

polyurethane blands [J]. *J Bioméd Eng* (生物医学工程杂志), 1995, 12(3): 191-196.

[4] Yu R M, Zhao H L, Zheng Y G, *et al.* Studies on the callus cultures of *Ginkgo biloba* and its metabolites-ginkgolides [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1999, 15(1): 51-58.

[5] Yu R M, Ma W X, Zhang H, *et al.* Studies on the polysaccharides in the cell cultures and the leaves of *Ginkgo biloba* [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1999, 20(5): 217-220.

[6] Song L Y, Ma W X, Yu R M, *et al.* Studies on the biological activities of polysaccharides from the cell cultures and the leaves of *Ginkgo biloba* [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志) 1999, 20(6): 278-280.

[7] Yu R M, Zhao H L, Zhang H, *et al.* Studies on the cell suspension culture of *Ginkgo biloba* [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报) 1999, 15(2): 207-210.

[8] Iborra J L, Guardiola J, Montaner S, *et al.* Enhanced accumulation of anthocyanins in vitis vinifera cells immobilized in PU F [J]. *Enzym Microb Technol*, 1994, 16(5): 416-419.

[9] Li X M, Hou S S, Chen S Y, *et al.* Study on immobilized suspension cells of *Berberis julianae* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1993, 35(Supp1): 101-105.

[10] Morris P, Scragg A H, Stafford A, *et al.* *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

[11] Yuan Y J, Hu Z D. Study on alkaloid production of immobilized *Catharanthus roseus* cells in polyurethane foams [J]. *Chem React Eng Technol* (化学反应工程与工艺), 1994, 10(2), 195-199.

[12] Departments of Microbiology, Wuhan University and Fudan University. *Microbiology* (微生物学) [M]. Beijing: Beijing Higher Education Press, 1987.

石斛属 4 种植物的 AFLP 分析

虞泓^{1,2*}, 和锐¹, 倪念春¹, 张时刚^{1*}

(1. 云南英茂生物技术实验室, 云南 昆明 650106; 2. 云南大学生命科学学院 生态遗传学实验室, 云南 昆明 650091)

摘要: 目的 研究石斛属植物 DNA 指纹图谱, 初步探讨 AFLP 分子标记技术在石斛地道性鉴别上的应用。方法 采用扩增片段长度多态性 (AFLP) 技术对石斛属内石斛组 4 个种和一个外类群种进行基因组 DNA 多态性分析。结果 从 64 对引物组合中选出 5 对引物组合构建了 5 个种的 DNA 指纹图谱。通过聚类分析, 石斛属 4 种植物聚成一个大类, 彼此关系得到了很好的分辨, 并获得 bootstrap 校验的有力支持。结论 AFLP 技术可用于药用石斛 DNA 指纹图谱研究。

关键词: 石斛属; AFLP; DNA 指纹图谱

中图分类号: R 282.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2004)07-0808-03

Fingerprinting analysis of plants of *Dendrobium Sw.* by AFLP

YU Hong^{1,2}, HE Rui¹, N I N ian-chun¹, ZHANG Shi-gang¹

(1. Inmolecular Laboratory of Biotechnology of Yunnan, Kunming 650106, China 2. Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract Object Studies on DNA fingerprinting of four species of *Dendrobium Sw.* and the application of amplified fragment length polymorphism (AFLP) to the identification of natural herbal. **Methods** The polymorphisms of four species from *Dendrobium Sw.* and one outgroup species were detected by AFLP technique. **Results** The DNA fingerprinting of five species were generated by fine primer combinations screened from 64 primer combinations. Four species of *Dendrobium Sw.* were clustered into one big group, whose relationships were distinguished very well. The results were strongly supported by bootstrap test. **Conclusion** AFLP technique has provided us with the method of study on the DNA fingerprinting of medicinal species of *Dendrobium Sw.*

Key words: *Dendrobium Sw.*; amplified fragment length polymorphism (AFLP); DNA fingerprinting

扩增片段长度多态性 (AFLP) 是在随机扩增多态性 (RAPD) 和限制性片段长度多态性 (RFLP) 技

* 收稿日期: 2003-10-12

作者简介: 虞泓, 博士生导师, 云南大学生物系教授, 云南英茂生物技术实验室主任, 主持云南大学生命科学学院生态遗传学实验室工作, 从事生态遗传学和居群生物学研究与教学。1996 年评为云南省学术和技术带头后备人才; 1997 年主持完成的《横断山区百合科四个属的细胞遗传与进化研究》获“云南省自然科学二等奖”; 1998 年主持完成的《云南百合科遗传多样性与进化研究》获首届“云南省青年科技奖”; 2000 年获云南省五四青年奖章; 2002 年云南省人民政府授予“云南省中青年学术技术带头人”称号; 2003 年获“云南省科技论文一等奖”。发表论文 40 篇 (SCI 论文 6 篇)。

* 通讯作者 Tel: (0871) 8327767 Fax: (0871) 8327761 E-mail: fisher@publink.km.yn.cn

术上发展起来的 DNA 多态性检测技术^[1], 具有 RFLP 技术高重复性和 RAPD 技术简便快捷的特点, 不需象 RFLP 分析一样必须制备探针, 且与 RAPD 标记一样对基因组多态性的检测不需要知道其基因组的序列特征, 同时弥补了 RAPD 技术重复性差的缺陷。同其他以 PCR 为基础的标记技术相比, AFLP 技术能同时检测到大量的位点和多态性标记。此技术已经成功地用于遗传多样性研究, 种质资源鉴定方面的研究, 构建遗传图谱等。罗志勇等^[2]首次用 AFLP 技术构建了人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 和西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的 DNA 指纹图谱, 具有丰富的多态性, 这对于鉴别人参品种, 真假人参等提供了非常有效的工具。

石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 是兰科植物中的第 2 大属, 全世界约有 1 000 种, 我国有 4 种和 2 变种, 产秦岭以南诸省区, 尤其云南南部为多^[3]。石斛以新鲜或干燥茎入药, 具有益胃生津、滋阴清热、润肺益肾、明目强腰之功效, 可治热病伤津、消化不良、病后虚脱、遗精盗汗、腰膝无力、肺结核等症^[4]。由于生境狭窄, 繁殖困难, 植株数量及少, 石斛一直是价格昂贵的紧缺药材。本实验采用 AFLP 技术对石斛属 4 个种 (共 20 个样品) 和一个外类群种 (共 5 个样品) 进行了基因组 DNA 多态性分析, 并结合聚类分析探讨了供试类群的亲缘关系, 说明 AFLP 技术可用于药用石斛的 DNA 分子指纹图谱构建。

1 材料与方 法

1.1 材料: 植物材料来源见表 1, 均由中国科学院北京植物研究所陈心启教授鉴定。

表 1 用于 AFLP 分析的石斛 (叶片)

Table 1 Plants of *Dendrobium* Sw. analyzed by AFLP

编号	植物名称	产地
NA (1~ 4)	碟花石斛 <i>Dendrobium phalaenopsis</i>	人工栽培
N (1~ 4)	金钗石斛 01 <i>D. nobile</i>	高黎贡山
ND (1~ 4)	金钗石斛 02 <i>D. nobile</i>	高黎贡山
NE (1~ 4)	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	高黎贡山
NB (1~ 4)	流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>	高黎贡山
NC (1~ 4)	束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>	高黎贡山

1.2 试剂: CTAB、Tris、β-巯基乙醇、EDTA 均购自美国 AMRESCO 公司; RNA 酶、dNTPs、Eco RI、Mse I、T4 DNA Ligase、人工接头、预扩增引物均来自上海生物技术和服务公司。Taq 酶购自美国

Promega 公司。选择性扩增引物: Mse I-XXX (X 为选择性碱基), Eco RI-XXX (此引物 5 端为荧光标记), 均购自美国 PE 公司。

1.3 仪器: 美国 PE 公司 377 测序仪; Gene Amp PCR System 2400, 美国 Millipore 超纯水系统, 意大利 Mixer Genius 生物反转摇匀仪, 瑞典 Analytical Balance 分析天平, 英国 Unicam Helios X 紫外可见分光光度计, 德国 Sigma 3K-30 冷冻高速离心机, Memmer 水浴锅。

2 方法和结果

2.1 植物总 DNA 提取: 采用常规 CTAB 方法提取植物新鲜叶片总 DNA^[5]。针对石斛属植物富含多糖的情况, 在细胞破壁前加入一个水洗步骤以去除多糖物质。DNA 经分光光度计和 DNA 荧光半定量法标定质量浓度。

2.2 AFLP 分析: 实验中为了降低成本, 将 PE 公司试剂盒中大部分试剂更换为国产或其他公司试剂。AFLP 扩增反应按照 PE 公司 AFLP 操作手册进行。取 0.3 μL 选择性扩增产物, 0.4 μL GeneScan-500 红色荧光标记的标准 DNA, 1.5 μL Loading Buffer 涡旋混匀, 95 °C 变性 5 min, 然后将其迅速置于冰上直到上样。电泳在 ABI PRISM 377 测序仪上进行: 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 1 × TBE, 3 000 V 2.5 h。电泳过程中 Macintosh 计算机收集数据并产生电泳图 (图 1)。电泳结束后用 GenScan 3.1 软件和 GenTyper 2.5 软件分析采集的数据, 在 Macintosh 计算机上用 PAUP 4.0b10 软件进行 UPGMA 聚类分析, 再进行 bootstrap 500 次重复抽样验证各分支的可信度, 构建聚类图 (图 2)。从 PE 公司试剂盒中的 64 对引物组合里筛选出 5 对组合用于正式扩增。各引物的扩增情况见表 2。两个金钗石斛居群分别彼此聚为一支, 形成姊妹群关系, 再与细茎石斛聚类。石斛属 4 种植物形成一个单系群后再与外类群碟花石斛聚合 (图 2)。

3 讨论

本实验室认为 AFLP 技术对石斛属种的鉴定及彼此亲缘关系的分析具有快速、准确、可信度高的特点。聚类结果 (图 2) 显示, 石斛属的 4 个种与人工栽培种碟花石斛准确地区分开, 单独聚为一支, 支持率为 856%; 4 个种之间, 金钗石斛与细茎石斛之间亲缘关系较近, 首先聚在一起, 再与流苏石斛、束花石斛聚为一类, 其中高黎贡山不同居群的金钗石斛各自聚为一类, 然后两个居群又聚为一类, 支持率高达 99%, 其余的细茎石斛、流苏石斛、束花石斛都各自聚为一支, 且支持率均超 90%。

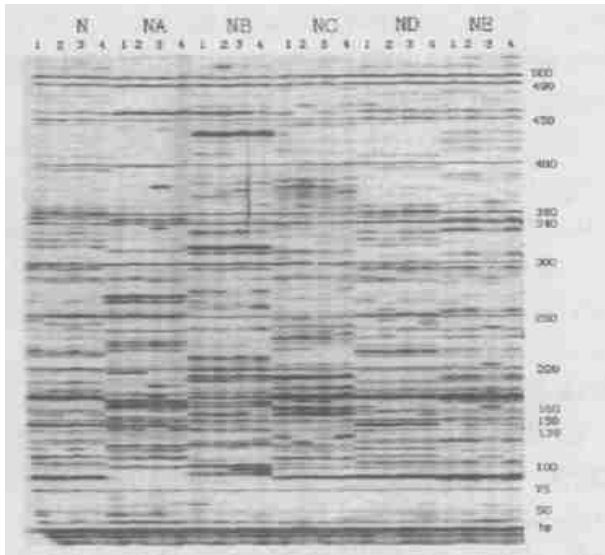


图 1 AFLP 分析电泳图

Fig 1 Electrophoresis pattern of AFLP fingerprints

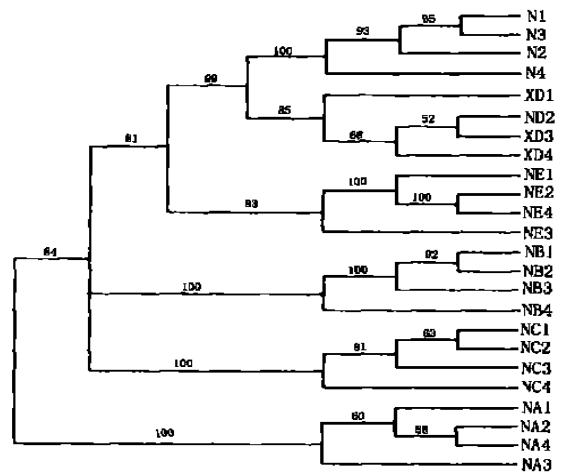


图 2 石斛样品的 UPGMA 聚类树

Fig 2 Dendrogram of plants of Dendrogram Sw constructed by UPGMA

表 2 用于石斛属扩增的引物组合、扩增片段数目及多态百分率

Table 2 Primer combinations used in PCR, results of amplification, and polymorphous ratio in plants of Dendrogram Sw.

名称	E-ACA/M-CAT 多态条带/总条带	E-ACT/M-CTA 多态条带/总条带	E-ACT/M-CAG 多态条带/总条带	E-AAG/M-CAT 多态条带/总条带	E-ACT/M-CTC 多态条带/总条带	多态率/%
金钗石斛	108/129	79/111	121/136	141/194	121/159	78.2
蝶花石斛	65/110	76/110	79/99	136/206	70/131	64.9
流苏石斛	64/101	68/109	64/100	64/107	78/137	61.0
束花石斛	81/118	92/121	94/117	122/169	129/179	73.6
细茎石斛	101/127	96/133	109/119	125/164	100/148	76.8

几种石斛种类的单独聚类说明 AFLP 方法可用于药用石斛种的正确鉴定, 两个金钗石斛居群的分别聚类说明 AFLP 方法可进一步用于石斛中药材的地道性分析。根据笔者对其他药用植物如红景天、虫草的研究, 认为 AFLP 方法较之 RAPD 方法在可信度、灵敏度和经济实用等方面具有较大的优势, 可推广到中药材种质鉴定和地道性研究中; AFLP 方法还可以用于中药材种间、品种间系统亲缘关系的识别, 这将为珍稀濒危药材的引种驯化、遗传育种和 GAP 规范化种植提供科学的理论依据; AFLP 方法在中药材分子指纹图谱中的成功应用, 必将对我国中药材种源的稳定和种质的提高起到良好的作用。实验中为了降低成本, 将 PE 公司试剂盒中的大多数试剂更换为国产或其他公司的试剂, 相比之下, 最后完成 AFLP 实验的成本比用 RAPD 方法的成本低, 更省时间, 更方便, 而且准确性更高, 数据更可靠, 技术难度也不大; 电泳可更换为传统的垂直板电泳——银染法, 这样 AFLP 方法成本进一步降低且更易于推广。AFLP 技术在种质资源及中药

材地道性研究应用中前景广阔。

致谢: 文字图片处理得到了代云波的帮助。

References:

- [1] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting [P]. EP 1534858 1992.
- [2] Luo Z Y, Zhou G, Zhou S Q, et al. Construction of genomic DNA fingerprinting in *Panax ginseng* and *P. quinquefolium* by AFLP [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(8): 626-629.
- [3] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [4] Xu L, Xu H H, Huang Z S, et al. *New Techniques of Cultivation for Good Agricultural Practice (GAP) and Industrializing Development of the Chinese Rare Medicinal Herbs* (中国名贵药材规范化栽培与产业化开发新技术) [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2001.
- [5] Zou Y P, Ge S, Wang X D. *Molecular Marker for Systematic and Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记) [M]. Beijing: Science Press, 2001.