

• 药材与资源 •

浙江主产区栽培玄参群体遗传结构分析

董建勇, 吴梦华, 张红叶, 徐金中, 蔡进章*

(温州医学院药学院, 浙江 温州 325035)

摘要:目的 观察浙江主产区栽培玄参的群体遗传结构。方法 应用荧光 AFLP 标记对具有代表性的 6 个玄参居群群体遗传结构进行分析。结果 采用 7 对 AFLP 引物组合扩增共得到 12 552 条扩增带, 其中多态性谱带 8 808 条, 多态性比率 70.17%; 各居群间的 PPB 变化范围在 41.67%~55.56%, 平均为 47.30%; I 在 0.190 8~0.238 3, 平均为 0.221 8; N_e 在 1.201 4~1.280 6, 平均为 1.236 9; G_{st} 为 0.127 1, N_m 为 3.432 4; UPGMA 聚类显示 6 个居群可以聚为 2 类, 其中天台、缙云和景宁种群遗传距离较近聚为一个亚类, 东阳、磐安和仙居聚为一个亚类。结论 浙江主产区栽培玄参种质资源在物种水平上具有较高的遗传多样性, 居群间有一定的遗传分化, 但大部分存在于居群内部, 居群间有较高的基因交流, 居群间遗传距离与地理环境无相关性。

关键词: 玄参; 群体遗传结构; 遗传多样性; AFLP

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1160-04

Genetic structure analysis of cultivated *Scrophularia ningpoensis* in Zhejiang Province

DONG Jian-yong, WU Meng-hua, ZHANG Hong-ye, XU Jin-zhong, CAI Jin-zhang

(Department of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract: **Objective** To observe the genetic structure of cultivated *Scrophularia ningpoensis* in Zhejiang Province. **Methods** The genetic structures of six typical *S. ningpoensis* populations were analyzed by fluorescence AFLP marker. **Results** Bands (12 552) were generated by seven pairs of AFLP primer combinations, of which 8 808 were polymorphic, and the polymorphic rate was 70.17%. The variety ranges of PPB among different populations were 41.67%—55.56%, and 47.30% in average. I was between 0.190 8—0.238 3, and 0.221 8 in average. N_e was between 1.201 4—1.280 6, and 1.236 9 in average. G_{st} was 0.127 1, N_m was 3.432 4. UPGMA Cluster analysis showed that the six populations can be divided into two clusters, as that of Tiantai, Jinyun, and Jingning were one sub-cluster, and Dongyang, Pan'an, and Xianju were another one sub-cluster. **Conclusion** There is a relative high genetic diversity level in cultured *S. ningpoensis* of Zhejiang Province. Genetic differentiation exists among populations, but it exists in population mostly. There is a relative high genetic intercommunion among populations. The genetic distance is not related to the geographic environment.

Key words: *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.; genetic structures; genetic diversities; AFLP

玄参为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 产于我国长江流域及陕西、福建等地, 目前药用玄参均为人工栽培。2008 年浙江磐安、东阳、景宁、天台、仙居、缙云等县种植面积达 960 hm², 总产量约 3 686 × 10⁶ kg。2008 年以来磐安县中药研究所从传统地方种中培育出“浙玄 1 号”并推广^[1]。但玄参种植大多为农家种植, 各地栽培的玄参种质资源关系不清楚, 这对进一步防止

现有品种退化和优良品种选育极其不利。本实验采用扩增片段长度多态性(AFLP)技术, 从分子水平对浙江主要种植区农家种植玄参种质资源遗传多样性和遗传结构进行分析, 对道地药材种质资源保护、保证药材质量相对稳定和优良品种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料: 标本收集于东阳、景宁、磐安、天台、仙居、缙云 6 个县的种植区, 均为人工栽培。根据均

* 收稿日期: 2009-10-26

基金项目: 温州市科技局资助项目(Y2004A121)

作者简介: 董建勇(1963—), 男, 山东成武县人, 博士, 教授, 研究方向为中药资源与有效成分。

Tel: (0577) 86689369 E-mail: jianyd163@163.com

匀分析,随机取样原则,采样尽量覆盖该地区栽培范围。每一个县选择 6 个种植乡镇。每份样品收集根 30~50 g,共 6 组 36 个样本。经温州医学院药学院蔡进章副主任药师鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.。样品放在冰盒中带回实验室,存放在-78℃冰柜中备用。

1.2 仪器、试剂: DGL-16 台式离心机、DG-II 暗箱式紫外透箱、DG-3D 大型水平电泳槽、DG-III 双稳数显电泳仪(北京鼎国),9600PCR 扩增仪、ABI Prism 377 DNA Sequencer(美国 Perkin Elmer 公司),Sigma 3K18 型低温冷冻离心机(美国 Sigma 公

司)。采用北京鼎国生物技术有限公司 FISH-AFLP 试剂盒。

1.3 总 DNA 提取:称取样品 50 mg,采用 CTAB 法,按鼎国生物技术有限公司植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,凝胶电泳检测 DNA 纯度、完整性及产量。置-20℃贮存备用。

1.4 AFLP 分析:包括模板 DNA 限制性酶切、连接、AFLP 预扩增,选择性扩增,扩增产物的凝胶电泳分析均按试剂盒说明。基因 PCR 扩增所用接头及引物序列见表 1。

1.5 数据分析:胶图使用 GeneScan3.1 软件进行

表 1 接头和引物序列

Table 1 Adapter and primers sequences

接头和引物	碱基序列	使用
<i>EcoR</i> I 接头	接头 1 5' > CTC GTA GAC TGC GTA CC < 3' 接头 2 5' > AAT TGG TAC GCA GTC TAC < 3'	
<i>Mse</i> I 接头	接头 1 5' > GAC GAT GAG TCC TGA G < 3' 接头 2 5' > TAC TCA GGA CTC AT < 3'	
<i>EcoR</i> I 引物 预扩增引物	5' > GAC TGC GTA CCA ATT CA < 3'	预扩增
<i>EcoR</i> I-1	5' > GAC TGC GTA CCA ATT AACC < 3'	选择性扩增
<i>EcoR</i> I-2	5' > GAC TGC GTA CCA ATT AAGG < 3'	
<i>EcoR</i> I-3	5' > GAC TGC GTA CCA ATT ACAA < 3'	
<i>EcoR</i> I-4	5' > GAC TGC GTA CCA ATT ACTT < 3'	
<i>EcoR</i> I-5	5' > GAC TGC GTA CCA ATT ACCC < 3'	
<i>EcoR</i> I-6	5' > GAC TGC GTA CCA ATT ACGG < 3'	
<i>EcoR</i> I-7	5' > GAC TGC GTA CCA ATT AGCC < 3'	
<i>EcoR</i> I-8	5' > GAC TGC GTA CCA ATT AGGG < 3'	
<i>Mse</i> I 引物 选择性扩增	5' > GAT GAG TCC TGA GTA A C < 3'	预扩增
FAM 标记 <i>Mse</i> I-1	5' > GAT GAG TCC TGA GTA CAAA < 3'	选择性扩增
FAM 标记 <i>Mse</i> I-2	5' > GAT GAG TCC TGA GTA CAA C < 3'	
FAM 标记 <i>Mse</i> I-3	5' > GAT GAG TCC TGA GTA CAA G < 3'	
FAM 标记 <i>Mse</i> I-4	5' > GAT GAG TCC TGA GTA CAA T < 3'	
FAM 标记 <i>Mse</i> I-5	5' > GAT GAG TCC TGA GTA CAA A < 3'	
FAM 标记 <i>Mse</i> I-6	5' > GAT GAG TCC TGA GTA CAA C < 3'	
FAM 标记 <i>Mse</i> I-7	5' > GAT GAG TCC TGA GTA CAA G < 3'	
FAM 标记 <i>Mse</i> I-8	5' > GAT GAG TCC TGA GTA CAA T < 3'	

数据提取及 Excel 转换,生成由“1”和“0”组成的原始矩阵。用 POPGENE1.32 软件计算等位基因平均数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、 N_e 基因多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)、多态位点百分率(PPB)。并计算居群总遗传多样性(H_t)、居群内遗传多样性(H_s)、遗传分化系数(G_{st})、基因流(N_m)以及 N_e 遗传距离和遗传一致度,采用 MEGA 3.0 软件对遗传距离进行非加权算术平均聚类分析(UPGMA)。

2 结果

2.1 不同引物组合对玄参各居群 AFLP 扩增片段的多态性:从 64 对 E+3/M+3 的选择性扩增引物中筛选出 7 对扩增产物多态性好、谱带清晰的引物组合,对样品进行 AFLP 选择性扩增,结果见表 2。7 对 AFLP 引物组合扩增共得到 12 552 条谱带,其

中多态性谱带 8 808 条,平均每对引物扩增得到 1 258 条多态性谱带,多态性比率 70.17%。多态性百分率最高的组合为 E-ACG/M-CAA(73.25%),最低的为 E-AGC/M-CAA(66.36%)。7 对引物对东阳居群 6 个样本选择性 PCR 产物电泳图见图 1。

2.2 玄参 6 个居群间的遗传多样性:用 POP-

表 2 7 对 AFLP 引物选择性扩增结果

Table 2 Selectively amplified of seven pairs of AFLP primer

引物组合	多态碎片数	碎片总数	多态性比率/%
E-AAC/M-CAA	1 338	1 878	71.25
E-AG/M-CAA	1 218	1 794	67.89
E-ACA/M-CAA	1 236	1 740	71.03
E-ACT/M-CAA	1 206	1 746	69.07
E-ACG/M-CAA	1 380	1 884	73.25
E-AGC/M-CAA	1 278	1 926	66.36
E-AGG/M-CAA	1 152	1 584	72.73
合计	8 808	12 552	70.17

GENE1.32 软件对实验数据进行各项参数分析, 结果见表 3。

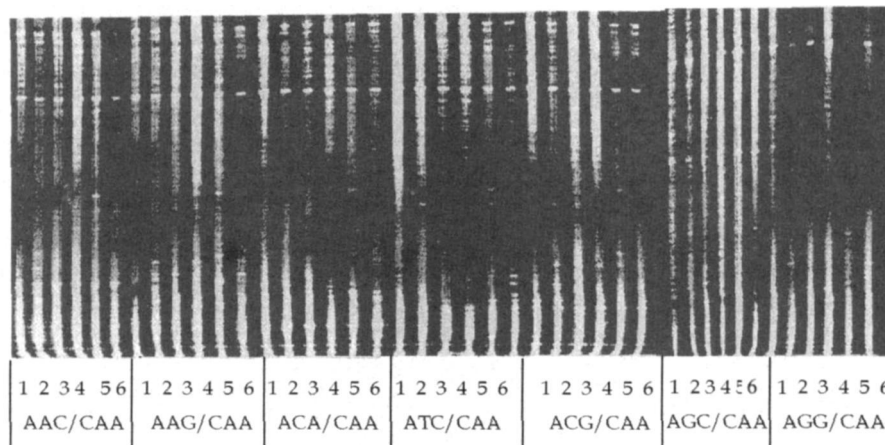


图 1 7对引物对东阳居群选择性 PCR 产物电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of selecting PCR products generated by seven pairs of primer in Donyang population

表 3 玄参 6 个居群的遗传多样性水平

Table 3 Diversity of different populations of *S. ningpoensis* in six populations

居群	样本数	N_a	N_e	H	I	PPB/ %
东阳	6	1.472 2±0.500 4	1.246 9±0.333 0	0.150 0±0.183 2	0.229 9±0.266 6	47.22
景宁	6	1.416 7±0.494 2	1.201 4±0.316 1	0.123 0±0.172 9	0.190 8±0.252 1	41.67
仙居	6	1.555 6±0.498 1	1.280 6±0.348 9	0.169 0±0.187 2	0.260 0±0.267 9	55.56
磐安	6	1.509 3±0.501 1	1.255 7±0.340 4	0.154 7±0.184 0	0.238 3±0.265 2	50.93
天台	6	1.435 2±0.496 9	1.213 6±0.324 3	0.129 7±0.176 5	0.200 6±0.256 3	43.52
缙云	6	1.449 1±0.498 6	1.222 9±0.320 0	0.136 8±0.177 1	0.211 4±0.258 8	44.91
均值	—	1.473 0±0.498 2	1.236 9±0.330 5	0.143 9±0.180 1	0.221 8±0.261 1	47.30

可知, 各居群间的 PPB 变化范围在 41.67%~55.56%, 平均为 47.30%。Shannon I 在 0.190 8~0.238 3, 平均为 0.221 8。 N_a 在 1.416 7~1.555 6, 平均为 1.473 0。 N_e 在 1.201 4~1.280 6, 平均为 1.236 9。说明玄参栽培种在物种水平上具有较高的遗传多样性。

2.3 遗传分化和基因流: H 是衡量种群遗传分化的主要指标, 表示总遗传变异中居群间所占的比例。表 3 显示玄参 6 个居群 H 在 0.123 0~0.154 7, 平均为 0.143 9。各居群 H 由高到低的顺序为仙居、磐安、东阳、缙云、天台、景宁。

H_t 可分为 H_s 和居群间基因多样性 (D_{st}), 即 $H_t = H_s + D_{st}$ 。而居群的遗传分化系数 $G_{st} = D_{st} / H_t = (H_t - H_s) / H_t$, 基因流强度 $N_m = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}^{[2]}$ 。参数分析表明玄参 6 个居群 H_t 为 0.164 8±0.028 7, H_s 为 0.143 8±0.022 0, G_{st} 为 0.127 1, N_m 为 3.432 4。

2.4 居群间遗传距离及 UPGMA 聚类: 用 POP-GENE1.32 软件对数据进行分析, 得出玄参各居群间的遗传一致度和遗传距离, 见表 4。玄参 6 个居群中遗传距离最近的为天台和缙云居群(0.007 4), 而遗传距离最远的是东阳和景宁居群(0.031 5)。

表 4 各居群间的遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) within six populations

居群	东阳	景宁	仙居	磐安	天台	缙云
东阳		0.969 0	0.988 9	0.990 7	0.971 2	0.978 4
景宁	0.031 5		0.983 7	0.974 1	0.983 6	0.989 3
仙居	0.011 2	0.016 4		0.989 3	0.987 7	0.989 4
磐安	0.009 3	0.026 2	0.010 7		0.977 5	0.986 5
天台	0.029 2	0.016 5	0.012 4	0.022 7		0.992 6
缙云	0.021 9	0.010 3	0.010 7	0.013 6	0.007 4	

根据玄参居群的遗传一致度进行 UPGMA 聚类分析, 其结果如图 2 所示。由图 2 可知 6 个居群可以聚为 2 类, 其中天台、缙云和景宁种群遗传距离较近聚为一个亚类, 东阳、磐安和仙居聚为一个亚类。

3 结论与讨论

3.1 栽培玄参的遗传结构特征: 群体遗传结构是指遗传变异在物种或群体中的一种非随机分布, 即遗传变异在群体内、群体间的分布样式以及在时间上的变化^[3]。Nei 基因分化系数 (G_{st}) 是衡量种群遗传分化最常用的指标, 表示在总的遗传变异中种群间变异所占的比例, 用来表征亚群体间基因分化相对量的大小, 其值越高表明亚群体间遗传分化程度越高。玄参各居群间的 Nei's 遗传分化系数为

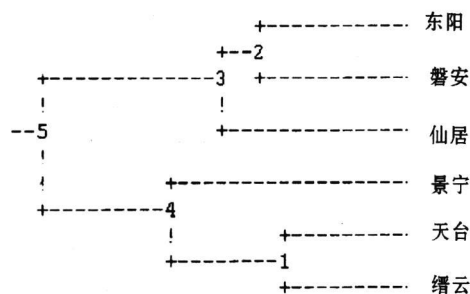


图2 6个居群的聚类图

Fig 2 Dendrogram of six populations (by UPGMA)

0.127 1,说明居群间有一定的遗传分化,占总遗传变异的12.71%,但大部分存在于居群内部,占88%以上。从6个居群的Nei's基因多样性指数(H)也可发现其在0.123 0~0.154 7,平均为0.143 9。说明在总遗传变异中,居群间所占比例平均为14.39%,居群内约占86%。

一些个体从一个群体迁移到另一个群体就会把某基因带到新的群体从而产生基因流动。基因流是影响群体内部和群体之间遗传变异程度的重要因素^[4]。基因流增加了群体内部的遗传变化,这种变化是由于一些个体从其他群体带来该群体没有或少有的基因,基因流会影响群体间的相似性或特征^[5]。基因流会使出现在一个群体中的基因带给另一个群体,基因流越大,群体间的相似性越大^[6]。玄参6个居群间 N_m 为4.654 7,基因交流比较广泛。这可能就是栽培玄参居群内变异大于居群间变异的原因。

3.2 浙江种植区玄参的遗传多样性:遗传多样性,即为物种居群内和居群间可遗传的变异,它是物种自身生存和未来进化的资源,不仅能给种群带来适合度方面的优势,同时有利于人工育种^[7]。玄参各居群间的PPB在41.67%~55.56%,平均为47.30%。 I 在0.190 8~0.238 3,平均为0.221 8。 N_a 在1.416 7~1.555 6,平均为1.473 0。 N_e 在1.201 4~1.280 6,平均为1.236 9。说明玄参栽培种在物种水平上具有较高的遗传多样性,这对于通过农家种植中筛选优良品种提供了依据。

3.3 玄参6个居群间遗传距离与地理环境的关系:遗传距离是指不同的种群或种之间的基因差异的程度,通常由基因频率的函数所确定。本研究结果提示浙江省主要种植区玄参6个居群中遗传距离最近的为天台和缙云居群(0.007 4),而遗传距离最远的

是东阳和景宁居群(0.031 5)。6个居群可以聚为2类,其中天台、缙云和景宁种群遗传距离较近聚为一个亚类,东阳、磐安和仙居聚为一亚类。这与几个地区的地理距离并无相关,说明人工栽培玄参的遗传距离不是自然发展的结果,而是由于栽培中引种所形成。

3.4 玄参AFLP分子标记的方法学建立:AFLP是广泛用于研究遗传多样性、动植物品种鉴定及基因定位等方面的分子标记方法。以往研究采用CTAB法提取玄参植株叶片DNA比SDS法具有更好的纯度、完整性^[8],并建立了玄参RSSR-PCR反应体系^[9]。但AFLP技术比RSSR-PCR技术具有更高的灵敏度。从7对AFLP引物组合扩增共得到12 552条谱带,其中多态性谱带8 808条,多态性比率70.17%,说明AFLP能检测到很丰富的多态性。这对AFLP方法在玄参遗传多样性分析、基因图谱建立等研究在方法学上提供了依据。

综上所述,浙江主产区栽培玄参具有丰富的遗传多样性,居群间有一定的遗传分化,但大部分存在于居群内部,居群间有较高的基因流动。居群间遗传距离与地理环境无相关,人工栽培玄参的遗传距离不是自然发展的结果,而是由于栽培中引种所形成。

参考文献:

- [1] 陈斌龙. 玄参浙玄1号高产栽培技术[J]. 中国农技推广, 2008, 24(11): 19
- [2] 闫志峰, 张本刚, 张照, 等. 珍稀濒危药用植物黄檗野生种群遗传多样性的AFLP分析[J]. 生物多样性, 2006, 14(6): 488-491
- [3] Kuang H H, Herman J E. Evolution and genetic population structure of prickly lettuce (*Lactuca serriola*) and its RGC2 resistance gene cluster [J]. *Genetics*, 2008, 178(3): 1547-1558
- [4] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. *Science*, 1987, 236: 787-792
- [5] 曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流[J]. 遗传, 2004, 26(3): 377-382
- [6] Marcus R K. Gene flow persists millions of years after speciation in *Heliconius* butterflies [J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 98
- [7] 张金渝, 张建华, 杨晓洪, 等. 西双版纳地区糯玉米品种四路糯、小黄糯的遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(2): 234-239
- [8] 肖冰梅, 周小红, 罗京. 玄参总DNA提取方法的比较研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(2): 31-33
- [9] 赵志新, 梁宗锁, 姜再民, 等. 玄参RSSR-PCR反应体系的建立和优化[J]. 药物生物技术, 2007, 14(5): 318-323