多样性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

在温县农科所地黄田和其日光温室内分别采集 8 个地黄品种和 2 个脱毒地黄品系的幼叶。其名称和编号为:组培 85—5,大田 85—5,组培 9302,大田 9302,地黄 9104,金状元,野生地黄,北京 1 号,大红袍,金白。在每份材料的群体中随机选取 10 株幼苗的幼叶,洗净晾干,混匀,装入 50 ml 干燥洁净的离心管中,置于液氮速冻,带回实验室备用。

1.2 方法

1.2.1 地黄基因组 DNA 的提取 将一定重量的供试材料粉末放在预冷的 50 ml 离心管中,立即加入等体积的 65℃预热的 2×CTAB 提取缓冲液[100 mmol/L Tris·HCl(pH 8.0), 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% (W/V) CTAB, 40 mmol/L 巯基乙醇],充分混合,65℃保温 20 min,其间不断摇动;加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1,下同),轻缓颠倒离心管混匀,在室温下,12 000 r/min 离心 15 min。将上清液转入另一个离心管,加入 1/10 体积的 10%CTAB 液[10% (W/V) CTAB, 0.7 mol/L NaCl],混匀,加入等体积的氯仿/异戊醇,颠倒离心管,在室温条件下以 12 000 r/min 离心 10 min;取上清,重复用氯仿/异戊醇抽提一次;将上清转入新的硅烷化离心管中,加入 1 倍体积的 CTAB 沉淀缓冲液[50 mmol/L Tris·HCl(pH 8.0, 10mmol/L EDTA, 1% (W/V) CTAB, 20 mmol/L β-巯基乙醇],混匀,室温下放置 30 min,观察沉淀生成。若无明显沉淀,则延长放置时间,随着放置时间的延长,沉淀量则会增加。加入 1 mol/L 乙酸铵溶液(0.5 ml/g),使沉淀溶解完全,再加入适量 7.5 mol/L 的乙酸铵溶液,使该溶液的终浓度保持在 2.5 mol/L。加入 2 倍体积的异丙醇,混匀,室温放置 10 min。10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,晾干。用 70%乙醇漂洗沉淀 2 次,吹干,沉淀溶于适量 TE 溶液。加入 1μl 1mg/ml RNase 溶液,37℃水浴保温

60 min 后,放置在 4℃冰箱中备用。

1.2.2 地黄基因组 DNA 的检测 用 Beckman Du530 DNA/Protein Analyzer 测定 DNA 的紫外光吸收值 A₂₆₀和 A₂₈₀,用公式 DNA (μg/μl)=A₂₆₀×稀释倍数×50/1000 计算所提 DNA 的浓度。取一定量的 DNA,使用 0.6%~0.8% (W/V)琼脂糖凝胶进行电泳检测(5V/cm)DNA 的大小和完整性,并使用 λDNA/Hind III Marker 进行分子量标记。剩余的 DNA 溶液稀释为 10 ng/μl 的工作液,保存在 4℃冰箱中备用。

1.2.3 地黄 RAPD 标记及其产物检测 从 80 个 RAPD 引物中选取 17 个能够获得清晰条带、反应稳定的引物(表 1)。PCR 反应体系为 30 μl,包括 1.5~1.0 U Taq DNA polymerase, 3.0 mmol/L Mg²⁺, 1×Taq DNA polymerase buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L KCl, 0.1% Trion X-100, pH9.0), 60 ng 模板 DNA, 1.4 pmol/L 引物, dATP、dGTP、dCTP and dTTP 各 0.4 mmol/L。PCR 反应在 SABC DNA THERMAL CYCLER 上进行,扩增程序为:94℃预变性 7 min;94℃60 s, 40℃90 s, 72℃120 s, 45 个循环;72℃延伸 7 min。反应产物以 200 Ladder DNA Marker 为分子量标记在含有 0.5 μg/ml EB 的 1.4%~2.0%琼脂糖凝胶中电泳检测,在紫外光透射仪下观察。

表 1 RAPD 引物

引物	碱基序列	引物	碱基序列
M Q8082	GGGAGGCAAA	M Q8273	GGCTGCAGAA
M Q8085	AGTGCACACC	M Q8285	AGGGGTCTTG
M Q8090	CCAGGCTGAC	M Q8288	GTGACGTAGG
M Q8093	GAGCACTGCT	M Q8290	GTGATCGCAG
M Q8096	GTCTGTGCGG	M Q8292	TCGGCGATAG
M Q8098	GTGTGCTGTG	M Q8295	TTCCGAACCC
M Q8264	GGTGATCAGG	M Q8298	AGGTGACCGT
M Q8265	CCGAATTCCC		
M Q8267	CCGATATCCC		
M Q8269	CCAAGCTTCC		

1.2.4 数据统计与分析 RAPD 和 ISSR 扩增产物以 0, 1, 9 统计建立数据库。利用 SPSS11.0 分析软件的 Jaccard 方法和 Within-group linkage 聚类分析分别计算样品间的遗传相似系数(GS)、研究各样品间的遗传关系;利用 POPGEN E32 软件计算 RAPD 扩增产物的 Shannon 多样性指数(Polymorphic in-

formation index)。

2 结果和分析

2.1 基因组 DNA 的提取与检测

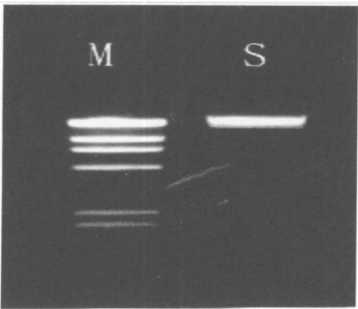
提取了 10 个地黄品种(系)幼叶的基因组 DNA。其紫外光吸收值 A_{260nm} 、 A_{280nm} 、 A_{260nm}/A_{280nm}

A_{280nm} 和 DNA 浓度如表 2。从表 2 可以看出, 10 个地黄品种(系)幼叶基因组 DNA 的 A_{260nm}/A_{280nm} 值在 1.92~2.0, DNA 浓度在 2.51~5.87 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

其中, 组培 85-5 幼叶基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1。其 DNA 片段都只有 1 个, 均大于 23kb。

表 2 10 个地黄品种(系)幼叶基因组 DNA 的 A_{260nm} 、 A_{280nm} 、 A_{260nm}/A_{280nm} 和 DNA 浓度

品种	叶重(g)	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	DNA 浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	DNA 体积(μL)
金白	8.40	0.585	0.298	1.96	5.85	700
组培 9302	6.55	0.571	0.29	1.97	5.71	600
大田 85-5	7.00	0.577	0.289	2.0	5.77	500
野生地黄	8.00	0.558	0.286	1.95	5.58	600
大红袍	4.35	0.522	0.262	1.99	5.22	500
大田 9302	6.30	0.355	0.179	1.98	3.55	600
地黄 9104	4.00	0.319	0.158	2.0	3.19	500
金状元	6.00	0.251	0.125	2.0	2.51	600
组培 85-5	7.00	0.363	0.185	1.96	3.63	400
北京 1 号	7.43	0.587	0.306	1.92	5.87	500

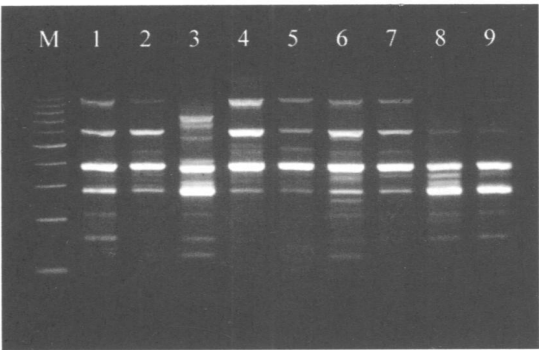


M- λ DNA/Hind III标准分子量标记, 从上至下片段大小依次为 23.13kb, 9.416kb, 6.557kb, 4.361kb, 2.322kb, 2.027kb; S-怀地黄基因组 DNA

图 1 组培 85-5 基因组 DNA 的凝胶电泳图

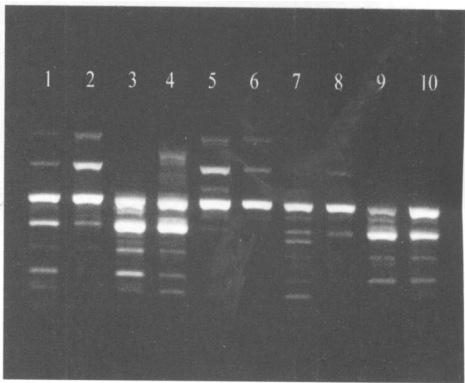
2.2 地黄 RAPD-PCR 扩增产物的多态性

17 个随机引物共扩增出 177 条重复性好, 清晰的多态性条带(图 2、图 3), 大小在 200~2 500bp 之



M: 200bp ladder; 1. 大田 85-5; 2. 组培 85-5; 3. 大田 9302; 4. 金状元; 5. 地黄 9104; 6. 野生地黄; 7. 北京 1 号; 8. 大红袍; 9. 金白

图 2 引物 MQ8085 对 9 个地黄品种的扩增结果



1. 大田 85-5; 2. 组培 85-5; 3. 组培 9302; 4. 大田 9302; 5. 金状元; 6. 地黄 9104; 7. 野生地黄; 8. 北京 1 号; 9. 大红袍; 10. 金白

图 3 引物 MQ8085 对 10 个地黄品种的扩增结果

间; 多态性位点数为 109; 多态性位点比率为 61.58%; 平均多样性指数(I)为 0.3135; 每个位点的有效等位基因数(N_e)是 1.3641。

基于 Jaccard 系数的遗传相似性系数(GS), 对扩增结果进行统计分析, 得到 RAPD 标记的 10 个地黄品种(系)的 Jaccard 相似性系数矩阵(表 3)。

2.3 地黄品种间的 RAPD 聚类分析

对 10 个材料进行聚类分析, RAPD 标记获得聚类树(图 4), 10 个供试材料可以明显的划分为 2 个类群。第 1 组含有 6 个品种, 包括组培 85-5、大田 85-5、组培 9302、金白、金状元和大田 9302。第 2 组含有 4 个品种, 包括北京 1 号、大红袍、地黄 9104 和野生地黄。

表 3 基于 RAPD 标记 10 个地黄品种(系)的 Jaccad 相似性系数矩阵

品种 (系)	组培 85—5	大田 85—5	组培 9302	金状元	大田 9302	地黄 9104	野生地黄	北京 1 号	大红袍	金白
组培 85—5	1.000									
大田 85—5	0.933	1.000								
组培 9302	0.903	0.913	1.000							
金状元	0.739	0.717	0.703	1.000						
大田 9302	0.667	0.632	0.646	0.726	1.000					
地黄 9104	0.670	0.65	0.679	0.713	0.717	1.000				
野生地黄	0.737	0.716	0.717	0.785	0.709	0.743	1.000			
北京 1 号	0.724	0.703	0.690	0.755	0.712	0.730	0.784	1.000		
大红袍	0.754	0.748	0.735	0.838	0.759	0.761	0.850	0.818	1.000	
金白	0.907	0.881	0.852	0.759	0.687	0.690	0.820	0.774	0.805	1.000

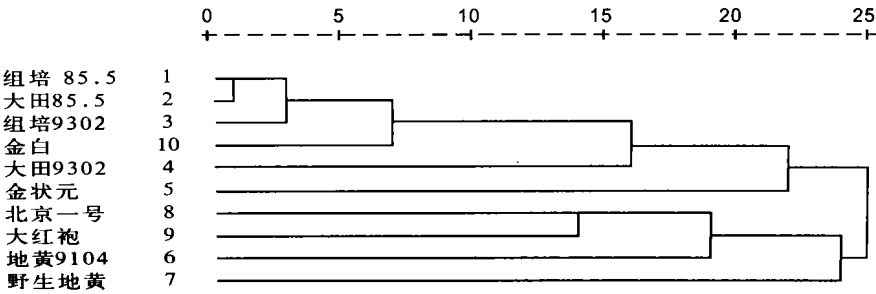


图 4 10 个地黄品种(系)间的 RAPD 聚类图

3 讨论

本研究的 RAPD 标记对 10 个地黄品种都可以扩增出其各自的多态性带谱, 检测出它们的种质遗传多样性。地黄品种(系)间多态性位点比率为 61.58%, 平均多样性指数(I)为 0.3135。从聚类分析的结果看, RAPD 标记把 10 个供试材料明显划分为 2 个类群: 第 1 类有 6 个品种, 包括组培 85—5、大田 85—5、组培 9302、金白、金状元和大田 9302。第 2 类含有 4 个品种, 包括北京 1 号、大红袍、地黄 9104 和野生地黄。另外, “北京 1 号和大红袍分在同一组而与 85—5 系列分在不同族类”的结果与以前报道的 RAPD 鉴定结果一致。RAPD 标记可以鉴

别茎尖脱毒怀地黄品系的结论和 Choi 与 Hatano 等人用 RAPD 分析茎尖脱毒获得的地黄植株与愈伤组织再生植株的结果相似。

参考文献:

[1] 李先恩, 杨世林, 杨峻山. 地黄不同品种及不同块根部位中梓醇含量分析[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(11): 820—823.
[2] 都恒青, 李赵曦, 刘根成. 地黄质量的研究[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(6): 327—329.
[3] Choi HSI. Callus-derived plantlets of Rehmannia glutinosa using RAPD[J]. SABRAO, 1997, 8: 144.
[4] 陈京荔, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 地黄不同品种的 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志. 2002, 27(7): 45—50.