

· 药材与资源 ·

石斛属几种植物遗传关系的 SRAP 和 RAPD 比较分析

樊洪泓, 李廷春, 邱 婧, 林 毅*, 蔡永萍

(安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:目的 利用 SRAP 和 RAPD 两种分子标记技术对 9 份石斛种质进行遗传多样性研究。方法 用 40 对 SRAP 引物组合和 36 个 RAPD 引物分别对供试石斛的基因组 DNA 进行扩增。结果 SRAP 引物组合共扩增条带 1 977 条, 多态性比率为 90.2%, 遗传相似系数 GS 值变化范围为 0.330 2~0.789 2。RAPD 引物共扩增出 281 条带, 多态性比率为 87.1%, GS 值变化范围为 0.494 2~0.773 1。利用两种标记得到的聚类结果存在一定的差异, SRAP 聚类结果与传统的基于形态特征建立的分类结果比较一致, 较好地体现了供试品种的亲缘关系、地域特性。在 9 个石斛供试种间, SRAP 的标记指数 MI 值 (16.46) 是 RAPD 标记 MI 值 (3.67) 的 4.5 倍, 表明 SRAP 具有更大的标记效率。结论 两种标记皆可有效应用于该属植物种质资源的遗传多样性分析。而 SRAP 标记在石斛的遗传多样性与亲缘关系的研究中, 则表现出了极大的优越性。

关键词: 石斛属; 遗传多样性; SRAP; RAPD

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0627-06

Comparison of SRAP and RAPD markers for genetic analysis of plants in *Dendrobium Sw.*

FAN Hong-hong, LI Ting-chun, QIU Jing, LIN Yi, CAI Yong-ping

(School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

Abstract : Objective This study was carried out in order to analyze genetic diversity in plants of *Dendrobium Sw.* and compare the marker index (MI) between SRAP and RAPD markers. **Methods** Using 40 SRAP primer combinations and 36 RAPD primers, the genetic diversity of the materials in *Dendrobium Sw.* was amplified. **Results** A total of 1 977 loci were generated by 40 SRAP primer combinations, of which 90.2% was polymorphic and the genetic similarity (GS) ranged from 0.330 2 to 0.789 2. As for RAPD, 281 bands were obtained, in which 87.1% was polymorphic, and the GS was from 0.494 2 to 0.773 1. There were some differences existing in the two cluster results revealed by SRAP and RAPD markers, they were as follows: compared to that of RAPD, the result of SRAP could more comfortably reflect the kinship and geographical origin, simultaneously conform to the traditional classification. For the experiment materials, SRAP (16.46) got an MI value 4.5 folds higher than that of RAPD (3.67), which meant SRAP markers were more effective in detecting genomic polymorphisms in the plants of *Dendrobium Sw.* **Conclusion** These results show that SRAP and RAPD could be applied to detecting genetic diversity analysis of plants in *Dendrobium Sw.* SRAP Also shows great superiority and advantage in this study.

Key words: *Dendrobium Sw.*; genetic diversity; SRAP; RAPD

石斛属 (*Dendrobium Sw.*) 为兰科第二大属, 多年生草本植物。全球计有 1 500 种。除个别种外, 皆属附生兰类。我国现共有 76 种^[1]。我国石斛的种类仅占全世界的 5% 左右, 但在历史上, 其药用开发和利用走在世界前列, 是重要的常用中药材。《中国药典》现将其功能与主治述载为: 益胃生津, 滋阴清热。用于阴伤津亏, 口干烦渴, 食少干呕,

病后虚热, 目暗不明^[2]。但由于石斛生境独特, 繁殖困难, 加之过度采收, 石斛一直是价格昂贵的紧缺药材。目前我国药材市场上流通的商品石斛原植物来源有 40 多个种, 其中多数为兰科石斛属植物, 少数来自兰科金石斛属、石仙桃属、石豆兰属、贝母兰属及蜂腰兰属的植物, 造成商品石斛品种混乱复杂, 严重影响了药品安全性、有效性。石斛类药材形态组

收稿日期: 2009-07-10

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点科研项目 (2006 KJ054A); 校稳定人才基金项目 (yj2008-27)

作者简介: 樊洪泓 (1980—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物资源学与分子生物学。

Tel: (0551) 5786216 E-mail: fhh717@yahoo.com.cn

*通讯作者 林 毅 Tel: (0551) 5786406 E-mail: yjscol@ahau.edu.cn

织学研究已有报道^[3],但由于石斛类药材的形态学上的差异较小,而化学成分差异大,用显微鉴定、理化性质等鉴定困难较大^[4]。近年来,随着分子生物学技术的发展,DNA 分子标记技术逐渐应用到药用石斛的鉴定,建立药用石斛的分子系统树、分析其亲缘关系,可丰富对石斛属植物的认识,确立属下分类系统,为更好地开发利用石斛资源奠定基础^[5]。

Li 和 Quiros^[6] 发展了一种新型的分子标记——相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP),该标记通过独特的引物设计对 ORFs (open readings frames) 进行扩增。上游引物长 17 bp,5 端的前 10 bp 是一段填充序列,紧接着是 CCGG,组成核心序列及 3 端 3 个选择碱基,对外显子进行特异性扩增。下游引物长 18 bp,5 端的前 11 bp 是一段填充序列,紧接着是 AATT,组成核心序列及 3 端 3 个选择碱基,对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因不同个体、物种的内含子、启动子及间隔区长度不同而产生多态性。目前,该标记技术已经在多种植物中得到应用,但应用于石斛属鲜见报道。近年来,通过分子技术进行中药资源的分类和鉴定选用最多的是 RAPD 标记^[7]。由于不同分子标记的特点不同,选择合适的分子标记对能否客观反映研究对象的状况具有重要影响^[8]。

本研究采用 SRAP 和 RAPD 两种分子标记技术,以药用石斛主要产区的代表性石斛为材料,建立分子系统树、分析其亲缘关系,探讨两种不同分子标记技术在石斛属植物研究的可应用性,并结合种间关系分析比较两者的标记效率和多样性检测能力,探讨 SRAP 标记在石斛种质资源筛选中的应用前景。

1 材料与方法

1.1 植物材料:植物材料见表 1,均保存在安徽农业大学生命科学学院实验室。

1.2 主要试剂与仪器:

1.2.1 试剂:CTAB、Tris、β-巯基乙醇、EDTA、尿素等均购自美国 AMRESCO 公司;RNA 酶、dNTPs、扩增引物、Taq 酶、引物均来自上海生工生物工程技术有限公司,其中 SRAP 引物见表 2, RAPD 引物为上海生工 S 系列引物。

1.2.2 仪器:美国 Millipore Milli-Q 超纯水系统,德国 Sigma3K-30 冷冻高速离心机,德国 Whatman Biometra 公司 T1 Thermocycler 扩增仪。

1.3 PCR 扩增

表 1 供试的石斛材料

Table 1 Materials of *Dendrobium Sw.* used in test

编号	植物名称	产地
1	霍山石斛 <i>D. huoshanense</i> C. Z. Tang et S.J. Cheng	安徽霍山
2	铜皮石斛 <i>D. moniliforme</i> (L.) Sw.	安徽霍山
3	杂交石斛 <i>D. hybride</i>	安徽霍山
4	罗河石斛 <i>D. lohohense</i> Tang et Wang	广东清远
5	铁皮石斛 <i>D. candidum</i> Wall. ex Lindl.	安徽霍山
6	重唇石斛 <i>D. hercoglossum</i> Reichb. f.	江西南丰
7	铁皮石斛	云南思茅
8	大苞鞘石斛 <i>D. wardianum</i> Warner	云南丽江
9	铁皮石斛	浙江雁荡山

杂交石斛为父本霍山石斛 × 母本铜皮石斛的 F₁ 代,本实验室培育

Hybride F₁ of male plant *D. huoshanense* and female plant *D. moniliforme* was cultivated by our laboratory

表 2 试验所用 SRAP 引物的序列

Table 2 Sequences of SRAP primers used in test

引物名称	序列 (5'→3')	引物名称	序列 (5'→3')
m1	TGA GTCCAACCGGATA	em3	GACTGCGTACGAA TTGAC
m2	TGA GTCCAACCGGAGC	em4	GACTGCGTACGAA TTGTA
m3	TGA GTCCAACCGGAAT	em5	GACTGCGTACGAA TTAAC
m4	TGA GTCCAACCGGACC	em6	GACTGCGTACGAA TTGCA
m5	TGA GTCCAACCGGAAG	em7	GACTGCGTACGAA TTCAA
m6	TGA GTCCAACCGGTAA	em8	GACTGCGTACGAA TTCTG
m7	TGA GTCCAACCGGTCC	em9	GACTGCGTACGAA TTCTGA
m8	TGA GTCCAACCGGTGC	em10	GACTGCGTACGAA TTCAG
em1	GACTGCGTACGAATTAAT	em11	GACTGCGTACGAA TTCCA
em2	GACTGCGTACGAATTTGC		

m1~m5, em1~em6 参照 Li G 和 Quiros C F^[6] 报道的序列合成; m6~m8, em7~em11 参照林忠旭等^[9]报道的序列合成

Primers m1 - m5, em1 - em6 are synthesized according to report of Li G and Quiros C F^[6]; Primers m6 - m8, em7 - em11 are synthesized according to report of Lin Z X^[9]

1.3.1 DNA 提取: DNA 提取方法参照 CTAB 法^[10]。

1.3.2 SRAP 扩增和检测: PCR 反应体系为 25 μL,其中包括:模板 DNA 量 30 ng、Mg²⁺ 浓度 2.5 mmol/L、0.08 μmol/L 的上下游引物、200 μmol/L 的 dNTPs 以及 Taq 酶 1 U。

按照 Li 和 Quiros 报道^[6]的扩增程序进行扩增:94 预变性 5 min,94 变性 1 min,35 复性 1 min,72 延伸 1 min,5 个循环,94 变性 1 min,50 复性 1 min,72 延伸 1 min,35 个循环,最后 72 延伸 7 min,4 保存。

扩增产物与 6 × Loading Buffer (40% 蔗糖, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF) 混匀后,取 10 μL 用于 6% 聚丙烯酰胺凝胶 (7 mol/L 尿素) 电泳分析,电泳缓冲液为 1 × TBE。电泳时,用 2000 V 的电压 70 W 的功率预电泳 30 min,上样后用同样的功率电泳约 2 h,至二甲苯青 FF 为胶板

2/3 处。电泳后银染,银染方法参照 Sanguinetti (1994) 法^[11]。

1.3.3 RAPD 扩增和检测:PCR 反应体系为 25 μ L,其中包括模板 DNA 量 30 ng、 Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L、随机引物 0.2 μ mol/L、200 μ mol/L 的 dNTPs 以及 *Taq* 酶 1 U。

扩增程序为:94 预变性 5 min,94 变性 30 s,37 复性 1 min,72 延伸 1 min 30 s,40 个循环,最后 72 延伸 7 min,4 保存。取 5 μ L 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭,EB 0.5 μ g/mL)中,电泳分离,电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE,用 Tanon Gs-2008 凝胶分析系统照相记录结果。

1.4 数据处理与分析:试验中以 250 bp DNA Ladder Marker 作相对分子质量标记,在相同迁移位置,每个样品的扩增带按有或无记录,有带赋值为 1,无带赋值为 0,得到原始数据矩阵。用 N Tsys-pc2.02 软件计算各种间的 Jaccard's 遗传相似系数,按非加权配对算术平均法(UPGMA)建立各种间亲缘关系的聚类图。

以分子标记指数(marker index, MI)^[12,13] 比较不同标记的标记效率。MI 值由位点平均信息量(average band informativeness, Ibav)和有效多元比率(effective multiplex ratio, EMR)的乘积求得,其中 EMR 按 Archak^[13] 等解释为多态位点的数量。Ibav 的计算公式为: $Ibav = 1/n \sum [1 - (2|0.5 - P_i|)]$ 。其中, P_i 代表样品第 i 个扩增位点所占比例, n 代表扩增位点总数。用 Mantel 检验^[14] 进行相关性检测,用以比较两种标记方法所得出结果的一致程度。

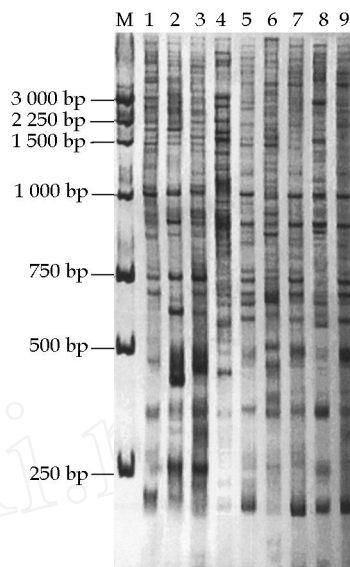
2 结果与分析

2.1 SRAP 和 RAPD 分析揭示的多态性

2.1.1 SRAP 分析:试验中,从 88 个 SRAP 引物组合中,筛选出 40 个重复性好、扩增条带清晰且多态性丰富的引物组合,进行 SRAP 扩增及数据分析。40 个引物组合共产生 1 977 条清晰条带,平均每个引物产生 49 条。其中,多态性条带 1 782 条,多态性比率为 90.2%。每个引物组合的多态性条带数在 33~55 条不等,平均每个引物组合产生 44.55 条多态性条带,多态性比率最高的为 100%,最低为 80.8%。代表性带谱见图 1。

2.1.2 RAPD 分析:利用 103 条 RAPD 引物对 9 种石斛 DNA 进行随机扩增,从中选出重现性好、多态性较高的引物 36 条,用于正式扩增。共得到 281 条带,平均每个引物扩增 7.8 条,其中多态性带有

246 条,多态性比率为 87.1%。每个引物的多态性条带数在 4~10 条不等,平均每个引物产生 6.8 条多态性条带,多态性比率最高的为 100%,最低为 57.1%。扩增出的 DNA 典型图谱见图 2。

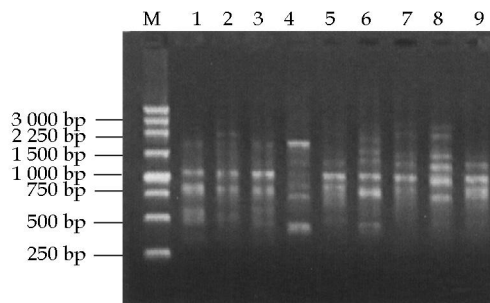


1~9 序号代表的物种顺序同表 1

Number of 1—9 refers to species listed in Table 1

图 1 SRAP 引物组合 m3-em7 的扩增图谱

Fig. 1 Amplification results of SRAP primer pair m3-em7



1~9 序号代表的物种顺序同表 1

Number of 1—9 refers to species listed in Table 1

图 2 RAPD 引物 S180 扩增结果

Fig. 2 Amplification results of RAPD primer S180

2.2 供试材料的遗传相似性和聚类分析

2.2.1 遗传相似性分析:分别以 9 份石斛供试材料的分子数据为原始矩阵,获得 2 组 36 个两两不同种质间的遗传相似系数(GS)。RAPD 分析的 GS 值在 0.494 2~0.773 1,平均 GS 为 0.602 7,标准差为 0.063 1,变异系数为 10.47%;而 SRAP 分析的 GS 值在 0.330 2~0.789 2,平均 GS 值为 0.498 1,标准差为 0.123 0,变异系数达到 24.69%(表 3)。从以上结果可知,基于 SRAP 的 GS 相对变异程度明显高于 RAPD,且 SRAP 标记的遗传相似系数值的范围比 RAPD 标记的稍大,平均 GS 值小于

表 3 石斛 RAPD、SRAP 标记遗传相似性的比较

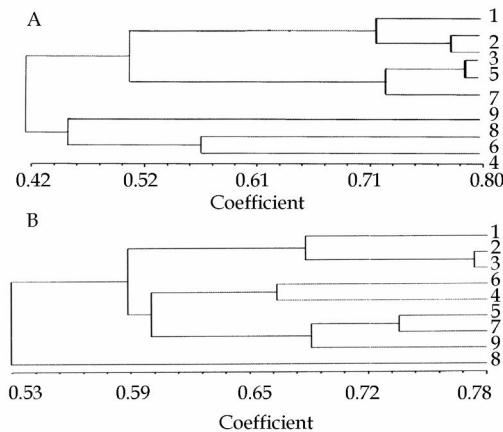
Table 3 Comparison of similarity correlation on RAPD and SRAP markers

标记	总数	范围	总平均值	标准差	变异系数/ %
RAPD	36	0.494 2~0.773 1	0.602 7	0.063 1	10.74
SRAP	36	0.330 2~0.789 2	0.498 1	0.123 0	24.69

RAPD。相对而言,SRAP 比 RAPD 可检测到更高的遗传变异。

2.2.2 聚类分析:基于遗传相似系数矩阵,用 NT-sys-pc2.02 软件对供试材料进行聚类分析,分别获得了基于 RAPD、SRAP 的亲缘关系树状图(图 3)。

基于 SRAP 标记的聚类,在遗传相似系数 0.42 的水平上,供试的 9 种石斛材料分为 和 两个大类。 类分为两个小类,霍山石斛、铜皮石斛以及杂交石斛被聚为一类,其中杂交石斛与铜皮石斛的遗传相似系数为 0.774 5,亲缘关系最近;另一类包括铁皮石斛的 3 个不同居群,相互间的遗传相似系数均在 0.70 以上,亲缘关系较近。 类也分为两个小类,一类由重唇石斛和罗河石斛聚类而成,其遗传相似系数为 0.563 6;另一类则由大苞鞘石斛单独构成。



1~9 序号代表的物种顺序同表 1

Number of 1—9 refers to speices listed in Table 1

图 3 供试石斛材料的 SRAP (A) 和 RAPD (B) UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA Dendrogram and genetic lineages based on SRAP (A) and RAPD (B) data of materials in Dendrobium Sw.

基于 RAPD 标记的聚类,在遗传相似系数 0.53 的水平上,供试的 9 种石斛材料也被分为 和 两个大类。 类仅由大苞鞘石斛单独构成。 类则分为两个小类,其中一类与 SRAP 聚类结果一致,即霍山石斛、铜皮石斛以及杂交石斛被聚为一类,且杂交石斛与铜皮石斛的亲缘关系更近;另一类

则由重唇石斛和罗河石斛以及 3 个居群的铁皮石斛聚类而成。

2.3 SRAP 和 RAPD 标记的标记效率分析:MI 是衡量不同类型标记扩增效率和扩增产物信息量的综合指标^[14,15]。在 9 个石斛供试种间 SRAP 标记的 MI 值(16.46)是 RAPD 标记 MI 值(3.67)的 4.5 倍。其中,Ibav 分别为 0.37 和 0.54,相差不大;EMR 分别为 44.49 和 6.79,前者是后者的 6.6 倍。EMR 差异是导致 SRAP 标记 MI 值高于 RAPD 标记的主要原因(表 4)。

表 4 9 种石斛 RAPD 和 SRAP 标记的标记效率分析

Table 4 Analysis of labeling efficiency between RAPD and SRAP markers for nine species in Dendrobium Sw.

项 目	MI	
	RAPD	SRAP
引物数	36	40
多态性带的数量	246	1 782
非多态性带的数量	35	195
总位点数	281	1 977
平均位点数	7.81	49.43
多态性比率	0.87	0.90
位点平均信息量	0.54	0.37
有效多元比率	6.79	44.49
标记指数	3.67	16.46

2.4 SRAP 与 RAPD 标记的相关分析:为检验 SRAP 和 RAPD 对石斛种质分析的相关程度,利用 Mantel 检测分析这两种标记的相关性。结果表明,对于 9 个供试石斛 SRAP 和 RAPD 的遗传相似性呈极显著正相关, $r=0.818 0$, $t=8.292 1$ 。

3 讨论

3.1 SRAP 和 RAPD 分析石斛遗传多样性的比较:本研究表明,SRAP 和 RAPD 都可作为石斛种间及种内遗传多样性的分析手段。相对来说,SRAP 具有更高的多态性水平,能反映更多的遗传信息。在 9 个供试石斛间,SRAP 标记具有比 RAPD 标记更高的 MI 值,说明前者比后者具有更高的标记效率。对 MI 值组成参数的比较发现,SRAP 标记具有更多的多态性位点,即具有高的 EMR 值,这是 SRAP 标记的 MI 值高于 RAPD 标记的主要原因。表明,对于石斛属植物,SRAP 具有更大的标记效率,也具有较高的多样性检测能力。

3.2 SRAP 和 RAPD 聚类结果的差异分析:本研究收集了药用石斛主要产区的代表性石斛,利用 SRAP 和 RAPD 两种标记都获得了与经典分类学较为一致的结果。吉占和^[16]在 1980 年首先对我国石斛属 57 种植物进行了形态学研究,并将它们划

分为 9 个组,分别为剑叶组、圆柱叶组、禾叶组、心叶组、基肿石斛组、草叶组、黑毛组、顶叶组和大花石斛组;还对药材市场的药材性状、主要原植物进行了研究和划分。本研究采集的石斛均隶属于大花石斛组,利用 SRAP 和 RAPD 两种标记在重唇石斛和罗河石斛的分类上取得了一致的结果,而吉占和也在研究中把二者均划分在黄草石斛中。马国祥等^[17]研究了 22 种常见石斛茎横切面组织构造,并进行了系统聚类分析。该研究结果将大苞鞘石斛分在了茎扁组,而铜皮石斛、铁皮石斛、重唇石斛则被分在了茎圆组。该结果与本研究两种分子标记的聚类结果一致。

本研究中,两种标记间呈极显著相关,两种标记还得到了一些相同的结果:1) 安徽省霍山地工的 3 种石斛:霍山石斛、铜皮石斛及铁皮石斛,比较其相互间的遗传相似系数发现,霍山石斛在分类地位上更接近于铜皮石斛,而与铁皮石斛的亲缘关系相对较远。2) 从聚类图上可以看出,本实验室选育的杂交石斛与其父本铜皮石斛的亲缘关系更近,与蔡永萍等^[18]对杂交石斛的生理生化研究的结果一致。3) 在 3 个不同居群的铁皮石斛的亲缘关系上,两种标记也得到了较为一致的结果。两种标记的聚类结果表明:3 个居群的铁皮石斛中,浙江居群与霍山居群的亲缘关系最近,通过分析发现,3 个居群的铁皮石斛间的遗传关系的亲疏与丁鸽等^[19]研究的结果一致,铁皮石斛居群地理分布的远近与居群间的遗传关系的亲疏呈良好的相关性。

但两种分子标记的聚类结果也有差异,差异主要表现在霍山石斛与铁皮石斛的聚类关系上。RAPD 标记聚类结果是将三个居群的铁皮石斛先与重唇石斛和罗河石斛聚类,再与霍山石斛聚类。而 SRAP 标记的聚类结果表明,铁皮石斛与霍山石斛具有较近的亲缘关系,这与经典分类学研究的结果一致,吉占和^[16]曾提出霍山石斛在形态上与铁皮石斛极相似,只是在唇瓣形状上略异,可能是铁皮石斛的亚种。特别是霍山石斛与霍山居群的铁皮石斛的 GS 达到 0.561 3,霍山石斛与其他两个居群铁皮石斛的亲缘关系也表现出与地理分布的一致性。RAPD 的多态性是指同一引物在不同个体的基因组中有着不同的结合位点或者是在同一结合位点上扩增出大小不同的片段^[20]。而 SRAP 针对基因外显子中 GC 量丰富而启动子、内含子里 AT 量丰富的特点来设计引物进行 PCR 扩增,因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性^[6]。

本研究中,SRAP 和 RAPD 标记得出了不同的遗传相似系数,由此产生的聚类结果也存在差异。RAPD 标记的聚类结果,一些地理来源及遗传背景不一致的石斛被聚在一起,可能由于自然杂交的结果,石斛属植物变异很大,中间类型很多,种的界限不清楚。而 SRAP 标记的聚类结果,大部分石斛因地理来源相同、遗传背景相似而聚在同一类群中,聚类结果与传统的基于形态特征建立的分类结果比较一致。聚类结果的不同,说明不同的标记方法在遗传多样性研究中存在差异。这是由于不同的分子标记反映的是基因组不同区域的遗传变异,而且不同标记所分析的位点数目也不一样,所能鉴定出的标记数量不同,导致供试材料间遗传距离发生变化,所以不同标记方法的聚类结果存在差异是可能的。

此外,RAPD 技术本身存在多态性少和重现性差的缺点,尽管本实验已采取了多种措施尽量加以避免,比如实验试剂及扩增条件相对恒定,挑选多态性高的引物等等,但这并不能从根本上解决该技术固有的不足,这也可能是造成两种标记聚类结果差异的原因之一。

参考文献:

- [1] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书 [M]. 北京:中国林业出版社,1998.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2000.
- [3] 郑 艳,徐珞珊,王峰涛. 11 种药用石斛根的形态组织学研究 [J]. 中草药,2005,36(11): 1700-1703.
- [4] 陈晓梅,郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发,2000,13(1): 70-75.
- [5] 冯尚国,胡 旭,赵江燕,等. DNA 分子标记在铁皮石斛研究中的应用 [J]. 中草药,2010,41(3): 499-附 2.
- [6] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple RCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [7] 王慧中,卢江杰,施农农,等. 利用 RAPD 分析 13 种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系 [J]. 中草药,2006,37(4): 588-592.
- [8] 李永祥,李斯深,李立会,等. 披碱草属 12 个物种遗传多样性 ISSR 和 SSR 比较分析 [J]. 中国农业科学,2005,38(8): 1522-1527.
- [9] 林志旭,张献龙,聂以春,等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建 [J]. 科学通报,2003,48(15): 1676-1679.
- [10] 邹喻苹,葛 颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京:科学出版社,2001.
- [11] Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 914-921.
- [12] Milbourne D, Rhonda M, Bradshaw J E, et al. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato [J]. *Mol Breed*, 1997, 3: 127-136.
- [13] Archak S, Gaikwad A B, Gautam D, et al. Comparison assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occi-*

- dentale L.) accessions of India [J]. *Genome*, 2003, 46: 362-369.
- [14] Mantel N. The detection of disease clustering and generalized regression approach [J]. *Cancer Res*, 1967, 27: 209-220.
- [15] Powell W, Morgante M. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. *Mol Breed*, 1996, 2: 225-238.
- [16] 吉占和. 中国石斛属的初步研究 [J]. *植物分类学报*, 1980, 18(4): 427-449.
- [17] 马国祥, 郭寅龙, 徐国钧, 等. 中药石斛显微构造的聚类分析 [J]. *中国药科大学学报*, 1996, 27(4): 208-210.
- [18] 蔡永萍, 汪曙, 林毅, 等. 霍山石斛 F1 代生长、有效成分和生理特性的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(14): 1064-1068.
- [19] 丁鸽, 丁小余, 沈洁, 等. 铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD 分析与鉴别 [J]. *药学学报*, 2005, 40(11): 1028-1032.
- [20] 房守敏, 余泉友, 李斌, 等. 家蚕 RAPD、AFLP 和 SSR 标记的研究及比较分析 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(12): 2926-2930.

不同来源丹参种质遗传多样性的 SRAP 标记分析

王维婷, 单成钢, 倪大鹏, 王志芬*

(山东省农业科学院 药用植物研究中心, 山东 济南 250100)

摘要:目的 解决丹参育种工作中的丹参种质资源的鉴别与分类。方法 利用 SRAP 分子标记技术对 48 个不同来源的丹参种质进行了遗传多态性的分析, 并对其进行了类群的划分。结果 利用筛选到的 15 对 SRAP 引物组合从材料中检测到了 120 个等位位点。利用不加权成对群算术平均法 (UPGMA) 对丹参种质进行聚类分析可以将其分为两大类群, 每一类群包含 3 个亚群。结论 不同丹参种群间遗传距离与空间距离之间的关系较为复杂, 不同地区间丹参种质的遗传分化不均衡。随着丹参种质驯化程度的增加, 种质间的遗传距离有所增加。

关键词: 丹参; SRAP; 遗传多样性分析

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0632-04

SRAP Analysis of genetic diversity about germplasm in *Salvia miltiorrhiza* from different sources

WANG Wei-ting, SHAN Cheng-gang, NI Da-peng, WANG Zhi-fen

(Research Center of Medicinal Plant, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract : Objective To solve the key problem on classification and identification of *Salvia miltiorrhiza*, which was urgently needed to be solved in breeding of *S. miltiorrhiza*. **Methods** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) was carried out to analyze the genetic variation of 48 germplasm in *S. miltiorrhiza* from different sources. **Results** The data showed that 120 alleles had been found using 15 pairs of primer which had been selected from 100 pairs. Unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA) cluster analysis was used to classify the germplasm of *S. miltiorrhiza*. Two groups could be divided and three subgroups were contained in every group. **Conclusion** A complex relationship exists between the genetic distance and space distance of different *S. miltiorrhiza*. The genetic diversity in different geographical populations of *S. miltiorrhiza* in China is rich. The results show that the genetic distance of different germplasm will increase with the stage of domestication.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); analysis of genetic diversity

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为常异花授粉植物, 其种内的遗传多样性极为丰富。不同产地丹参种质的产量和药用成分量差异很大, 严重影响丹参药材质量的稳定性, 给丹参的规范化生产带来多

重困难, 因此有必要对现有丹参种质资源进行分类鉴别和亲缘关系的研究。

近年来, 中草药指纹图谱研究领域受到普遍关注, 通过生化标记对丹参种质进行分类的研究报道

收稿日期: 2009-08-20

基金项目: 国家航天工程项目 (2006HT10-0165); 山东省良种工程项目 (鲁科农社字[2008]167号); 山东省农科院高技术自主创新基金项目 (2007YCX012); 山东省农科院博士基金项目 (2006YBS003)

作者简介: 王维婷 (1981—), 女, 山东莱州人, 山东农科院药用植物研究中心博士后, 主要从事丹参分子生物学研究。

E-mail: wangweiting0619@163.com

*通讯作者 王志芬 Tel: 0531-83179283 E-mail: wzfchm@163.com