

板蓝根新品系 BLG2012-04 与当地栽培种的 RAPD 比较

王兴政¹, 杨宁², 陈红刚³, 刘效瑞¹, 王富胜¹

(1. 甘肃省定西市农业科学研究所, 甘肃 定西 743000; 2. 西北师范大学, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730010)

摘要: 采用 RAPD 分子标记技术, 对甘肃省定西市农业科学研究所选育的板蓝根新品系 BLG2012-04 和当地大田栽培种进行 PCR 扩增反应, 以鉴别其遗传多样性和亲缘关系。结果显示, 对于 BLG2012-04 和当地大田栽培种, 筛选出的 11 条引物均扩增出 119 个位点, 平均每条引物能扩增出 10.8 个位点。两者之间的主谱带基本一致, 说明它们的遗传背景具有很大的相似性; 次谱带存在不同程度的差异, 这在分子水平上说明 BLG2012-04 与当地大田栽培种具有一定的遗传差异性。

关键词: 板蓝根; RAPD; 新品系; 鉴别

中图分类号: S567.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)10-0034-03

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2015.10.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2015.10.013)

RAPD Analysis Between New Lines “BLG2012-04” of Radix Isatidis and Its Main Cultivar in Gansu

WANG Xingzheng¹, YANG Ning², CHENG Honggang³, LIU Xiaorui¹, WANG Fusheng¹

(1. Dingxi Academy of Agricultural Sciences, Dingxi Gansu 743000, China; 2. Northwest Normal University, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. Gansu University Traditional Chinese Medicine, Lanzhou Gansu 730010, China)

Abstract: In this study, RAPD molecular marker technology are used for PCR amplification reaction of the two Radix Isatidis varieties BLG2012-04 and main cultivar, to identify two Radix Isatidis varieties of lines between genetic diversity and genetic relationship. The result shows that a total of 119 DNA bands are amplified by 11 oligonucleotide primers. The average each primer can amplification out 10.8 sites. The Lord band of two Radix Isatidis are basically identical that the genetic background of between new lines and main cultivar had great similarity, but subband have difference of different degree, the two lines has certain genetic differences.

Key words: Radix Isatidis; RAPD; New Lines; Identification

我国中药材资源丰富, 是世界中药材的主产国, 对中药材的研究有几千年历史。中药材的品质关系到临床用药的安全有效, 发展道地药材是

实现中药现代化的关键, 也是占有市场、增强产品竞争力的基本保障。当前, 药材道地性研究已经成为中医药科研的重要课题。

收稿日期: 2015-05-22

基金项目: 2013 年中医药部门公共卫生专项—“国家基本药物所需中药材种子种苗繁育基地建设”(国中医药办规财发[2013]41)部分研究内容

作者简介: 王兴政(1980—), 男, 甘肃定西人, 助理研究员, 主要从事中药材育种与栽培工作。联系电话: (0)13141769721。E-mail: wangxingzheng763@163.com

- 九号高产稳产适应性分析[J]. 现代农业科技, 2010(1): 94-95.
- [3] 苟作旺. 7 个春小麦新品系丰产性稳产性分析[J]. 甘肃农业科技, 2015(5): 26-29.
- [4] 郑新疆, 管利军, 张利民, 等. 哈密垦区棉花区域试验品种的丰产稳产性及适应性分析[J]. 安徽农业科学, 2013(6): 15-16.
- [5] 李中青, 李齐霞, 宋殿珍, 等. 潞玉 13 玉米杂交种丰产性、稳产性及适应性分析[J]. 吉林农业科学, 2008, 33(1): 7-9.
- [6] 冯宜梅. 玉米新品种武科 8 号的丰产稳产性及适应性分析[J]. 中国种业, 2015(7): 30-32.

(本文责编: 陈珩)

板蓝根(*Radix Isatidis*)为2年生草本十字花科植物菘蓝(*Isatis factionindigotica Fort*)的根,始载于《神农本草经》,为传统抗病毒中药之一。板蓝根味苦、性寒,归心、胃经,有清热解毒、凉血利咽之功效^[1-2]。近年来的研究表明,板蓝根具有较强的抗菌、抗病毒和抗内毒素的作用^[3],广泛用于治疗流感、腮腺炎、温病发热、发斑、风热感冒、咽喉肿烂、流行性乙型脑炎和肝炎等多种疾病^[4]。

然而目前甘肃板蓝根栽培中普遍使用传统栽培育种方法,栽培品种为板蓝根属多种类型的混和体,田间表现良莠混杂,难于管理,且品系亲缘关系不明确,缺乏品系鉴定的分子依据,严重制约着当地板蓝根的产量和品质,生产中迫切需要优势新品种的选育鉴定。另外,药材的道地性一直是评价药材品质的综合性标准,而产生道地性的原因,除了与栽培方法、生态环境、加工方法有关外,还与物种居群的遗传特异性有关。道地药材与非道地药材在形态和生药性状等特征上的差别并不明显,这给应用传统方法鉴别道地药材带来了困难。

随机扩增 DNA 多态性(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)技术以其操作简单、快速、花费少、DNA 用量少、无放射性等优点,广泛应用于中草药种质资源亲缘关系、遗传多样性及药材道地性研究等方面^[5-6]。本研究正是基于甘肃省板蓝根生产及销售实际中不能提供科学的药材道地性鉴定等问题,利用 RAPD 技术对甘肃省定西市农业科学研究院选育的板蓝根新品系 BLG2012-04 与当地大田栽培种进行分析鉴定,考证其遗传多样性和亲缘关系,为甘肃省板蓝根的产业化发展提供部分分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用 2 个板蓝根样品种子分别为培育品系 BLG2012-04 和当地大田栽培种(CK),均由甘肃省定西市农业科学研究院提供,种子采集于 2014 年 9 月,每个样品均采集种子 500 粒。

1.2 方法

1.2.1 板蓝根种子的萌发 挑选颗粒饱满均匀的板蓝根种子,用 1 g/kg 次氯酸钠溶液表面消毒 10 min,用蒸馏水少量多次冲洗若干次,至无次氯酸钠味道为止。消毒过程中轻摇数次,以提高消毒

效果^[7]。取 10 个花盆,分为 BLG2012-04 和 CK 两组,每组 5 盆。每盆中均匀撒播 30 粒种子,覆土 2 cm。培养条件为温度 25 ℃,光照强度 1 000~2 000 Lx、每天连续光照 12 h,每隔 48 h 浇水 1 次。

1.2.2 DNA 的提取 采用 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法提取植物基因组 DNA,所用试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。提取后的 DNA 在 4℃ 保存待用,对提取的 2 个供试材料的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,以确保为后期 PCR 扩增提供良好的模板。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 扩增反应在 BIO-RAD 普通型 PCR 仪上进行,RAPD 引物由北京奥科生物技术公司生产,所用 Taq 酶购自天根生化科技(北京)有限公司。

RAPD 反应体系:模板 DNA 1 μL,随机引物 2 μL,Taq 酶 10 μL,加 ddH₂O 至 20 μL。

扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min 后,94 ℃ 1 min,30 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共计 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。

采用 1%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,UVI 凝胶图像分析系统观察照相。每实验重复 3 次。

1.3 数据处理

参照 Williams 等的方法^[8]。电泳扩增图谱中的每条带(DNA 片段)均为 1 个分子标记(Marker),并代表 1 个引物结合位点。根据各分子标记在相同电泳迁移率下(相同分子量片段)的有无,统计得到所有位点的二元数据,有 DNA 扩增带(显性)为 1,无带(隐性)记为 0,强带和弱带赋值为 1。对于多态性位点,采用在重复试验中能稳定出现的差异带用于数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同引物扩增品系 BLG2012-04 和当地大田栽培种的结果

通过引物筛选,对 2 个品系挑选出谱带清晰、重复性好、多态性较丰富的 11 条随机引物用于 PCR 扩增反应。引物分别为 P1、P2、P4、P5、P7-P13。所用引物及扩增条带数见表 1。对于 BLG2012-04 品系,11 条引物共扩增出 119 个位点,不同引物的扩增位点变幅为 8~13 个,平均每条引物能扩增出 10.8 个位点;对于 CK,11 条引物共扩增出 119 个位点,不同引物的扩增位点变

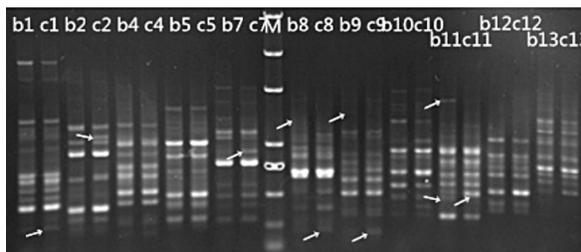
幅为 8~14 个, 平均每条引物能扩增出 10.8 个位点。

2.2 相同引物扩增品系 BLG2012-04 和当地大田栽培种的结果

利用 11 条引物, 分别扩增两品系, 从而在分子水平上反映两品系间的遗传差异性。筛选出的 11 条引物分别为 P1、P2、P4、P5、P7、P8、P9、P10、P11、P12、P13 (引物及其扩增条带数见表 1)。结果显示, BLG2012-04 和 CK 的主谱带基本一致, 说明它们的遗传背景具有很大的相似性, 但是两者间的次谱带存在一定差异。相同引物扩增 2 个品系产生的总位点数的范围为 16~27 个, 其中多态性位点的差异变幅为 1~2 个。这说明 2 个品系之间存在遗传学差异, 表现出具有遗传多态性位点(图1)。

表 1 引物序列和对 BLG2012-04 及 CK 的扩增结果

引物	序列	扩增BLG2012-04 总带数 (个)	扩增CK 总带数 (个)
P1	5'-GTTTCGCTCC-3'	13	14
P2	5'-CCGCATCTAC-3'	10	11
P4	5'-CCGCGTCTTG-3'	10	10
P5	5'-AAAGTGGGGC-3'	13	13
P7	5'-CAAACGTCGG-3'	10	11
P8	5'-GGCTAACCGA-3'	8	8
P9	5'-GTAGACCCGT-3'	13	13
P10	5'-GGACCCTTAC-3'	12	12
P11	5'-GAACGGACTC-3'	11	8
P12	5'-TGACGCATGG-3'	8	8
P13	5'-CCTTTCGCTC-3'	11	11



(箭头指示差异条带的位置; b 代表 BLG2012-04; c 代表 CK 品系; b、c 后面的数字表示引物编号; M 为 MakerIII)

图 1 BLG2012-04 和 CK 的 RAPD 电泳图谱

3 结论与讨论

1) 影响 PCR 扩增条带的因素有模板 DNA、引物、dNTPs 量、Taq 酶、退火温度、电泳中的琼脂糖浓度、电泳时间等。本研究对退火温度和电泳时间这两个因素进行了优化分析, 最终确定了板蓝根材料的最适 RAPD-PCR 扩增反应体系为模板 DNA

1 μ L, 随机引物 2 μ L, Taq 酶 10 μ L, ddH₂O 7 μ L; RAPD 引物最佳退火温度为 30 $^{\circ}$ C, 最适琼脂糖浓度为 1%。此体系的建立可以为其他板蓝根品系的 RAPD 扩增提供参照依据。

2) RAPD 是一种显性标记, 能从分子水平上揭示材料间存在的遗传差异^[9-11]。从 RAPD 的结果可以看出, 2 个不同的供试材料的主谱带基本一致, 说明它们的遗传背景具有很大的相似性。表明甘肃省新选育的板蓝根品系 BLG2012-04 和当地大田栽培种之间的遗传关系较近。这种情况可能是由于在板蓝根种植过程中, 两个品系之间的地理分布近, 并且板蓝根是自交不亲和的异花授粉植物, 从而使不同板蓝根品系间相互授粉的几率大大提高, 造成品系间的遗传关系较近。次谱带存在不同程度的差异, 多态性位点的差异变幅为 1~2 个。这在分子水平上说明板蓝根品系 BLG2012-04 与当地大田栽培种具有一定的遗传差异性。

参考文献:

- [1] 王兴政, 刘效瑞, 杨薇靖. 6 个板蓝根新品系在定西市的品比试验报[J]. 甘肃农业科技, 2014(5): 14-16.
- [2] 杨薇靖, 王兴政. 定西半干旱区板蓝根栽培技术[J]. 甘肃农业科技, 2013(5): 66-67.
- [3] 陈庆. 板蓝根药理作用与临床应用[J]. 中国药事, 2009, 23(6): 607-608.
- [4] 安益强, 贾晓斌, 袁海建, 等. 板蓝根抗病毒物质基础研究思路[J]. 中草药, 2008, 39(4): 616-619.
- [5] 郑学项, 冯素萍, 李维国. DNA 分子标记研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(26): 12 420-12 422.
- [6] 任爱农, 秦民坚. 基于 RAPD 分子标记技术的中药材鉴定研究进展[J]. 中兽药, 2008, 6(3): 338-341.
- [7] 吾拉尔古丽, 王建华, 李先恩. 板蓝根种子发芽试验标准化研究[J]. 种子, 2005, 24(6): 34-36.
- [8] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIBAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nuc Aci Res, 1990, 18(22): 6 531-6 535.
- [9] 梁慧敏. 不同居群狗牙根 RAPD 分析[J]. 草业学报, 2010, 19(1): 258-262.
- [10] 刘欢, 慕平, 赵桂琴. 基于 AFLP 燕麦遗传多样性研究[J]. 草业学报, 2008, 17(6): 121-127.
- [11] 解新明, 卢小良. 利用 RAPD 标记分析狼尾草属牧草品种间的遗传关系[J]. 草业学报, 2005, 14(2): 52-56.

(本文责编: 郑立龙)