

· 药材与资源 ·

福建金线莲 DALP 遗传多样性分析

杨春勇¹, 李戈¹, 王艳芳¹, 高微微², 李荣英¹, 唐玲^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所云南分所 西双版纳州傣药南药重点实验室, 云南 景洪 666100

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** 通过分子标记技术对不同产地野生福建金线莲及近似种的遗传多样性进行分析, 了解不同产地福建金线莲及近似种的遗传差异。 **方法** 采用直接扩增片段长度多态性 (DALP) 分子标记技术, 对产多个产地的野生福建金线莲及近似种的 18 个居群进行多样性检测。 **结果** 筛选出 6 个引物组合, 总共扩增得到 355 个多态性位点, 遗传多态性为 100%, 平均每组引物扩增所得多态位点为 59.2 个。其中 14 个福建金线莲居群多态百分率为 95.77%, 其平均观测等位基因数 (N_a) 为 1.273 4, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.074 4, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.056 2, Shannon 信息指数 (I) 为 0.096 9, 遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.423 0, 基因流 (N_m) 为 0.681 9。 **结论** 不同福建金线莲居群之间存在较高的遗传分化、基因交流较小。地理隔离和资源锐减可能是造成福建金线莲居群间基因流动受到限制的原因。

关键词: 福建金线莲; 遗传多样性; 种质资源; 遗传分化系数; 基因流

中图分类号: R282.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)19-2824-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.19.018

Genetic diversity of *Anoectochilus roxburghii* by DALP

YANG Chun-yong¹, LI Ge¹, WANG Yan-fang¹, GAO Wei-wei², LI Rong-ying¹, TANG Ling¹

1. Key Laboratory for Dai and Southern Medicine of Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture, Yunnan Branch Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, and Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To investigate the genetic polymorphism of wild *Anoectochilus roxburghii* and its allied species by molecular marker and find out the genetic differences between them. **Methods** Direct amplification of length polymorphism (DALP) was applied to evaluate the genetic variation of 18 populations of *A. roxburghii* and its allied species from different places. **Results** Six pairs of primers were selected to detect 355 polymorphic loci in 18 populations, the percentage of polymorphic bands (PPB) was 100%, and the amplified average polymorphic locus by each pair of primers was 59.2. The percentage of PPB of 14 populations of *A. roxburghii* was 95.77%, its observed number of alleles (N_a) was 1.2734, effective number of alleles (N_e) was 1.074 4, Nei's gene diversity (H) was 0.056 2, Shannon's information index (I) was 0.096 9, coefficient of gene differentiation (G_{st}) was 0.423 0, and estimated gene flow (N_m) was 0.681 9. **Conclusion** The results indicate that *A. roxburghii* has larger genetic differentiation and lower gene flow among populations. Geographic isolation and wild resource loss may be the major causes of the limited gene flow.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl; genetic diversity; germplasm resources; gene differentiation; gene flow

金线莲别名金线兰、金丝草, 在民间以全草作为药用, 为珍稀名贵中药材, 其主要基原植物为福建金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 和台湾金线莲 *A. formosanus* Hayata^[1-2]。其中, 福建金线莲具备清热凉血、祛风利湿、除湿解毒等功效, 具有较高的药用价值^[3]。同时由于生长习性独特、

野生资源分布较少, 再加上人为的过度采挖, 造成其野生资源的日益匮乏和 market 价格的居高不下。另外, 由于形态特征近似, 一些同属以及斑叶兰属和血叶兰属的其他种在市场上也称为金线莲, 造成了金线莲种源混杂, 影响了金线莲的药材品质。

金线莲规范化栽培是保护野生资源、缓解药材

收稿日期: 2014-04-19

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金资助项目: 云南省金线莲的种质资源收集及遗传多样性研究 (YZYN-12-04); 中国医学科学院药用植物研究所创新团队研究计划: 热带名贵药用植物种质创新与繁育 (121306)

作者简介: 杨春勇 (1981—), 男, 助理研究员, 主要从事药用植物栽培研究。Tel: (0691)2134865

*通信作者 唐玲 (1984—), 女, 助理研究员。E-mail: tl129@126.com

短缺的重要举措。筛选出农艺性状好、药效成分高的优良品种是规模化栽培的前提,而品种选育需要对种质资源遗传背景进行深入研究。因此,通过分子标记等技术手段了解种质资源的遗传信息是十分必要的。直接扩增片段长度多态性(direct amplification of length polymorphism, DALP)标记是基于PCR的一种检测DNA多态性的方法,具有信息量大、无需预知DNA序列信息,以及较高重复性和稳定性的优点^[4],被用于物种分类、品种鉴定、居群遗传学研究等^[5-8],是研究植物遗传多样性常用的分子生物学技术。

由于目前关于福建金线莲的研究较多集中在生物学特性^[9-11]、组织培养^[12]、化学成分和药理作用等方面^[13],与其遗传背景相关的研究较少,因此本研究采用DALP分子标记技术,以不同地理来源14个福建金线莲及4个近似种居群为样本,从分子水平了解野生福建金线莲资源的多样性和遗传差异,为其驯化栽培、保护和利用提供理论参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

依据金线莲的地理分布特点,样品分别采集自云南、福建、海南等地(表1),并由中国医学科学院药用植物研究所云南分所李海涛副研究员鉴定。每份材料选取6棵植株,每棵植株分别取1~2片幼嫩叶片,放于纸袋中,于-20℃保存。

表1 试验材料及来源

编号	种名	采集地点
A1	滇南开唇兰 <i>A. burmannicus</i>	云南文山
A2	福建金线莲 <i>A. roxburghii</i>	云南景洪
A3	福建金线莲	福建永安
A4	线柱兰一种 <i>Zeuxine</i> sp.	海南海口
A5	福建金线莲	云南金平
A6	福建金线莲	云南金平
A7	福建金线莲	云南金平
A8	福建金线莲	云南蒙自
A9	福建金线莲	云南蒙自
A10	福建金线莲	云南蒙自
A11	福建金线莲	云南屏边
A12	福建金线莲	云南文山
A13	福建金线莲	云南屏边
A14	福建金线莲	云南屏边
A15	福建金线莲	云南文山
A16	台湾金线莲 <i>A. formosanus</i>	福建永安
A17	大花斑叶兰 <i>Goodyera bilamellata</i>	云南保山
A18	福建金线莲	越南河江

1.2 仪器

Eppendorf 5804R 台式离心机, Eppendorf BioPhotometer Plus 核酸蛋白测定仪, Biometra TProfessional PCR 仪, Biorad PowerPac™ 基础电泳仪电源, Biorad Sub-Cell® GT Cell 电泳槽, UVI FireReader 凝胶成像系统, ABI 3730XL DNA 分析仪。

2 方法

2.1 总DNA的提取

每份样本分别采集6个单株上的新鲜叶片,叶片经液氮冷冻后研成细粉,用OMEGA E. Z. N. A. SP Plant DNA Kit进行DNA的提取,以50 μL Elution 缓冲液进行洗脱。通过1%琼脂糖电泳检测DNA的完整性,用核酸蛋白测定仪检测DNA的纯度和质量浓度,最后将DNA质量浓度调整为25 ng/μL。

2.2 DALP扩增及检测

参照已有文献中报道的扩增引物^[14-16],筛选出6对引物进行PCR扩增(表2)。PCR反应体系为20 μL,包括2 μL 10×PCR缓冲液,2 μL DNA模板(25 ng/μL),0.5 μL 正/反向引物(1 mmol/L),5 μL dNTPs(1 mmol/L),1 μL DNA聚合酶(0.5 U/μL),灭菌双蒸水9 μL。PCR反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s、52℃退火30 s、72℃延伸30 s,共36个循环;72℃延伸5 min。通过毛细管电泳检测电泳结果,将PCR产物稀释30倍,在96孔板的各孔中分别加入9.05 μL 去离子甲酰胺、0.05 μL Genescan 1 200 相对分子质量内标和1 μL 稀释后的PCR产物,95℃变性5 min,4℃静置10 min,3 000 r/min离心1 min,于ABI 3730XL DNA分析仪上进行毛细管电泳。5 kV预电泳2 min,2 kV进样10 s,15 kV电泳40 min,最后用Data Collection 软件收集原始数据。

表2 DALP标记分析的引物序列

引物	编号	序列(5'→3')
正向引物	P232	GTTTTCCCAGTCACGACGAC
	P233	GTTTTCCCAGTCACGACACG
	P234	GTTTTCCCAGTCACGACCAG
	P235	GTTTTCCCAGTCACGACCAC
	P243	GTTTTCCCAGTCACGACTCGA
	P245	GTTTTCCCAGTCACGACACCCAC
反向引物	PR1	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC

2.3 数据统计与分析

按扩增产物在相对迁移位置的有无，有赋以“1”，无赋以“0”，生成分子数据矩阵，应用 POPGENE 1.32 软件对 18 个居群进行遗传参数分析，计算观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性 (H)、Shannon 信息指数 (I)、遗传距离与遗传一致度等参数。

使用 NTSYS 2.1 软件对 Nei's 遗传距离进行非加权配对算术平均法 (UPGMA) 聚类分析，构建各居群之间亲缘关系聚类图。

3 结果与分析

3.1 不同引物检测的位点数和多态性

筛选 6 对能产生清晰、稳定谱带的引物对全部 108 个样本进行扩增，共检测到 355 个位点，多态性比率为 100%，片段大小在 100~1 200 bp。其中 14 个福建金线莲居群的多态性位点为 340 个，多态性比率为 95.77%。6 对引物检测的位点从 43 到 67 个不等，平均每对引物能检测到 59.2 个位点。

3.2 遗传距离

根据扩增位点信息计算得出，18 个居群样本的遗传距离介于 0.024 3~0.146 2，18 个居群中，种上水平遗传距离最大的是 A4 和 A13，为 0.146 2；遗传距离最小的是 A14 和 A16，为 0.054 8。种内遗传距离最大的是 A2 和 A13，为 0.094 1，遗传距离平

均值最小的是 A9 和 A10，为 0.024 3，种内遗传距离平均值为 0.059 0 (表 3)。

14 个福建金线莲居群间基因分化系数 (G_{st}) 值为 0.423 0，表明有 42.30% 的遗传分化存在于不同福建金线莲居群之间，有 57.70% 的遗传分化存在于居群内；居群每代基因流 (N_m) 为 0.681 9，表明不同福建金线莲居群之间存在的基因流较小。这说明不同产地金线莲居群之间存在较大的遗传分化，而且各居群间基因流动性较小。其中 N_a 介于 1.191 5~1.374 6，平均 1.273 4； N_e 介于 1.047 2~1.111 8，平均 1.074 4； H 介于 0.036 7~0.082 2，平均 0.056 2； I 介于 0.064 5~0.139 3，平均 0.096 9 (表 4)。结果显示不同地理来源福建金线莲居群内的遗传多样性水平较低。

3.3 聚类分析

UPMGA 聚类分析可以看出 (图 1)，以遗传相似性系数 0.08 为界，可以将 18 份样本划分为 2 个部分：第 1 部分为福建金线莲，包括居群 A2、A3、A5~A15、A18，共计 14 份，根据聚类结果可将其划分为 3 类，第 1 类包括福建永安居群 A3、云南蒙自居群 A8~A10、云南屏边居群 A11、A13、A14、云南文山居群 A12、A15，越南河江居群 A18，其中亲缘关系较近的居群为云南蒙自居群 A8~A10 和云南屏边居群 A11，云南文山居群 A12 和云南屏边居群 A13，云南屏边居群 A14、云南文山居群 A15

表 3 18 份样本的 DALP 标记扩增结果

Table 3 DALP amplification results of 18 populations

编号	多态性位点数	多态位点百分率 / %	居群内遗传距离	平均值
A1	39	10.99	0.019 9~0.046 1	0.034 3
A2	86	24.23	0.058 0~0.155 1	0.087 1
A3	81	22.82	0.058 0~0.122 7	0.085 3
A4	115	32.39	0.085 2~0.175 0	0.131 6
A5	107	30.14	0.070 0~0.148 5	0.104 6
A6	124	34.93	0.113 2~0.171 7	0.136 1
A7	143	40.28	0.125 9~0.202 2	0.167 0
A8	117	32.96	0.097 6~0.151 8	0.125 9
A9	138	38.87	0.119 5~0.205 7	0.154 8
A10	117	32.96	0.085 2~0.175 0	0.133 9
A11	131	36.90	0.091 4~0.181 8	0.135 4
A12	95	26.76	0.061 0~0.119 5	0.092 4
A13	81	22.82	0.064 0~0.113 2	0.087 1
A14	96	27.04	0.061 0~0.129 1	0.095 3
A15	111	31.27	0.094 5~0.132 3	0.114 0
A16	90	25.35	0.046 1~0.145 3	0.093 3
A17	104	29.30	0.914 0~0.165 0	0.126 0
A18	80	22.54	0.052 0~0.103 8	0.075 3

表 4 18 份样本的遗传多样性指数

Table 4 Genetic diversity indexes of 18 populations

编号	N_a	N_e	H	I
A1	1.087 3	1.024 4	0.018 0	0.030 8
A2	1.202 8	1.059 9	0.044 1	0.074 9
A3	1.205 6	1.055 4	0.042 0	0.072 6
A4	1.301 4	1.103 7	0.071 3	0.117 7
A5	1.253 5	1.067 9	0.051 3	0.088 9
A6	1.321 1	1.087 8	0.066 0	0.113 8
A7	1.374 6	1.111 8	0.082 2	0.139 3
A8	1.301 4	1.081 5	0.061 8	0.106 8
A9	1.354 9	1.100 3	0.074 9	0.128 3
A10	1.312 7	1.087 3	0.065 6	0.112 6
A11	1.321 1	1.085 3	0.065 1	0.112 9
A12	1.242 3	1.056 1	0.044 3	0.079 0
A13	1.202 8	1.059 8	0.044 2	0.075 0
A14	1.239 4	1.060 5	0.046 5	0.081 4
A15	1.284 5	1.071 0	0.054 9	0.096 5
A16	1.219 7	1.064 6	0.047 3	0.080 5
A17	1.264 8	1.102 3	0.068 8	0.111 3
A18	1.191 5	1.047 2	0.036 7	0.064 5

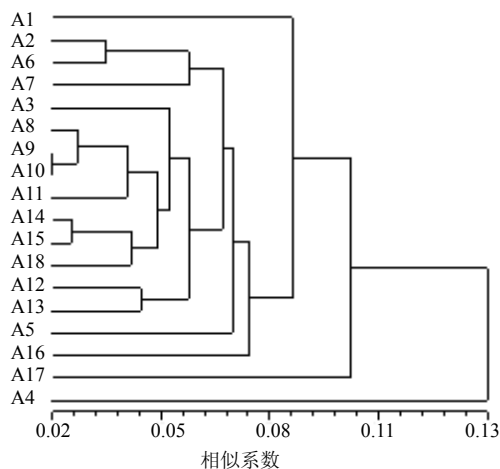


图 1 基于 DALP 标记 18 份样本的 UPMGA 聚类图

Fig. 1 DALP cluster analysis of 18 populations by UPMGA

和越南河江居群 A18; 第 2 类包括云南景洪居群 A2, 云南金平居群 A6、A7; 第 3 类为云南金平居群 A5。从采集样本的分布区域来看, 第 1 类福建金线莲来源较广, 包括福建永安, 云南蒙自、屏边、文山, 越南河江; 第 2、3 类福建金线莲来源仅限于云南景洪和金平。第 2 部分为福建金线莲近似种, 包括云南文山居群 A1、海南海口居群 A4、福建永安居群 A16 和云南保山居群 A17, 其中同属的 A1 和 A16 与福建金线莲的亲缘关系较近, 非同属的 A4 和 A17 与福建金线莲亲缘关系较远。

4 讨论

居群的遗传多样性丰富程度与其进化历程相关, 是其适应环境和生存能力的体现。对遗传多样性的研究可以揭示居群的进化历程, 为进一步分析其进化潜力和前景提供重要的资料, 从而有助于探讨物种濒危的原因及过程。

从物种水平上看, 14 个福建金线莲居群总的多态位点百分率 (PPB) 为 95.77%, 多态性较高, 但是从居群水平上看, 各居群的 PPB 介于 22.54%~40.28%, 多态性较低。福建金线莲居群间 G_{st} 值为 0.423 0, 即居群间的遗传变异为 57.70%, 居群内的遗传变异为 42.30%, 说明福建金线莲的变异主要存在于居群间, 而居群内的遗传分化相对较小。 N_m 值为 0.681 9, 说明居群间基因流较小, 这种情况会加大居群之间的遗传分化。由于一方面福建金线莲多分布于海拔 300~600 m 的中低丘陵区, 生长于气候凉爽、腐殖质丰富、水湿条件良好, 荫蔽度 60%~80%、空气相对湿度 85%~95% 的环境下^[17], 苛刻的生长条件造成福建金线莲居群在地理上呈不连续分布; 另一方面, 虽然福建金线莲在中国南方地区分布广泛, 然而不少分布地区由于生境破坏、过度采挖等情况, 造成金线莲的分布范围日益狭窄化、片段化。因此, 由上两方面产生的选择压力可能是导致居群分化的主要因素。

由于野生福建金线莲资源短缺、价格较高, 药材市场常出现以次充好的现象。另外, 即使是相同的物种, 由于分布地区、气候条件、栽培方式等因素不同, 不同产地的福建金线莲在化学成分方面也存在一定的差异^[18]。因此, 对其基原植物的鉴别也是十分必要的。顾慧芬等^[19]对金线莲进行了多态性分析, 认为随机扩增多态性 (RAPD) 方法可以区分不同产地的金线莲; 吴佳溶^[18]采用相关序列扩增多态性 (SRAP) 技术获得的聚类结果能对福建金线莲和台湾金线莲进行区分。张福生等^[20]对鉴定金线莲的 ISSR 技术进行了优化。DALP 的 UPGMA 聚类结果显示, 不同产地的各个金线莲居群之间存在一定的遗传差异, 在种上水平差异更为明显。因此, 虽然以上几种不同分子标记的原理不同, 但其结果均可对金线莲药材分类鉴别研究提供一定的参考。同时 DALP 是以通用测序引物 M13 为核心序列的双引物扩增, 可扩增得到 5' 和 3' 端的序列不同但都含有 M13 序列的 DNA 产物。由于本研究中 PCR 产物长度可达到 1 200 bp 左右, 对于一些存在

长度差异的序列可以省去克隆步骤直接通过 M13 引物进行扩增测序而进一步获得其序列信息。

福建金线莲作为珍稀濒危植物已经被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护范围, 生境变迁和过度采收等因素使得其居群的个体数量锐减, 这很可能导致其遗传多样性降低, 从而削弱其长期生存和适应环境的能力。保护野生资源、推广人工栽培是福建金线莲可持续利用的必经之路。目前已有不少公司和个人对福建金线莲进行收购和种植, 这对缓解野生资源的紧缺起到一定的积极作用。然而, 对于栽培的福建金线莲药材尚缺乏相关的质量标准, 而且产地、种源、栽培方式等因素都可能对福建金线莲药材的品质产生影响, 因此了解种质资源遗传背景信息, 有目的地进行杂交组合及其杂交后代的选择, 培育优良品种, 规范化种植, 是维系福建金线莲这一珍稀药材合理利用的重要举措。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 17 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 江苏省植物研究所. 新华本草纲要 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [3] 侯宽昭. 中国种子植物科属词典 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J. Direct amplification of length polymorphisms (DALP) or how to get and characterize new genetic markers in many species [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(6): 1458-1465.
- [5] Wang R J, Wang Y F, Lei G C, et al. Genetic differentiation with in metapopulations of *Euphydryas aurinia* and *Melitaea phoebe* in China [J]. *Biochem Gene*, 2003, 41(3/4): 107-118.
- [6] Marie J, Perrot M, Jacques L, et al. Tracking paternal genes with DALP markers in a pseudoarrhenotokous reproductive system: biparental transmission but haplodiploid-like inheritance in the mite *Neoseiulus californicus* [J]. *Heredity*, 2001, 84: 702.
- [7] Wai Y H, Forrest Chung F Y, Paul P H B, et al. Direct amplification of length polymorphism analysis differentiates *Panax ginseng* from *P. quinquefolius* [J]. *Planta Med*, 2001, 67: 587.
- [8] 夏惠茵, 游仲辉, 王 骏, 等. 直接扩增长度多态性技术在人参与西洋参鉴定中的应用 [A] // 劭鹏柱, 曹晖. 中药分子鉴定 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004.
- [9] 吴海清, 龚祝南. 金线莲和银线莲的比较解剖学研究 [J]. *江苏农学院学报*, 1996, 17(3): 25-29.
- [10] 张振珏, 陈 裕, 林坤瑞, 等. 花叶开唇兰营养体的结构 [J]. *云南植物研究*, 1992, 14(1): 45-48.
- [11] 唐 菲, 张小琼, 徐江涛, 等. 金线莲降血糖活性部位的筛选 [J]. *中草药*, 2011, 42(2): 340-342.
- [12] 张 铁. 金线莲组织培养研究进展 [J]. *文山学院学报*, 2013, 26(6): 11-13.
- [13] 张红艳, 潘 馨. 金线莲化学成分及药理活性研究进展 [J]. *海峡药学*, 2009, 21(1): 82-84.
- [14] 王 琼, 程 舟, 张 陆, 等. 野山人参和栽培人参的 DALP 指纹图谱 [J]. *复旦学报: 自然科学版*, 2004, 43(6): 1030-1034.
- [15] 王海英, 虞 泓, 李南高, 等. 云南丽江山慈菇遗传多样性的 DALP 分析 [J]. *云南植物研究*, 2005, 27(2): 156-162.
- [16] 吴 刚, 虞 泓, 崔光芬. 云南桃儿七遗传多样性的 DALP 分析 [J]. *中草药*, 2009, 40(6): 951-955.
- [17] 许文江, 陈 裕, 林坤瑞. 药用野生金线莲植物资源的研究 [J]. *福建热作科技*, 2000, 25(4): 9-10.
- [18] 吴佳溶. 不同地理种源金线莲有效成分含量测定及 SRAP 标记 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [19] 顾慧芬, 庄意丽, 梅其春. 野生与组培金线莲有效成分的比较及 RAPD 分析 [J]. *中成药*, 2011, 33(8): 1364-1367.
- [20] 张福生, 郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 137-142.