

• 药材与资源 •

我国黄花蒿天然群体遗传多样性的 SRAP 分析

陈大霞, 彭锐*, 李隆云, 崔广林, 吴叶宽

重庆市中药研究院 中药种植研究所 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065

摘要:目的 研究我国黄花蒿天然群体种质资源的遗传多样性, 并对其进行 SRAP 分析。方法 采用 SRAP 分子标记技术, 以我国天然群体主要分布区域的 60 份黄花蒿种质资源为试验材料, 运用 Popgene version 1.31 软件和 Treeconw 软件计算相关参数, UPGMA 方法聚类, 构建亲缘关系树状图。结果 24 对 SRAP 引物组合扩增出 232 条带, 多态性比率 (PPB) 为 81.47%。SRAP 标记的 Nei's 基因多样性 (H) 为 0.190 5, Shannon's 信息指数 (I) 为 0.300 0。青蒿素量高的 4 个地区之间, 多态位点百分率在 50.00%~61.21%, 平均为 55.82%, SRAP 标记的 H 值为 0.155 7~0.179 3, I 值为 0.237 9~0.276 6; SRAP 检测不同材料间遗传相似系数为 0.643 2~0.872 7, 平均为 0.754 7。结论 SRAP 标记能有效地揭示我国野生黄花蒿丰富的遗传多样性, 为黄花蒿新品种选育提供了物质基础。

关键词: 黄花蒿; SRAP; 遗传多样性; Nei's 基因多样性 (H); Shannon's 信息指数 (I)

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)08-1591-05

Genetic diversity of *Artemisia annua* in natural populations of China revealed by SRAP marker

CHEN Da-xia, PENG Rui, LI Long-yun, CUI Guang-lin, WU Ye-kuan

Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Institute of Material Medical Planting, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective The genetic diversity of *Artemisia annua* germplasmic resources in natural populations of China was analyzed by SRAP marker. **Methods** Taking 60 germplasm of *A. annua* version in main distribution areas of natural population in China as testing materials, the relative parameters were calculated by Popgene version 1.31 and Treeconw software. The systematic diagram of genetic relationship was made up by Treeconw software and clustered by UPGMA method. **Results** The 232 DNA bands were amplified with 24 pairs of SRAP primer combinations, and the percentage of polymorphic bands (PPB) was 81.47%. At species level: Nei's gene diversity (H) was 0.190 5 using SRAP marker. Shannon's information index (I) was 0.300 0 by SRAPs; Among the four areas with higher level of artemisinin: PPB were 50.00%—61.21%, the average was 55.82%. H were 0.155 7—0.179 3 by SRAP marker. I were 0.237 9—0.276 6 by SRAP maker; Genetic distance were 0.643 2—0.872 7, the average was 0.754 7. **Conclusion** SRAP marker is an efficient method in revealing the abundant genetic diversity of wild *A. annua* in China, which provides the material basis for promising germplasm of further breeding.

Key words: *Artemisia annua* L.; SRAP; genetic diversity; Nei's gene diversity (H); Shannon's information index (I)

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 为菊科一年生草本植物, 以全草入药, 有清热凉血等功效, 民间用于治疗高热不退、气管炎、中暑、皮肤瘙痒、荨麻疹、脂溢性皮炎等。从黄花蒿中提取的青蒿素具有较强的抗疟疾活性, 被世界卫生组织 (WHO) 推荐为一线抗疟中药。青蒿素 (artemisinin) 的量随产地不同差异极大, 具有显著的生态地域性^[1-2], 因此, 为了培育出高产优质的黄花蒿新品种, 有必要对全国黄

花蒿种质资源进行亲缘关系和遗传多样性分析。近年来, 已有采用分子标记进行黄花蒿遗传多样性研究的报道^[3-6], 但大多局限于某一地区的种质资源或研究材料相对偏少。为避免由此造成的偏差, 本实验采用 SRAP 标记技术对不同来源的野生黄花蒿 60 个样品进行分子评价, 旨在为黄花蒿遗传资源多样性及为黄花蒿资源保护、利用以及新品种选育提供分子依据。

收稿日期: 2011-01-06

基金项目: 国家科技攻关计划 (2004BA721A32); 国家科技支撑计划 (2006BAI09B01-04, 2006BAI09B02-04); 国家中医药管理局行业专项 (201107011)

作者简介: 陈大霞 (1968—), 女, 重庆人, 副研究员, 硕士, 主要从事药用植物分子生物学研究。Tel: (023)89029061 E-mail: 17837@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

黄花蒿天然群体采自我国黄花蒿的主要分布区域, 涉及 13 个省市, 共 60 份样品 (表 1), 其中含青蒿素量高的重庆市有 15 份、四川省 11 份、贵州省 8 份、广西壮族自治区 11 份。由重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定为黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的全草。参照文献报道^[7-9]方法进行取样, 即每个天然群体取 10 株, 选取成熟植株上的幼嫩叶片, 样品等量混合为 1 个样本, 这个样本代表该群体, 并放入装有硅胶的自封袋, 快速干燥。

1.2 基因组 DNA 的提取

参照文献方法提取基因组 DNA^[10]。用 Smart SpeeTM3000 型分光光度计 (Bio-Rad 公司) 测定其浓度和纯度, 将样品稀释为 40 ng/μL, 用作 PCR 扩增的模板。

1.3 SRAP-PCR 扩增

PCR 扩增在 Eppendorf Mastercycler® 梯度 PCR 仪 (Eppendorf) 上进行。SRAP 引物采用 Li 等^[11]的引物, 由北京赛百盛基因有限公司合成, 所用引物序列见表 2。SRAP-PCR 扩增程序参照 Li 等^[11]的方法, PCR 反应总体积为 25 μL, 每个反应体系含 1×PCR 缓冲液, MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTPs 250 μmol/L, 引物各 0.2 μmol/L, TaqDNA 聚合酶 1 U, 模板 40 ng, 不足部分 ddH₂O 补足。SRAP 扩增程序采用复性变温法, 共 40 个循环, 即 94 °C 预变性 5 min; 前 5 个循环: 94 °C 变性 30 s, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min; 后 35 个循环: 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min; 循环结束后 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保存。

1.4 产物的检测

取扩增产物 5 μL 在 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 以 0.5×TBE 为缓冲液, 稳压 150 V, 电泳至溴酚蓝距凝胶边缘 1 cm 处结束。采用银染

表 1 试验样品

Table 1 List of tested materials

编号	来源	编号	来源	编号	来源
1	重庆綦江 1	21	广西蒙山	41	四川岳池
2	重庆綦江 2	22	广西荔蒲	42	四川南充
3	重庆綦江 3	23	广西阳朔	43	四川盐亭
4	贵州桐梓	24	广西龙胜	44	四川梓潼
5	贵州遵义	25	湖南靖州	45	四川三台
6	贵州息烽	26	湖南麻阳	46	四川中江
7	贵州平坝	27	湖南凤凰	47	四川都江堰
8	贵州关岭	28	贵州铜仁	48	四川眉山
9	贵州晴隆	29	贵州松桃	49	四川乐山
10	云南昆明	30	重庆秀山	50	四川荣县
11	广西靖西 1	31	重庆酉阳	51	四川隆昌
12	广西靖西 2	32	重庆黔江	52	重庆荣昌
13	广西大新	33	湖北咸丰	53	重庆永川
14	广西崇左	34	湖北建始	54	重庆渝北
15	广西合浦	35	重庆奉节	55	河南郑州
16	海南海口	36	重庆武隆 1	56	河南鹤壁
17	海南定安	37	重庆武隆 2	57	北京北望山
18	海南琼中	38	重庆丰都 1	58	天津
19	广东雷州	39	重庆丰都 2	59	山东宁阳
20	广西岑溪	40	重庆长寿	60	山东青岛

法进行染色。染色后, 用 Caplio R4 数码相机照相、记录。

1.5 数据的采集、统计、分析

根据各分子标记的电泳迁移率及其有无, 统计所有二元数据, 按 DNA 条带的“有”或“无”进行统计, 有带 (扩增阳性) 记为“1”, 无带 (扩增阴性) 记为“0”, 强带和弱带的赋值均为 1, 形成 0/1 矩阵图输入计算机。对于多态性位点, 仅在重复试验中能稳定出现的差异带用于数据分析。

根据 SRAP 扩增的结果, 运用 Popgene version 1.31 软件计算多态性比率 (percentage of polymorphic bands, PPB)、Nei's 基因多样性 (Nei's

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 Sequences of SRAP primers

上游引物	序列 5' → 3'	下游引物	序列 5' → 3'	下游引物	序列 5' → 3'
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	EM1	GACTGCGTACGAATTAAT	EM8	GA CTGCGTACGAATTCTG
ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC	EM9	GACTGCGTACGAATTCGA
ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC	EM10	GACTGCGTACGAATTCAG
ME4	TGAGTCCAAACCGGACC	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA	EM11	GACTGCGTACGAATTCCA
ME5	TGAGTCCAAACCGGAAG	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC	EM12	GACTGCGTACGAATTGAT
ME6	TGAGTCCAAACCGGTAA	EM7	GACTGCGTACGAATTCAA		

gene diversity, H), Shannon's 信息指数 (Shannon's information index, I) 和 Treeconw 分析遗传距离 (genetic distance, D)。采用 UPGMA 聚类法建立系统聚类分支树状图。

2 结果与分析

2.1 SRAP 标记的多态性

本研究从 66 个 SRAP 引物组合中筛选出 24 个扩增谱带清晰并呈现多态性的引物组合用于 SRAP-PCR 扩增, 图 1 为引物组合 ME6-EM2 的扩增图谱。扩增结果见表 3, 扩增片段大部分集中在 100~600 bp。24 个 SRAP 引物共扩增出 232 条可区分的 DNA 条带, 每个引物检测到的位点在 5~13 个, 平均每个引物扩增出 9.3 条带。在扩增的 232 DNA 条带中, 有 189 条带呈多态性, PPB 为 81.47%, 每个 SRAP 引物可扩增出 4~12 条多态性带, 平均每个引物产生 7.6 条多态性带。

2.2 遗传多样性分析

由 I 和 H 估计 60 份野生黄花蒿的基因多样性, 观察到的等位基因数目 (N_a) 为 1.806 0, 有效等位基因数目 (N_e) 为 1.309 3, $H=0.190\ 5$, $I=0.300\ 0$ 。

由 I 和 H 估计青蒿素量高的 4 个地区的野生黄花蒿的基因多样性, 见表 4。不同地区的 PPB 在 50.00%~61.21%, 平均为 55.82%。 H 在 0.155 7~0.179 3, 平均为 0.168 3。 I 在 0.237 9~0.276 6, 平均为 0.258 7(表 3)。

2.3 聚类分析

用 Treeconw 软件计算供试材料间的遗传相似系数。结果表明, 重庆綦江 2 与重庆秀山之间的遗传相似系数最小, 为 0.643 2; 重庆丰都 2 与重庆长寿之间遗传相似系数最大, 为 0.872 7。各供试材料间的遗传相似系数平均为 0.754 7。

据 SRAP 数据计算的遗传相似系数, 按 UPGMA 法进行聚类分析, 建立聚类分支树状图 (图 2)。60

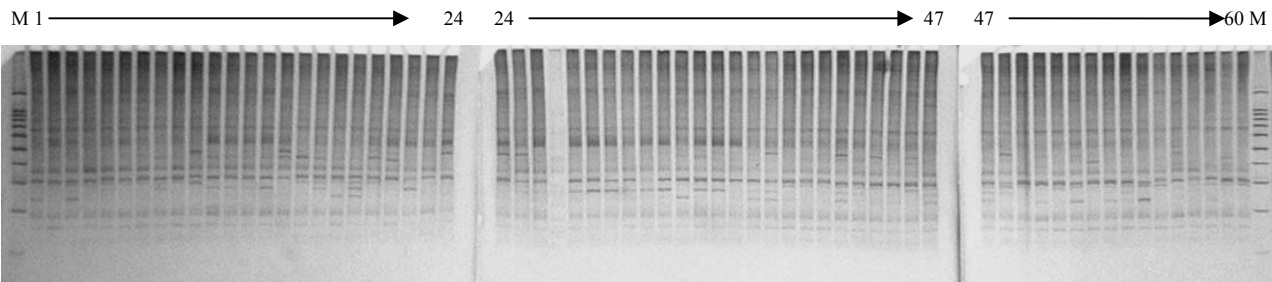


图 1 引物 ME6-EM2 的扩增图谱
Fig. 1 Amplification of primer combination ME6-EM2

表 3 24 个 SRAP 引物组合的扩增结果
Table 3 Amplification of 24 SRAP primer combinations

引物组合	总带数	多态性带数	PPB/%	引物组合	总带数	多态性带数	PPB/%
ME1-EM4	13	8	61.54	ME5-EM4	9	7	77.78
ME1-EM9	13	10	76.92	ME5-EM5	4	3	75.00
ME1-EM12	14	11	78.57	ME5-EM8	9	7	77.78
ME2-EM1	11	10	90.91	ME5-EM10	11	9	81.82
ME2-EM7	10	8	80.00	ME5-EM11	8	5	62.50
ME2-EM8	6	4	66.67	ME6-EM1	11	10	90.91
ME2-EM9	10	8	80.00	ME6-EM2	12	9	75.00
ME2-EM10	9	6	66.67	ME6-EM3	10	10	100.00
ME3-EM2	7	6	85.71	ME6-EM7	5	4	80.00
ME3-EM4	7	5	71.43	ME6-EM10	10	9	90.00
ME4-EM2	6	4	66.67	ME6-EM11	7	6	85.71
ME4-EM5	7	7	100.00	总合	232	189	
ME5-EM1	11	11	100.00	平均	9.28	7.56	81.47

表 4 青蒿素量高的地区黄花蒿的遗传多样性
Table 4 Genetic diversity of *A. annua* in high-content artemisinin area

地区	<i>N</i>	<i>K</i>	<i>P</i> /%	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
重庆	15	142	61.21	1.612 1 (0.488 3)	1.294 1 (0.340 8)	0.179 3 (0.185 5)	0.276 6 (0.265 7)
四川	11	116	50.00	1.500 0 (0.501 1)	1.258 9 (0.341 3)	0.155 7 (0.187 3)	0.237 9 (0.270 3)
贵州	8	126	54.31	1.543 1 (0.499 2)	1.266 1 (0.333 5)	0.163 1 (0.182 2)	0.252 3 (0.263 4)
广西	11	134	57.76	1.577 6 (0.495 0)	1.292 8 (0.355 5)	0.174 9 (0.190 6)	0.268 0 (0.271 4)
平均		128	55.82	1.558 2(0.495 9)	1.278 0 (0.342 8)	0.168 3 (0.186 4)	0.258 7 (0.267 7)

N-样点数, *K*-多态位点数, *P*-多态位点百分数, 括号内数据为标准误差
N-sample number, *K*-number of polymorphic loci, *P*-percentage of polymorphic loci, Standard deviation is in brackets

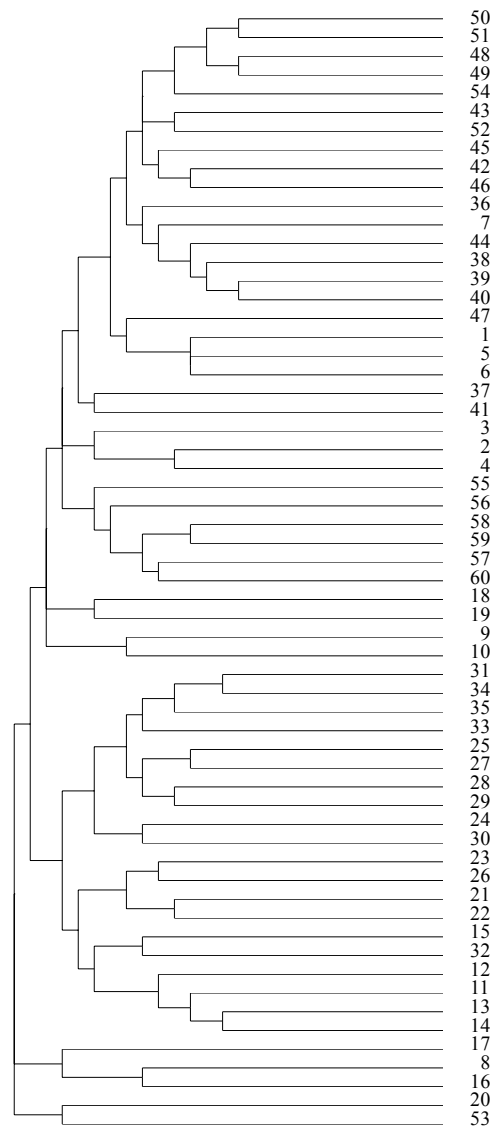


图 2 60 份黄花蒿种质资源的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 60 germplasmic resources of *A. annua*
个不同产地的黄花蒿聚为 3 类。第 1 类包括 55 份种质, 可以细分为 2 个亚类: 第 1 个亚类的种质主要来源于四川和重庆, 包括四川的 11 份种质、重庆的 10 份种质以及来源于北方的几份种质; 第 2 亚类的

种质主要来源于广西, 包括广西的 9 份种质、湖南的 3 份种质和湖北的 2 份种质。第 2 类有 3 份种质, 其中有 2 份种质来源于海南, 另一份来源于贵州关岭; 第 3 类仅 2 份种质, 来源于广西岑溪和重庆永川。聚类分支树状图中, 来源于贵州的种质聚类分散在 3 个类群中, 但在最小分支中还是表现出一定的地域相关性, 如贵州遵义和贵州息烽、贵州铜仁和贵州松桃聚在一起。以上聚类结果显示, 60 份黄花蒿种质的聚类有一定的地域相关性, 尤其在一些小分类群中表现尤其明显。

3 讨论

3.1 黄花蒿种质资源的遗传多样性

黄花蒿种质类型复杂多样, 其植物学性状表现出极高的形态多样性, 从植株高矮到叶色、叶形、株形等都表现出很大变异。蒋向辉等^[6]对 15 份种质资源材料形态调查表明: 株高、茎粗、茎色、夹角、节间距等形态指标适合于青蒿外部性状观察记载。目前, 应用形态标记对黄花蒿种质资源方面的研究主要集中在青蒿素的量与其生物学特性的关系, 黄正方等^[12]认为青蒿素的量与黄花蒿叶片的叶色、叶形, 茎秆的颜色有关系; 郑丽屏等^[3]研究认为, 青蒿素量高的黄花蒿具有较长的节间和较粗的茎秆。形态标记虽然简单易行, 可操作性强, 但易受外部环境的影响。而分子标记类型多、数量大, 分析 DNA 序列的差异, 不受环境影响, 已广泛应用于遗传多样性方面的研究。

关于黄花蒿自然分布居群的遗传结构分化研究, 在分子生物学方面已有报道。郑丽屏等^[3]首次通过 RAPD 技术分析了我国 10 个黄花蒿居群之间在遗传物质上的变化, RAPD 位点多态性及各居群中特征谱带的出现都表明我国黄花蒿群体中具有较丰富的遗传多样性, 黄花蒿遗传分化与青蒿素量变化及地理分布基本对应。为避免单一分子标记方法

对研究结果造成偏差,石开明等^[4]利用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术对 11 份鄂西野生青蒿种质进行了遗传多样性研究,两种标记揭示的多态百分率分别为 61.63%和 60.78%,表明青蒿种质具有比较丰富的遗传变异,均可以有效地揭示青蒿种质的遗传多样性状况。陈大霞等^[5]采用新型分子标记 SRAP 对 45 份供试黄花蒿种质资源的遗传多样性进行了初步分析。结果表明,多态性检测率较高,占 81.7%,证实 SRAP 是一种有效的标记。本实验对全国各地野生黄花蒿的代表性材料进行群体的遗传结构分析,同样证实野生黄花蒿具有丰富的遗传多样性。

以上研究虽然所采用的材料不同,方法各异,但均从分子水平上证实黄花蒿野生群体中存在着极显著的遗传变异,这些遗传变异是黄花蒿种质资源筛选的关键。产生这些遗传变异的原因是多方面的,有性生殖、体细胞突变、自然选择、基因流、遗传漂变及环境的影响等。本研究中的黄花蒿属于异花授粉植物,基因型高度杂合,遗传背景十分复杂,异花授粉产生新的基因组合,在自然界几乎每两个青蒿植株间都存在遗传差异。其种子小而多,萌发能力强且野生适应性高,能在自然条件下大量繁殖,成苗较易,因此有性生殖是黄花蒿产生遗传变异的主要因素。此外,环境的影响也是一个重要因素。我国从海拔 50 m 的沿海地带至海拔 3 650 m 的青藏高原均有黄花蒿分布,随着海拔的升高,气候、植被、土壤等各种生态环境也呈现明显的垂直变化,因而形成外部形态差异较大的生态型。

3.2 黄花蒿野生资源的开发与利用

黄花蒿的全草均可入药,能解暑、退虚热、抗癌,是中医传统使用的抗疟药,原产于中国,现在澳大利亚、阿根廷、保加利亚、法国、美国等许多国家均有栽培,种质资源十分丰富,为黄花蒿新品种选育提供了丰富的物质基础。黄花蒿虽然为世界广布种,但国外黄花蒿中青蒿素量多低于 0.1%,甚至微量^[8]。我国是青蒿素的主产国,主要分布在广西、云南、四川、贵州、重庆等省市。青蒿素的量随产地不同而差异极大,广西、四川等地黄花蒿中青蒿素量相对较高,在 0.4~1.0%,北方地区量多在 0.1%左右^[12]。青蒿素量低于 0.5%的黄花蒿几乎没有工业提取价值,使得青蒿素的天然资源相对匮乏。目前,通过化学的方法合成青蒿素的研究虽然取得一定的进展,但尚未显示出商业开发的可行性,从黄花蒿中提取分离仍是青蒿素的唯一来源。因此,

黄花蒿作为我国特有的抗疟植物资源,应该得到合理的开发与利用。

对黄花蒿种质资源的开发与利用在于培育出单位面积青蒿素量高的品种,而拥有丰富的种质资源是育种的基础,育种上突破性的进展往往取决于关键性优良基因的发掘和利用。因此,应合理开发与利用黄花蒿的种质资源,收集黄花蒿野生型、栽培型种质资源,建立种质资源圃。从生态适应性、生长习性、DNA 分子标记以及产量、有效成分量等经济性指标对黄花蒿种质资源进行综合评价,同时有目的地选用具有优良基因的野生品种通过选择、杂交、回交等方法培育出高产优质的新品种、新变种,使优良基因得到有效转移。此外,青蒿素量受环境因子的影响较大,极易因杂交或环境的改变造成优良性状的退化,在今后的研究中,应全力保护野生种所携带的决定重要经济性状的遗传基因。

参考文献

- [1] 钟国跃,周华蓉,凌云,等.黄花蒿优质种质资源的研究[J].中草药,1998,29(4):264-267.
- [2] Liu C X, Xiao P G, Peng Y, et al. Challenges in research and development of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 1-28.
- [3] 郑丽屏,王剑文,谭仁祥.黄花蒿种质资源的 RAPD 分析[J].中草药,2007,38(4):602-605.
- [4] 石开明,艾训儒,丁莉,等.鄂西地区青蒿遗传多样性研究[J].湖北农业科学,2008,47(7):740-743.
- [5] 陈大霞,李隆云,瞿显友,等.青蒿种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J].分子植物育种,2007,5(6):52-56.
- [6] 蒋向辉,余朝文,谷合勇,等.形态标记与 RAPD 标记在青蒿种质资源分类中的应用[J].江苏农业科学,2008(6):76-78.
- [7] 盛红梅,安黎哲,陈拓,等.忍冬属植物的遗传多样性及其种间关系研究[J].西北植物学报,2005,25(7):1405-1409.
- [8] 王冰,张勇,陈成彬,等.中国不同地居群丹参遗传多样性分析[J].中国中药杂志,2007,19(32):1988-1991.
- [9] 万亚涛,阿新祥,樊传章,等.云南疣粒野生稻 34 个居群遗传多样性的 ISSR 分析[J].中国水稻科学,2006,20(6):596-602.
- [10] 陈大霞,李隆云,钱敏,等.黄连药材 DNA 的提取及 RAPD 反应体系的优化[J].中草药,2006,37(8):1233-1237.
- [11] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brossica* [J]. *Theoret Appl Genet*, 2001, 103(2-3): 455-461.
- [12] 黄正方,郑贵华.影响青蒿成分(青蒿素)含量的因素研究[J].西南农业大学学报,1997,19(1):93-94.