

- 分的变化规律 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 604-607.
- [4] 于晶, 陈君, 肖新月, 等. 不同来源黄芩产量及质量性状比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 491-494.
- [5] 方阵, 王康才. 黄芩生长特性与有效成分积累 [J]. 中药材, 2002, 25(2): 84-85.
- [6] 刘萍, 古今, 周文斌, 等. RP-HPLC 法考察桔芩与子芩不同部位中黄芩苷含量和不同炮制方法的影响 [J]. 中国药物应用与监测, 2007, 4(2): 23-25.
- [7] 徐纪文, 罗素芬. HPLC 法测定黄芩中不同部位的黄芩苷含量 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(3): 235-236.
- [8] 苏淑欣, 李世尚, 尚文艳, 等. 家种黄芩与野生黄芩及黄芩主根不同部位的黄芩苷含量研究 [J]. 承德民族职业技术学院学报, 2003(3): 79-80.
- [9] 赵德修, 李茂寅, 邢建民, 等. 光质、光强和光期对水母雪莲愈伤组织生长和黄酮生物合成的影响 [J]. 植物生理学报, 1999, 25(2): 127-132.
- [10] 张成军, 郭佳秋, 陈周祥, 等. 高温和干旱对银杏光合作用、叶片中黄酮苷和萜类内酯含量的影响 [J]. 农村生态环境, 2005, 21(3): 11-15.
- [11] 杨世海, 刘晓峰, 果德安, 等. 不同附加物对甘草愈伤组织培养中黄酮类化合物形成的影响 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(2): 96-99.
- [12] 中国植物志编写委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1977, 65(2): 194.
- [13] 洪志强, 高明, 宋春波, 等. 黄芩的人工栽培及质量研究述评 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(4): 630-633.
- [14] 谢琴, 华晓东, 王菊美. 不同产地、不同部位黄芩的黄芩苷含量测定 [J]. 上海中医杂志, 2001(3): 39-40.
- [15] 武吉华, 张绅, 江源, 等. 植物地理学(第四版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.

## 益母草种质资源遗传多样性的 AFLP 分析

余琪<sup>2</sup>, 沈晓霞<sup>2</sup>, 沈宇峰<sup>1,2</sup>, 陈加红<sup>1\*</sup>, 石从广<sup>1</sup>, 王志安<sup>2\*</sup>

(1. 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029; 2. 浙江省中药研究所, 浙江 杭州 310023)

**摘要:**目的 通过对 9 份益母草种质资源的 AFLP 分析, 探求各种质间的遗传多样性。方法 采用扩增片段长度多态性 (AFLP) 标记, 在 DNA 水平上进行遗传多样性研究, 筛选了 32 对选择性扩增引物, 将扩增出的条带作为原始矩阵, 用 NTSYS-PC 软件计算并分析了益母草种质间的相似性, 构建了遗传系统进化树。结果 SDS 法提取的益母草基因组 DNA 质量较好, 能够满足 AFLP 分析的要求; 从 32 对选择性扩增引物中, 筛选出 10 对多态性较强、带型较好、分辨率较高的组合, 构建了益母草 AFLP 指纹图谱, 将 9 个益母草种质全部区分开来; 通过构建进化树, 把 9 个种质分成 2 类。结论 益母草种质资源有丰富的遗传多样性, 某些形态特征差异和基因型存在相关性。

**关键词:** 益母草; 种质资源; AFLP; 遗传多样性

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)08-1296-04

### AFLP Analysis of genetic diversity of *Leonurus japonicus* germplasm resources

YU Qi<sup>2</sup>, SHEN Xiao-xia<sup>2</sup>, SHEN Yu-feng<sup>1,2</sup>, CHEN Jia-hong<sup>1</sup>, SHI Cong-guang<sup>1</sup>, WANG Zhi-an<sup>2</sup>

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Zhejiang Research Institute of Chinese Materia Medica, Hangzhou 310023, China)

**Abstract: Objective** The AFLP analysis of nine accessions of *Leonurus japonicus* was conducted to explore genetic diversities among germplasm. **Methods** Genetic diversities at DNA level among the germplasm of *L. japonicus* were studied by the amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker, and 32 pairs of selective amplification primer were identified. The similarities among the germplasm of *L. japonicus* were calculated and analyzed by the software of NTSYS-PC, and genetic evolution tree was developed, using amplified fragments as primary matrix. **Results** The quality of genomic DNA of *L. japonicus* extracted by SDS method was good enough to meet the requirement of AFLP analysis. Ten combinations with multiple morphologies, clear bands, and high discrimination rate were identified from 32 pairs of selective amplification primers. The AFLP fingerprinting was developed, which could differentiate each of nine accessions of *L. japonicus*. Nine accessions of *L. japonicus* could be classified into two types based on the evolution tree. **Conclusion** There are richer genetic diversities among the germplasm resources of *L. japonicus*, and certain relationships are found between some of morphological characteristics and genotypes.

\* 收稿日期: 2008-11-10

基金项目: 浙江省科技厅重大项目 (2005C12002-02)

作者简介: 余琪 (1965—), 男, 浙江, 学士, 高级工程师, 研究方向为中药剂工艺和质量标准。

Tel: (0571) 85229698 E-mail: yuqi917@hotmail.com

\* 通讯作者 陈加红 Tel: (0571) 85241074 E-mail: chenjihong@hz.cn

**Key words:** *Leonurus japonicus* Houtt.; germplasm resources; amplified fragment length polymorphism (AFLP); genetic diversity

益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 为唇形科益母草属植物的新鲜或干燥地上部分,原名茺蔚,始载于《神农本草经》,别名益母艾、苦草、坤草等,其味辛、微苦,性微寒,入心包、肝经,具有活血调瘀、调经利水的功能<sup>[1]</sup>。益母草属植物全球分布 23 种,我国有 12 种和 2 个变种,广泛分布于全国各地<sup>[2]</sup>。据了解,因益母草为全国广布种,各地均就近收购本地产益母草入药,而对于药材是否因产地不同而具有品质差异的报道<sup>[3]</sup>表明其所含生物碱量有所差异。这就严重影响益母草药材质量的稳定性及临床应用的效果,目前益母草的栽培技术不够完善,这已经成为益母草规范化栽培 (GAP) 及优良品种 (系) 大面积推广的瓶颈。所以筛选益母草优质种质资源对解决当前益母草种质资源混杂,指导该品种选育具有重要的意义。

### 1 仪器、试剂与材料

Bio-Rad smart spec-plus 核酸蛋白分析仪, Sigma 3 K15 冷冻离心机, Bio-Rad Dyad PTC-0220 PCR 仪, Bio-Rad GS-800 扫描仪, Bio-rad T2A 凝胶成像仪, 天能 EPS-100 电泳仪。

AFLP 接头和引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。EcoRI (20 000 U/mL、0.25 mL)、MseI (10 000 U/mL、0.025 mL)、BSA (10 mg/mL、0.25 mL) 和 T4 DNA Ligase (400 000 U/mL、0.025 mL) 由纽英伦生物技术 (北京) 有限公司生产, Taq DNA 聚合酶 (2 U/μL、1 000 U) 有北京鼎国生物技术有限责任公司生产。

实验材料为 9 个益母草种质资源包括采自浙江义乌、浙江泰顺、山东东营、云南陆良、浙江杭州、福建龙岩、江西万年、陕西渭南、安徽蚌埠 (依次编号为 1~9 号)。由浙江省中药研究所药材资源室教授俞旭平鉴定为益母草种质。

取新鲜幼嫩叶片提取基因组 DNA。9 份种质植株地上部分生物学特性、产量、质量分数的相关参数见表 1 (每份种质测量 10 个单株,取平均值)。

### 2 方法

2.1 采用 CTAB 法、SDS 法、尿素法,对益母草幼嫩叶片进行基因组 DNA 的提取,提取方法参考《植物基因工程》<sup>[4]</sup>。

2.2 酶切:每个反应总体积为 20 μL,其中包括:益母草基因组 DNA (100 ng/μL) 10 μL, EcoR 0.5 μL,

表 1 不同来源益母草品系生物学及盐酸水苏碱量相关参数

Table 1 Correlation parameter of biological characters and stachydrine hydrochloride content in *L. japonicus* from different origins

序号	品系来源	当日最低温度		产量/ (kg·hm <sup>-2</sup> )	盐酸水苏碱/ % (开花干草)
		4	-4		
1	浙江义乌	生长良好	冻蔫,后恢复	1 280	1.895
2	浙江泰顺	生长良好	冻蔫,后恢复	1 227	1.689
3	山东东营	稍冻蔫	冻蔫,未恢复	693	0.976
4	云南陆良	稍冻蔫	冻蔫,未恢复	1 147	1.368
5	浙江杭州	生长良好	冻蔫,后恢复	1 227	1.489
6	福建龙岩	生长良好	冻蔫,后恢复	1 200	0.627
7	江西万年	生长良好	冻蔫,后恢复	1 173	0.693
8	陕西渭南	生长良好	冻蔫,后恢复	1 120	0.968
9	安徽蚌埠	生长良好	冻蔫,后恢复	1 067	1.448

Mse 0.5 μL, BSA 0.2 μL, EcoR Buffer 2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.8 μL。37 酶切 5 h,酶切后 70

反应 15 min,使酶失活,再次离心后放置在冰上。

2.3 连接:酶切后,在酶切体系中加入接头连接反应液。EcoRI 接头的上游接头为 5-CTCGTAGACTGCGCGTACC-3,下游接头为 5-AAT-TGGTACGCA GTCTAC-3;Mse 接头的上游接头为 5-GACGATGAGTCCTGAG-3,下游接头为 5-TACTCAGGACTCAT-3。接头连接反应液包括:5 μmol/L EcoR 上游接头 2.5 μL,5 μM EcoR 下游接头 2.5 μL,50 μmol/L Mse 上游接头 2.5 μL,50 μmol/L MseI 下游接头 2.5 μL,T4 DNA Ligase 1.0 μL,T4 DNA Ligase Buffer (含 dATP) 4.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 5.0 μL,共 20.0 μL。

室温下混匀,离心,16 或室温下反应 15 h;反应结束后 70 反应 15 min,使酶失活;将上述反应液稀释 10 倍,不用的部分保存在 -20 冰箱中。

2.4 预扩增:EcoR 预扩增引物 (E pre-primer) 为 5-GACTGCGTACCAATTC-3;Mse 预扩增引物 (M pre-primer) 为 5-GATGAGTCCTGAGTAA-3。取 3.0 μL 连接后并稀释过的 DNA 样品,加入 27.0 μL 反应液:10 ×PCR Buffer 3.0 μL,10 mmol/L 的 dNTP 混合液 0.6 μL,10 μmol/L EcoR 端预扩增引物 1.0 μL,10 μmol/L Mse 端预扩增引物 1.0 μL,2.0 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶 1.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 20.4 μL。

混匀后,在 PCR 仪上扩增:94 5 min;94 30 s,55 (退火温度) 30 s,72 80 s,共 31 个循

环;72 延伸 10 min;4 保温。预扩增产物稀释 20 倍,-20 保存备用。

2.5 选择性扩增:取 5  $\mu$ L 预扩增稀释混合液,加入 15.0  $\mu$ L 反应液:10  $\times$ PCR Buffer 2.0  $\mu$ L,10 mmol/L 的 dNTP 混合液 0.4  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L *Mse* 端引物和 *EcoR* 端引物各 0.25  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.75  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 11.35  $\mu$ L。

混匀后,在 PCR 仪上扩增:94、5 min;94、30 s,65、30 s,72、60 s,以后每个循环温度递减 0.7,扩增 12 个循环;然后按 94、30 s,55、30 s,72、60 s 扩增 23 个循环;72 延伸 10 min,4 保温。

2.6 电泳和银染:用 40 mL 的 page 溶液在 1.0 mm 胶版上制胶一块,静置 3 h 后点样,在电泳仪上以 200 V 的电压电泳 3 h,然后在醋酸溶液中固定 30 min,纯水中清洗 10 min 后,银染 30 min,再放入显影液中显影,显影完成后放回醋酸固定液中。用扫描仪扫描胶片。

### 3 结果与分析

3.1 益母草基因组 DNA 的提取和质量分析:本研究比较了 SDS 法、CTAB 法和尿素法提取的益母草基因组 DNA 的产量和质量,结果表明,3 种方法都能获得益母草基因组 DNA,但 DNA 的产量和质量有明显差异,其中 SDS 法提取的 DNA, $A_{260}/A_{280}$  为 1.69~1.91,质量较佳,产量也是 3 种方法中最高;而 CTAB 法、尿素法所获得的 DNA, $A_{260}/A_{280}$  为 1.25~1.72,且多数低于 1.60,表明 DNA 样品中有较多杂质。

3.2 AFLP 指纹图谱的建立和鉴别效率:选择性扩增引物为预扩增引物 3 末端添加 3 个碱基,共筛选了 32 对引物。

经过对各个实验参数反复的比较和优化,建立了简便、高效的益母草 AFLP 分析体系。从 32 对引物组合中筛选了 10 对多态性较强、带型较好、分辨率较高的引物组合进行分析,10 对引物组合对 9 个益母草种质扩增结果见表 2。

由表 2 可知,10 对引物组合共在 897 个位点上扩增出条带,平均每对引物组合扩增位点为 89.70 个。平均每个种质扩增位点为 99.67 个。扩增位点数量最多是 18 号引物组合,共扩增出位点 105 个;扩增位点数量最少是 10 号引物组合,共扩增出的位点为 75 个。10 对引物组合共扩增出多态性位点 789 个,多态性位点占总扩增位点的比例平均为 87.96%,平均每对引物扩增多态性位点为 78.90 个。

表 2 10 对 AFLP 引物对 9 个益母草种质的扩增结果  
Table 2 Amplification of nine *L. japonicus* germplasm by ten pairs of AFLP primers

引物组合序号 ( <i>EcoR</i> - <i>Mse</i> )	选择碱基 ( <i>EcoR</i> - <i>Mse</i> )	扩增位点/ 个	多态性位点/ 个	多态性位点 比例/%
3	AAC-CCT	98	89	90.81
7	AAC-CTA	85	85	100.00
9	AAG-CAA	86	77	89.53
10	AAG-CCA	75	57	76.00
15	ATC-CCT	90	81	90.00
18	AGC-CCA	105	87	82.86
21	AGC-CAG	84	75	89.29
25	ACG-CAA	79	70	88.61
28	ACG-CAC	93	84	90.32
32	ACG-CTC	102	84	84.35
总计		897	789	87.96

3.3 9 个益母草种质的 AFLP 指纹图谱:在 9 个益母草种质中,共有多态性位点 789 个,平均每对引物组合扩增的每个种质的多态性位点为 8.77 个,这些条带组合对于特定的材料和引物位点是稳定的,利用这些条带,可以将生物学特性相近的种质区分开来(图 1),把有条带标记为 1,无条带标记为 0,通过这些位点的不同条带组合,可以构建益母草的 AFLP 指纹图谱,将 9 个益母草种质全部区分开来。

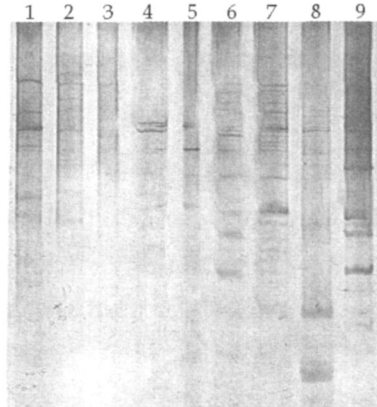


图 1 引物组合 E-AAG/M-CAA 选择性扩增产物电泳后的银染结果

Fig. 1 Staining result of selective PCR amplified by primer pairs of E-AAG/M-CAA

3.4 基于 AFLP 分子标记的益母草种质分类:将 10 对引物组合在 897 个位点上扩增出的条带作为原始矩阵,用 NTSYS-PC 软件计算并分析了 9 个益母草种质间的相似度(图 2),其中品系 3 和 4 相似系数最大,为 0.76,最小的是品系 1、2、5 和其他品系间的相似系数,只有 0.52,以相似系数 0.52 为阈值,这些益母草品系可分为两个类型,第一类型包括品系 1、2、5;第二类型包括品系 3、4、6、7、8、9,这个分类可以看出,浙江的 3 个品系在亲缘关系上相对较近。

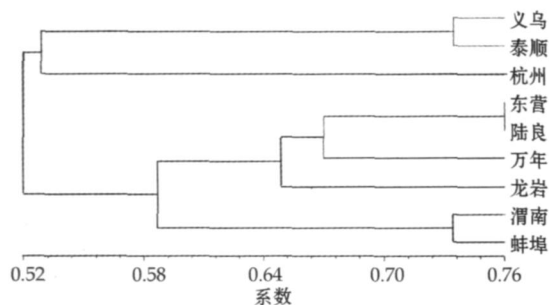


图 2 基于 AFLP 标记的 9 份益母草种质的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of nine *L. japonicus* germplasm based on AFLP marker

#### 4 讨论

4.1 对地上部分生物学特性、产量及含量相关参数的测定表明,云南品系抗冻性很差,其次是山东东营品系。因为各地气候差异较大,对浙江的气候适应性较差; AFLP 结果中也可看出山东与云南品系的相似系数为 0.76,十分接近。这与 NTSYS-PC 软件分析得到的遗传系统进化树聚类结果基本一致,即山东东营与云南陆良地方品系亲缘关系较近。

9 个地方品系益母草盐酸水苏碱的平均质量分数为 1.261%,其标准差为 0.421,最小值是福建龙岩品系 0.627%,按单个样本均数与总体样本均数统计划分,浙江义乌、浙江泰顺、浙江杭州和安徽蚌埠的盐酸水苏碱量较高,福建龙岩和江西万年量最低,这与 AFLP 聚类结果是相似的。

9 个地方品系的产量平均数为 1 123 kg/hm<sup>2</sup>,按单个样本均数与总体样本均数统计划分,浙江杭州、浙江泰顺、浙江义乌和福建龙岩产量在 1 200 kg/hm<sup>2</sup>以上,山东东营产量最低,这个结果和 AFLP 聚类结果也是基本吻合的。

以上结果与 NTSYS-PC 软件分析得到的遗传系统进化树聚类结果基本一致。根据生物学特性、产量、含量加以区分,性状和基因型存在相关性。

4.2 由于可供选择的特征性状有限,本研究利用 AFLP 方法分析 9 份益母草地方品系的遗传多样性,不仅说明该方法对益母草种质的遗传多样性的检测效应很高,而且揭示了益母草种质资源及其丰富的遗传多样性,其多态性位点占总扩增位点的比

例高达 87.96%,即使同一产地的益母草也表现出丰富的遗传多样性,说明益母草的人工选择程度很低。

4.3 AFLP 是一种广泛用于研究遗传多样性分析、作物品种鉴定、基因定位等方面的分子标记方法<sup>[5-9]</sup>。目前,尚未见到 AFLP 用于益母草种质资源遗传多样性研究的报道。本研究利用 AFLP 分子标记技术对益母草种质资源进行遗传多样性分析,从分子水平揭示这些益母草种质的遗传基础,为益母草种质资源的收集保存、分类鉴定、合理开发利用与品种选育等提供科学的理论依据,对有效利用益母草种质资源、促进益母草 GAP 基地的建设具有重要意义。

综上所述,本研究主要从广泛收集益母草种质资源着手,利用 AFLP 标记研究植物种质资源遗传多样性,探明种质资源的遗传背景和亲缘关系,从而为益母草种质资源的分析、评价与筛选提供分子水平上的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 肖培根. 新编中药志 [M]. 第三卷. 北京:化学工业出版社, 2002.
- [2] 晁志, 王厄舟, 周秀佳. 益母草药材中生物碱含量与产地生态环境的关系 [J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(6): 504.
- [3] 可燕, 车生泉. 不同产地益母草总生物碱含量的比较 [J]. 中草药, 1999, 30(4): 270.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. (第二版). 北京:科学出版社, 2005.
- [5] Voss P, Hogers R, Bleeter M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407-4414.
- [6] Pejic I. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPLs, SSRs, and AFLPs [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1248-1255.
- [7] Bohn M. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSR and their use for predicting progeny variance [J]. *Crop Sci*, 1999, 39: 228-237.
- [8] Segovia-Lerma A, Cantrell R, Conway J, et al. AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germ plasm using bulk DNA templates [J]. *Genome*, 2003, 46: 51-58.
- [9] 温春秀, 吴志明, 田伟, 等. 丹参种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 122-125.