

乌拉尔甘草优良品系选育研究(I) ——4个来源甘草遗传基础的 AFLP 分析

周成明¹, 许彬^{1,2}, 张金屯², 高文远³

(1. 北京时珍中草药技术有限公司, 北京 102609; 2. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875;

3. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要:目的 研究4个来源甘草属植物的遗传基础, 初步探讨扩增片段长度多态性(AFLP)分子标记技术在甘草品系选育中的应用。方法 采用AFLP标记技术对乌拉尔甘草栽培新品系“民勤1号”、“喀什1号”、“阿克苏1号”和常规栽培品系内蒙古乌拉尔甘草进行基因组DNA多态性、指纹图谱和UPGMA聚类分析。结果 从64对引物组合中筛选出了8对引物组合进行多态性分析, 以多态位点百分率最高的E-AAC/M-CAG组合构建4个来源甘草的指纹图谱。UPGMA聚类分析将4个来源甘草分为4组, 表现出不同的亲缘关系。结论 “民勤1号”、“喀什1号”、“阿克苏1号”形成了独特的基因构成, 可以作为乌拉尔甘草优良栽培新品系选育目标进行深入研究。

关键词:乌拉尔甘草; 良种选育; 指纹图谱

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1078-04

Selecting of good strain breeding in *Glycyrrhiza uralensis* (I) ——AFLP Analysis on genetic basis for four *Glycyrrhiza uralensis*

ZHOU Cheng-ming¹, XU Bin^{1,2}, ZHANG Jin-tun², GAO Wen-yuan³

(1. Beijing Shizhen Herbal Medicine Technology Co., Ltd., Beijing 102609, China; 2. College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. College of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Objective** To Study the genetic basis of four plants in *Glycyrrhiza* L. and apply the amplified fragment length polymorphism (AFLP) molecular marker technique to the selecting of good strain breeding of *Glycyrrhiza uralensis*. **Methods** The DNA polymorphism, fingerprinting, and UPGMA analysis of four cultivated species in *G. uralensis* from Minqin, Kashi, Akesu, and Inner Mongolia were detected by AFLP technique. **Results** Eight primer combinations were screened from 64 primer combinations to analyze DNA polymorphism and the DNA fingerprintings were generated by primer combination E-AAC/M-CAG. UPGMA Analysis showed that all the studied populations were clustered into four groups and had different relationships. **Conclusion** The results show that “Minqin No. 1”, “Kashi No. 1”, and “Akesu No. 1” have inimitable gene structure and should be studied more as new breeding resource.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; selecting for good strain breeding; DNA fingerprinting

豆科(Leguminosae)甘草属(*Glycyrrhiza* Linn.)植物中有3种甘草入药, 即乌拉尔甘草、胀果甘草、光果甘草^[1]。目前只有乌拉尔甘草进行大面积引种栽培, 每年产量已达 6×10^4 t, 畅销国内外市场, 并替代80%的野生甘草。但目前栽培甘草产品存在单位面积产量、甘草酸量偏低的问题, 许多栽培专家在大田栽培技术上进行了一系列的研究^[2~4], 但该问题没有得到很好的解决, 主要原因之一是目前还没有选育出农艺性状和品质优良并能够在栽培中进行推广的新品系。笔者从2001年开始进行乌拉

尔甘草优良品系的选育研究, 在甘肃民勤选育出具有优良性状的乌拉尔甘草栽培新品系, 命名为“民勤1号”, 其优良性状表现为植株抗逆性强, 越冬芽数量较多, 株型好, 栽培3年生植株开花、结籽数量多, 主根长、直、分叉少, 根头直径粗壮, 栽培3年生甘草酸量达到3%以上, 单株鲜质量平均达到100 g, 根鲜质量达到37 500 kg/hm², 比常规栽培品系内蒙古乌拉尔甘草要高出10 000 kg/hm²左右, 2005年扩繁了6.7 hm²。2004年又在新疆的喀什、阿克苏选育出两个优良栽培新品系, 分别命名为“喀什1号”、

收稿日期: 2006-11-10

基金项目: 国家自然科学基金“卫星搭载甘草种质选育的研究”(30472148)

作者简介: 周成明, 博士, 长期从事甘草等药用植物栽培技术研究开发。E-mail: zcmzzk@126.com Tel: 13501072627

“阿克苏 1 号”,目前已经扩繁了 200 hm²。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)结合了 RFLP 和 PCR 的优点^[5],既具有 RFLP 可靠性好、重复性高的特点,同时又具有 PCR 的高效性、安全性和方便性^[6],重复性比 RAPD 好,被广泛地应用于植物遗传育种方面的研究。为了确认乌拉尔甘草栽培新品系“民勤 1 号”、“喀什 1 号”、“阿克苏 1 号”与目前常规栽培品系内蒙古甘草在遗传本质上是否有所不同,本实验应用 AFLP 技术对以上 4 个来源乌拉尔甘草进行遗传基础分析。

1 材料与方法

1.1 材料:试验所用材料为乌拉尔甘草栽培新品系“民勤 1 号”、“喀什 1 号”、“阿克苏 1 号”和常规内蒙古乌拉尔甘草种子,种子由北京时珍中草药技术有限公司周成明采集鉴定。取干种子常规发芽,每种材料分别取 10 株胚根,混为一份样品,提取 DNA 组织。

1.2 DNA 组织提取:采用 CTAB 法提取^[7]。

1.3 AFLP 分析:模板 DNA 的酶切、连接、预扩增和选择性扩增的反应液配方和反应程序由北京鼎国生物公司设计进行。

1.4 AFLP 图谱分析:应用 ABI 377 测序仪进行 AFLP 多态性分析。

1.5 数据处理:将电泳图谱上清晰可见且可重复出现的条带记为“1”,同一位置没有出现的条带记为“0”,生成由“1”和“0”组成的原始矩阵。计算多态性位点百分率(P): $P=(k/n) \times 100\%$,其中 k 是多态位点数目, n 为所测位点总数。用 AFLP-SURVEY 1.0 (Vekemans *et al.*, 2002)软件计算每个居群的多态位点数,多态位点百分率(P),并计算居群、物种水平的遗传多样性(He) (Nei, 1978)^[8]。以 Jaccard 相似系数为参数用 NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1994)^[9]对 40 个乌拉尔甘草样品用非加权配对算术平均的方法(unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA)进行聚类分析。

2 结果

2.1 AFLP 分析的引物筛选及其标记的多态性:由此对 *Eco* RI 标记引物 E-AAC、E-AAG、E-ACA、E-ACT、E-ACC、E-ACG、E-AGC、E-AGG (8 个)和 *Mse* I 标记引物 M-AA、M-AC、M-AG、M-AT、M-TA、M-TC、M-TG、M-TT (8 个)完全排列组成的 64 对引物组合进行筛选,从中选出了 8 个谱带清晰、带型分布均匀并且多态性高的引物组合,共扩增出 1 025 条带谱,平均每个引物扩增出 128 条。8 对引物共扩增出多态性带 540 条,多态位点百分率为 52.7%,其中 44 条带为 40 个样品所共有,平均每对引物扩增出 67.5 条多态性带(表 1)。

表 1 适宜于甘草 AFLP 分析的 8 个引物组合序列及其扩增结果

Table 1 Base sequence of eight primer combinations for AFLP analysis and AFLPs generated among 40 individuals using above-mentioned eight combinations

引物组合	引物序列(5'-3')	总位点数	多态位点数	多态位点百分率/%
E-AAC/M-CAA	GACTGCGTACCAATTCAAAC GATGAGTCCTGAGTAACAA	129	68	52.7
E-AAC/M-CAG	GACTGCGTACCAATTCAAAC GATGAGTCCTGAGTAACAG	144	80	55.6
E-AAC/M-CTC	GACTGCGTACCAATTCAAAC GATGAGTCCTGAGTAACCTC	137	69	50.4
E-AAG/M-CAA	GACTGCGTACCAATTCAAAG GATGAGTCCTGAGTAACAA	111	59	53.2
E-AAG/M-CAG	GACTGCGTACCAATTCAAAG GATGAGTCCTGAGTAACAG	143	75	52.4
E-AAG/M-CTC	GACTGCGTACCAATTCAAAG GATGAGTCCTGAGTAACCTC	138	72	52.2
E-AAG/M-CTT	GACTGCGTACCAATTCAAAG GATGAGTCCTGAGTAACCTT	113	56	49.6
E-ACT/M-CTC	GACTGCGTACCAATTCAACT GATGAGTCCTGAGTAACCTC	110	61	55.4
总计/平均		1 025/128	540/67.5	—/52.7

2.2 品系内遗传多样性分析:不同品系多态位点数为 55~73,多态位点百分率从 48.4%(喀什 1 号)到 56.6%(内蒙古)不等;各品系的遗传多样性为

0.195 2~0.206 1,其中民勤 1 号的遗传多样性最大(0.206 1),遗传多样性最小的是喀什 1 号(0.195 2)。品系的平均遗传多样性 $He_p=0.191 6$ (表 2)。

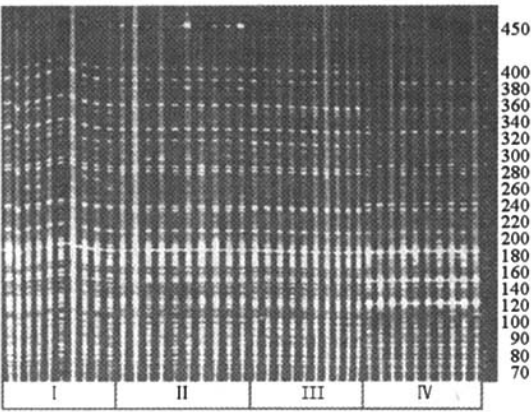
表 2 甘草品系内遗传多样性分析

Table 2 Genetic diversity within populations of *G. uralensis*

品 系	样品数	多态位 点数	多态位点 百分率/%	基因多样性 (<i>He</i>)	标准差
内蒙古	10	73	56.6	0.195 2	0.017 46
阿克苏 1 号	10	67	52.5	0.185 8	0.017 89
喀什 1 号	10	55	48.4	0.179 4	0.018 39
民勤 1 号	10	71	55.2	0.206 1	0.018 55
品系平均	10	66.5	53.2	0.191 6	—

2.3 指纹图谱构建:在筛选出的 8 对引物组合中,E-AAC/M-CAG 组合共扩增出 144 条带谱,扩增的 DNA 片段在 50~450 bp,其中多态性带谱为 80 条,共有带 64 条,多态位点百分率达到了 55.6%,为各引物中最高。特异性谱带 8 条,其中“民勤 1 号”分别在 74、95、113、167、258、300 bp 6 个位点处有区别于内蒙古乌拉尔甘草的特征谱带,“阿克苏 1 号”和“喀什 1 号”具有的特异性谱带数分别为 5 条(98、106、113、171、184 bp)和 2 条(89、357 bp)。因此,该引物组合具有较强的检测不同乌拉尔甘草基因型间遗传变异差异性的能力,用以构建“民勤 1 号”、“阿克苏 1 号”、“喀什 1 号”和内蒙古对照的指纹图谱(图 1)。

2.4 聚类分析:依据以上 8 对引物所扩增出的 4 个

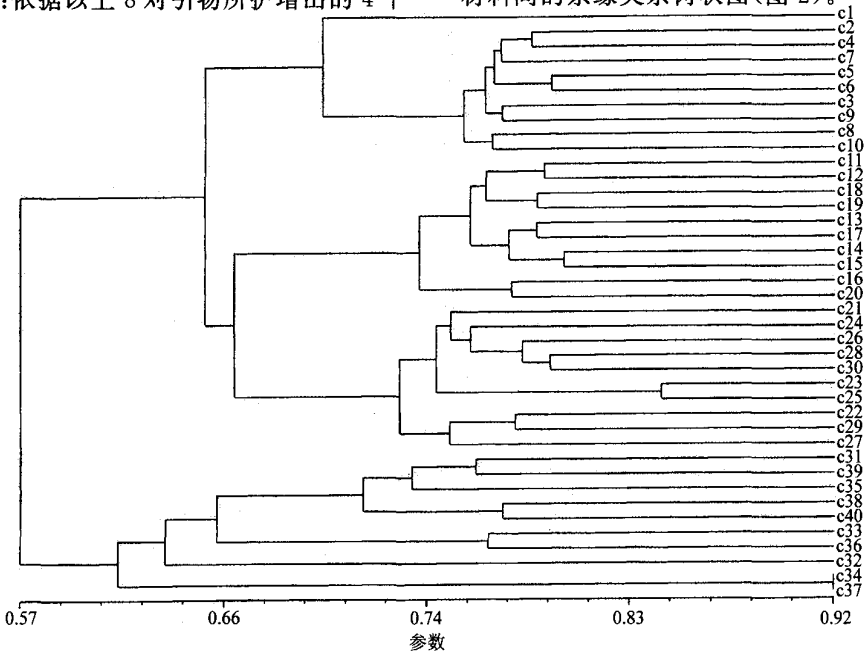


I-内蒙古对照 II-阿克苏 1 号 III-喀什 1 号 IV-民勤 1 号
I -Inner Mongolia II -Akesu No. 1
III -Kashi No. 1 IV -Minqin No. 1

图 1 基于引物组合 E-AAC/M-CAG 的 4 个来源乌拉尔甘草 AFLP 指纹图谱

Fig. 1 AFLP Fingerprinting amplified with primer E-AAC/M-CAG for four species of *G. uralensis*

来源乌拉尔甘草的 1 025 个 DNA 带谱的数据,按照 Jaccard 相似性系数进行 UPGMA 聚类,构建供试材料间的亲缘关系树状图(图 2)。



c1~c10-内蒙古对照 c11~c20-阿克苏 1 号 c21~c30-喀什 1 号 c31~c40-民勤 1 号
c1~c10-Inner Mongolia c11~c20-Akesu No. 1 c21~c30-Kashi No. 1 c31~c40-Minqin No. 1

图 2 基于 AFLP 数据的 40 份乌拉尔甘草样品的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram among 40 *G. uralensis* samples based on UPGMA cluster analysis of AFLP data

由图中可以看出,4 个来源乌拉尔甘草被聚为两组。其中,在 0.61 处“民勤 1 号”被分出;在 0.65 处其他 3 份样品聚在一起。在 0.67 处“阿克苏 1

号”和“喀什 1 号”被聚为一支,在 0.68 处内蒙古对照被分离。结果表明,“阿克苏 1 号”与“喀什 1 号”亲缘关系最近,内蒙古对照和“阿克苏 1 号”、“喀什 1

号”之间亲缘关系也较近,而“民勤1号”与其余3种亲缘关系较远。

3 讨论

甘草长期生长在甘肃、新疆恶劣气候条件下,其基因构成可能会产生不同程度的变异,而这种变异正是进行甘草新品系选育的基础。

“民勤1号”、“喀什1号”、“阿克苏1号”分别采集于甘肃、新疆等地的野生种群,笔者在对其进行引种栽培和优良品系选育的过程中,发现与常规人工栽培品系内蒙古乌拉尔甘草相比,在单位面积产量、抗性、产品品质等方面具有显著的优势。

UPGMA 聚类图表明4种来源乌拉尔甘草被划分为4组,并表现出不同远近的亲缘关系。遗传多样性分析显示,民勤1号的遗传多样性最大(0.2061),遗传多样性最小的是喀什1号(0.1952),这可能与生长环境有关:喀什较民勤生态环境恶劣,甘草生态位比较狭窄,遗传分化不如民勤明显。指纹图谱显示出“民勤1号”、“阿克苏1号”、“喀什1号”和内蒙古对照乌拉尔甘草相比具有的特异性谱带数量分别为6条、5条和2条。说明由于受到恶劣生长环境的长期影响,3个不同来源乌拉尔甘草经过较长时间的演变之后,已经各自形成了其独有的基因结构。因此

可以确定经过多年栽培选育的“民勤1号”、“喀什1号”和“阿克苏1号”可以作为乌拉尔甘草优良栽培新品系选育目标进行深入研究。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2005.
- [2] Zhou C M, Kong X F. A Study on cultivation techniques for *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. in Daxing County area, Beijing [J]. *China Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(3): 140-143.
- [3] Zhou C M. The outline of the normative cultivation techniques for *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Res Infor Tradit Chin Med* (中药研究与信息), 2003, 5(2): 25-28.
- [4] Zhou C M. Cultivation techniques for *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Xinjiang Farmland Reclamation Sci Technol* (新疆农垦科技), 2006(1): 14-15.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [6] Sun Q L, Liang Y R, Ding Z T, et al. AFLP Molecular marker technique and its application to tea genetic and breeding research [J]. *J Tea* (茶叶), 2004, 30(4): 203-206.
- [7] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1990, 12(1): 13-15.
- [8] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89, 583-590.
- [9] Rohlf F J. *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0 Exeter Software)* [M]. New York: Setauket, 1994.

佛手茎尖微嫁接技术研究

张桂芳, 贺红*, 徐鸿华, 林小桦, 吴立蓉

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 探讨佛手茎尖微嫁接技术,为佛手无病毒苗木的培育奠定基础。方法 黑暗条件下培养柠檬实生苗用作砧木,以佛手茎尖为接穗,采用倒“T”字形法进行茎尖微嫁接试验,并对影响嫁接成活率的因素进行研究。结果 成功获得了佛手茎尖微嫁接苗,并优化了微嫁接的条件:选取苗龄为14 d的柠檬实生苗为砧木,嫁接成活率较高;以带4个叶原基的佛手茎尖为接穗,效果较好,嫁接成活率可达65.2%;茎尖微嫁接后,切口外缠parafilm膜,能明显提高成活率。结论 建立了佛手茎尖微嫁接的方法,获得了嫁接成活苗。

关键词:佛手;茎尖微嫁接;成活率

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1081-04

Technique for shoot-tip grafting of *Citrus medica* var. *sarcodactylis*

ZHANG Gui-fang, HE Hong, XU Hong-hua, LIN Xiao-hua, WU Li-rong

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To study the technique for shoot-tip grafting of *Citrus medica* var. *sarcodactylis* in order to lay a foundation for culturing disease-free plantlets. **Methods** Using dark grown lemon

收稿日期:2006-09-08

基金项目:广东省自然科学基金项目(020792),国家中医药管理局研究课题(02-03ZP48)

作者简介:张桂芳(1980—),女,博士,从事药用植物组织培养及中药资源开发利用研究。

*通讯作者 贺红 Tel:(020)39358067 E-mail:hehong67@yahoo.com.cn