

denta le 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

①收稿日期: 2009-08-20

基金项目: 国家航天工程项目 (2006HT 10-0165); 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

较多。徐德然等^[1]对不同产地丹参脂溶性成分指纹图谱进行比较,发现采用无性繁殖的相同产地的家种丹参指纹图谱具有很好的相似性,相应的品系药材可以归入同一类。而野生丹参则不可按其地理区域进行归类。但是由于丹参药材质量受环境影响较大^[2],利用生化标记的方法只能对成品药材的质量进行精确鉴定,不有精确的定位种质的来源和同批材料的种质的一致性,因此该类指纹图谱在丹参育种工作中的作用有限。

近些年,有关丹参基因工程方面的研究有报道^[3],关于丹参种质的分类鉴别、遗传多态性及有效成分的分子标记研究报道较少。郭宝林等^[4]利用 RAPD 分析了 9 个居群的 44 个丹参样本,认为丹参居群内遗传多样性十分丰富,地区间居群的遗传分化不均衡,但 RAPD 技术稳定性差,扩增产率低。温春秀等^[5]利用 AFLP 方法分析了 55 份丹参种质,发现不同产地的丹参遗传特性很不一致,这与郭宝林等的研究结果基本吻合,但四川中江丹参与山东丹参具有很大的相似性,此与郭宝林等的结果不一致。与 RAPD 技术相比,AFLP 在产生的总条带数、多态性条带、多态率、每一引物和每一份种质产生的多态性条带都明显高于 RAPD 分析方法,表现出高效、快速、准确和多态性丰富的优点。但 AFLP 操作步骤繁琐、技术难度高。汪红等^[6]研究丹参 ITS 片段的遗传多样性,找到了两段可以作为中药丹参分子鉴定的标记,但由于唇形科是一个高度进化的类群,ITS 序列分析仅反映了鼠尾草属植物遗传背景的一个方面,并且 ITS 成本较高,耗费较大。与其他几种分子标记技术相比,SRAP 标记技术具有简便、稳定、中等产率、便于克隆、测序目标片段的特点。李廷春等^[7]以丹参总 DNA 为模板,建立并优化了丹参 SRAP 反应体系,为丹参植物种质资源的鉴别及功能基因的研究奠定了基础。

本研究来源于 30 个不同产地的 600 份材料中挑选性状一致,长势良好的优系,利用扦插手段,获得了近百个丹参无性繁殖系作为丹参育种的种质资源,利用 SRAP 技术对其中 48 份栽培性状稳定,表现优良的材料进行遗传多态性分析,对解决当前丹参种质资源混杂和指导丹参品种选育具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料:本研究所采用的试验材料见表 1。

每种材料随机挑选 3 株,进行取样。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取:利用 CTAB 法对丹参

DNA 进行提取^[7]。

1.2.2 SRAP 扩增引物:引物序列见表 2。

表 1 试验材料

Table 1 Tested Materials

材料来源	材料来源	材料来源	材料来源	材料来源
Y 沂山大官乡	Y 山东平邑	Z 泰山白花	Y 山东九山	Z 四川中江小叶
Y 沂山辛庄	Z 山东平邑 1	BY 泰山大津口	Z 山东九山	Z 四川中江大叶
Y 沂山北门	Z 平邑魏刘	Y 蒙阴垛庄 1	Z 山东临朐	Z 山西运城
Y 沂山南坡	Z 平邑毛家庄	Y 蒙阴垛庄 2	Z 山东曲阜	Z 浙江磐安
BY 沂山北门	Z 山东平邑 2	BY 蒙阴垛庄 1	Z 安徽亳州	Z 河北安国
BY 沂山吕匣	Z 江苏东台 1	BY 蒙阴垛庄 2	Z 安徽亳州 2	Z 河北安国 2
BY 山东沂山	Z 江苏东台 2	Y 鲁山山顶	Z 河南南阳 1	Z 陕西商洛
Z 沂山沙沟镇	Y 泰山白花	Y 泰山南坡	Z 河南南阳 2	Z 陕西渭南
Z 沂山南坡	Y 泰山紫花	Y 山东崂山	Z 河南卢氏 1	
Y 平邑蒙山	Y 泰山天柱峰	BY 山东崂山	Z 河南卢氏 2	

Y:野生种质,为野生状态下收集的种质 BY:半野生种质,为野生状态下收集后栽培驯化不足 5 年的种质 Z:栽培种质,为栽培驯化 5 年以上的种质

Y-wild germplasm which had been collected from wild environment without domesticated BY-imperfectly domesticated germplasm which had been collected from wild environment with domesticated no more than 5 years Z-cultivation germplasm with cultivated more than five years

表 2 试验所用引物的序列

Table 2 Sequences of primers used in this study

引物编号	引物序列	引物编号	引物序列
me1	TG AGTCCA AA CCGGAT A	em1	G ACTGGT ACGAATT AAT
me3	TG AGTCCA AA CCGGAAT	em2	G ACTGGT ACGAATT TGC
me5	TG AGTCCA AA CCGGAA G	em3	G ACTGGT ACGAATT GAC
me6	TG AGTCCA AA CCGGTAG	em4	G ACTGGT ACGAATT TGA
me7	TG AGTCCA AA CCGGTTG	em5	G ACTGGT ACGAATT AAC
me8	TG AGTCCA AA CCGGTGT	em6	G ACTGGT ACGAATT GCA
me9	TG AGTCCA AA CCGGTCA	em7	G ACTGGT ACGAATT ATG
me11	TG AGTCCA AA CCGGGCC	em8	G ACTGGT ACGAATT AGC
me15	TG AGTCCA AA CCGGACG	em10	G ACTGGT ACGAATT TAG
me18	CTGCGAA CT CCGATG	em15	G ACTGGT ACGAATT CTG
me19	GGT GAACGCTCGG AAG	em18	AGGCGGTCTGCAATTGAC
me20	A GCG AGCAAG CCGGTGG	em19	T GTGTCTCGCAA ATTTAG

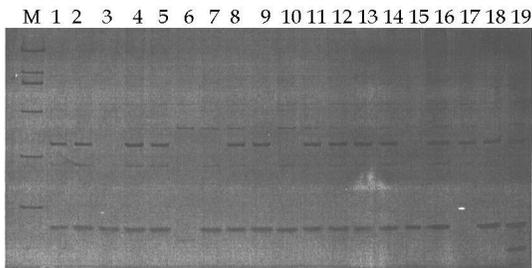
1.2.3 SRAP 反应程序:94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 5 次, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次。扩增产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳后,银染并照相。

1.2.4 数据处理:样品的电泳条带按有或无进行记录,有带赋值为 1(强带和弱带同记),无带记为 2。

2 结果与分析

2.1 引物筛选:本课题组配了 100 对引物组合,从中筛选得到 15 对多态性条带最清晰的引物组合。利用这 15 对 SRAP 引物组合从 48 份丹参种质中检测到了 120 个等位位点,每对引物可检测到的位点为 3~17 个,平均 8 个。在 120 条 DNA 扩增条

带中有 109 条带呈多态性, 占所观察到的总条带的 90.83%。从上述分析发现, 48 个不同来源的丹参具有丰富的遗传多态性, 图 1 为引物 me9~em8 的扩增结果。



M-marker 1-Z 河南南阳 1 2-Z 河南南阳 2 3-Y 泰山白花 4-Y 泰山紫花 5-Y 泰山天柱峰 6-Z 河南卢氏 1 7-Z 河南卢氏 2 8-Y 沂山大官乡 9-Y 沂山辛庄 10-BY 沂山北门 11-BY 沂山吕匣 12-BY 山东沂山 13-Y 沂山北门 14-Y 沂山南坡 15-Y 山东平邑 16-Z 山东平邑 1 17-Z 平邑魏刘 18-Z 平邑毛家庄 19-Z 山东平邑 2
M-marker 1-Z Henan Nanyang 1 2-Henna Nayang 2 3-Y Taishan Baihua 4-Y Taishan Zihua 5-Y Taishan Tianzhufeng 6-Z Henna Lushi 1 7-Z Henna Lushi 2 8-Y Yishan Daguangxiang 9-Y Yishan Xinzhuang 10-BY Yishan Beimen 11-BY Yishan Lixia 12-BY Shandong Yishan 13-Y Yishan Beimen 14-Y Yishan Nanpo 15-Y Shandong Pingyi 16-Z Shandong Pingyi 1 17-Z Pingyi Weiliu 18-Z Pingyi Maojiazhuang 19-Z Shandong Pingyi 2

图 1 引物 me9~em8 组合对不同丹参种质的扩增结果

Fig. 1 PCR Results from primer pair me9-em8 to germplasm of *S. miltiorrhiza* from different sources

2.2 不同来源丹参遗传聚类分析: 目前, 丹参的育种工作处于起步阶段, 不同来源丹参之间的亲缘关系尚不明确, 急需对其进行深入研究。利用 GD 值按照不加权成对群算术平均法 (UPGMA) 对 48 份丹参种质进行遗传相似性的聚类分析, 见图 2。

聚类结果表明, 48 份丹参种质按其遗传距离可以分为两大类群, 每一类群包含 3 个亚群, 类群划分结果见表 3。聚类结果明确了不同来源丹参之间的亲缘关系, 可为丹参品种改良及亲本选配提供依据。从聚类结果里看, 各地区丹参种质的遗传多样性不同, 其中来自江苏东台和河北安国的栽培品种按地区来源可被划分在同一亚群中, 说明这些地区栽培品种的遗传多样性相对简单, 来源于山东泰山的野生及半野生品种均可被划分在同一亚群中, 也说明泰山地区的野生丹参种质遗传背景较为单一。而来自四川中江的丹参种质被划分在同一类群中的两个亚群之中, 来自河南南阳的丹参种质被划分在不同

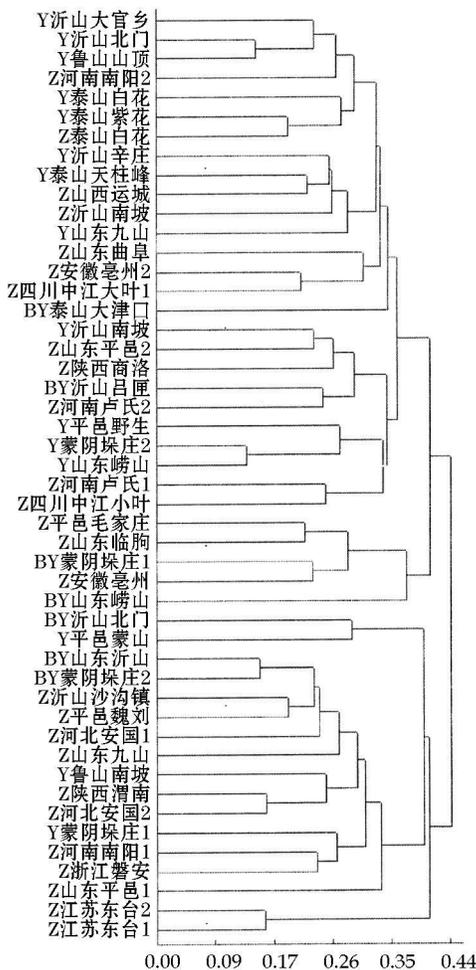


图 2 48 份不同来源丹参种质遗传聚类分析图
Fig. 2 Dendrogram obtained using 48 germplasm in *S. miltiorrhiza* varieties with SRAP marker

的两大类群中, 甚至来自山东沂山的野生、半野生及栽培品种则分布在两大类群的 4 个亚群当中, 说明这些地区的丹参种质遗传多样性丰富。此外, 丹参材料按其驯化阶段可以划分为野生、半野生(野生引种栽培 5 年以下)、栽培 3 种类型, 这 3 种驯化阶段的丹参材料在两大类群中均有分布。

2.3 不同驯化阶段丹参遗传多样性分析: 目前, 不同驯化阶段的材料其遗传基础差异程度是否不同尚未见报道。本研究采用的材料包括 15 个野生种质, 7 个半野生种质和 26 个栽培种质, 每个种质随机挑选 3 株取样, 对其种间遗传距离进行分析(表 4)。由表中可以看出, 随着丹参种质驯化程度的增加, 种质间的遗传距离逐渐增加, 但变化不大。

3 讨论与结论

SRAP 是于 2001 年建立的新型分子标记。目前, SRAP 技术已被成功应用于栽培黄连^[9]、红花^[10]等药用植物的遗传多样性和重要性状基因连

表 3 丹参种质遗传聚类结果

Table 3 Cluster result of *S. miltiorrhiza* germplasm

名称	类群 I	类群 II
亚群 1	Y 沂山大官乡、Y 沂山北门、Y 鲁山山顶、Z 河南南阳 2、Y 泰山白花、Y 泰山紫花、Z 泰山白花、Y 沂山辛庄、Y 泰山天柱峰、Z 山西运城、Z 沂山南坡、Y 山东九山、Z 山东曲阜、Z 安徽亳州 2、Z 四川中大叶、BY 泰山大渡口	BY 沂山北门、Y 平邑蒙山
亚群 2	Y 沂山南坡、Z 山东平邑 2、Z 陕西商洛、BY 沂山吕匣、Z 河南卢氏 2、Y 平邑野生、Y 蒙阴垛庄、Y 山东崂山、Z 河南卢氏 1、Z 四川中江小叶	BY 山东沂山、BY 蒙阴垛庄 2、Z 沂山沙沟镇、Z 平邑魏刘、Z 河北安国 1、Z 山东九山、Y 鲁山南坡、Z 陕西渭南、Z 河北安国 2、Y 蒙阴垛庄 1、Z 河南南阳 1、Z 浙江磐安、Z 山东平邑 1
亚群 3	Z 平邑毛家庄、Z 山东临朐、BY 蒙阴垛庄、Z 安徽亳州、BY 山东崂山	Z 江苏东台 1、Z 江苏东台 2

表 4 不同驯化阶段丹参种质间的平均遗传距离

Table 4 Average genetic distance between *S. miltiorrhiza* under different stages of domestication

驯化阶段	平均遗传距离	品种数量	等位位点	平均位点数
野生	0.453	15	248	3.875
半野生	0.455	7	106	1.656
栽培	0.494	26	549	8.578

锁标记的研究。李廷春等^[7]以丹参总 DNA 为模板,建立并优化了丹参 SRAP 反应体系,为丹参植物种质资源的鉴别及功能基因的研究奠定了基础。同时,李廷春等^[11]利用该技术对 6 个丹参材料的遗传多样性和亲缘关系进行分析,初步证明了 SRAP 分析方法具有较高的准确性和可靠性。但该研究所应用的丹参种质较少,不足以为丹参育种工作提供亲本组配的理论依据^[11]。

根据建立的 UPGMA 聚类图,本研究所采用的 48 份丹参种质可以分为两大类群,其中每个类群可以划分为 3 个亚群。李廷春^[11]、徐红^[12]等人的研究结果认为,丹参种群间的遗传关系较为复杂,遗传距离与空间距离并不存在可见的相关性。本研究结果与其不完全一致,认为不同产地的丹参种质其遗传多样性不同,遗传距离与空间距离存在着一定程度上相关。江苏东台、河北安国及山东泰山的丹参种质,其遗传背景较为单一,而山东沂山、山东平邑和

山东蒙阴的丹参种质其遗传多样性极为丰富,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,这可能与近年来丹参各主要产区的引种和人工选育有关。同时,本研究结果与郭宝林等人^[4]的研究结果在一定程度上相似,均能反映出不同地区间丹参种质的遗传分化不均衡。

从本研究结果中可以看出,随着丹参驯化程度的增加其种间遗传距离也有所增加。由于丹参为常异花授粉植物,人工选择及杂交育种均有可能造成丹参种质间的遗传距离增大,从而导致某些隐性性状不表达,据此推测不规范的丹参品种选育方式可能会造成栽培丹参药用品质的下降。

上述研究结果为丹参种质的分类、鉴定和品种选育提供了重要的研究依据。通过对不同驯化阶段丹参种内遗传距离的比较,推测不规范的丹参品种选育方法可能造成栽培丹参药用品质的下降,因此在人工选择或培育丹参品种时需要改良现有的选择方法及杂交技术。

参考文献:

- [1] 徐德然,王康才,丁静,等.不同产地丹参脂溶性成分指纹图谱的比较研究[J].中国野生植物资源,2006,12(6):40
- [2] 胡璟华,马凤彩,王瑾.不同生长条件下丹参的质量比较研究[J].解放军药学学报,2003,19(3):219-220
- [3] 田鹏,李刚强,王楠,等.药用丹参的基因工程改良研究现状与展望[J].中草药,2009,40(8):1334-1338
- [4] 郭宝林,林生,冯毓秀,等.丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究[J].中草药,2002,33(12):1113
- [5] 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,2007,22:122
- [6] 汪红,王强.丹参及鼠尾草属植物的 rDNA ITS 序列分析[J].中草药,2005,36(9):1381-1382
- [7] 李廷春,高正良,汤志顺.丹参 SRAP 反应体系的建立与优化[J].生物学杂志,2008,25(1):40-44
- [8] Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP [J]. Nucl Acids Res, 1997, 25: 1085-1087
- [9] 陈大霞,李隆云,瞿显友,等.栽培黄连群体遗传关系的 SRAP 分析[J].中草药,2008,39(10):1552-1556
- [10] 郭庆华,郭美丽.与红花苞叶刺棘状紧密连锁的 SRAP 分子标记研究[J].药学报,2007,42(7):794-797
- [11] 李廷春,樊红泓,高正良,等.丹参遗传多样性的 SRAP 标记分析[J].核农学报,2008,22(5):576-580
- [12] 徐红,王燕燕,魏丹红,等.不同产地丹参药材的 ISSR 分析与鉴别[J].中药新药与临床药理,2007,18(6):454-457