

灰毡毛忍冬自然群体遗传多样性的 SRAP 研究

陈大霞^{1,2}, 李隆云^{1,2*}, 吴叶宽^{1,2}, 张 雪^{1,2}, 蔡应繁³

1. 重庆市中药研究院中药种植研究所, 重庆 400065

2. 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065

3. 重庆邮电大学, 重庆 400065

摘 要: 目的 研究灰毡毛忍冬自然群体的遗传多样性。方法 以 15 个不同来源地的野生灰毡毛忍冬及 2 个花蕾型栽培品种为试材, 通过 SRAP 分析, 利用 Popgene 及 Treeconw 软件分析处理数据, UPGMA 方法聚类, 构建亲缘关系系统图。结果 通过筛选得到 24 对 SRAP 引物, 扩增出 239 条条带, 其中 210 条为多态性条带, 多态性条带比率为 87.8%; Nei's 多样性指数 H_e 为 0.239 9, Shannon 多样性指数 I 为 0.372 4; 从 DNA 分子水平揭示出灰毡毛忍冬存在着丰富的遗传多样性。遗传相似系数在 0.442 3~0.940 2。用 UPGMA 法得到所有样本的聚类图, 可分为两大类群。结论 灰毡毛忍冬有着丰富的遗传多样性, SRAP 技术可有效运用于灰毡毛忍冬的遗传分析。

关键词: 灰毡毛忍冬; SRAP; 遗传多样性; 种质资源; 良种繁育

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0143-05

Genetic diversity of *Lonicera macranthoides* geographical populations revealed by SRAP markers

CHEN Da-xia^{1,2}, LI Long-yun^{1,2}, WU Ye-kuan^{1,2}, ZHANG Xue^{1,2}, CAI Ying-fan³

1. Institute of Material Medical Planting, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

2. Chongqing Research Center of Techniques and Engineering for Chinese Materia Medica Fine Variety Breeding and Evaluation, Chongqing 400065, China

3. Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China

Abstract: **Objective** To research genetic diversity of different *Lonicera macranthoides* geographical populations. **Methods** Seventeen materials were estimated by the approach of sequence-related amplified polymorphism (SRAP). The data of amplified bands were analyzed by Popgene 1.31 and Treeconw software. The system diagram of genetic relationship was built by UPGMA. **Results** The 24 pairs of SRAP primers combination employed produced a total of 239 discernable and reproducible amplified fragments. Among them there were 210 polymorphic bands. The percentage of polymorphic bands within different populations was 87.8%; Genetic diversity analysis showed that Nei's gene diversity (H_e) was 0.239 9 and Shannon's genetic diversity index (I) was 0.372 4. Basis on the DNA molecular level, the results indicated that there was abundant genetic diversity among the tested materials. Genetic similarity coefficient ranges changed from 0.442 3 to 0.940 2. The dendrogram including all samples was obtained by UPGMA. In the dendrogram, there were two cluster groups. **Conclusion** The genetic diversity of *L. macranthoides* geographical population in China is plentiful. SRAP markers can be effectively applied to genetic analysis in *L. macranthoides* populations.

Key words: *Lonicera macranthoides* Hand. - Mazz.; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); genetic diversity; germplasm resources; breeding

灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.为忍冬科忍冬属植物, 是一种集保健、药用、观赏及生态功能于一体的经济作物, 常生于山谷溪边、山坡或山顶混交林、灌木丛中, 分布于我国大

陆的福建、广西、湖北、贵州、广东、江西、安徽、四川、湖南、浙江等地, 生长于海拔 500~1 800 m 的地区。《中国药典》2005 年版首次收载灰毡毛忍冬, 将其作为山银花的主要植物来源。由于其含有

收稿日期: 2010-06-23

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAI06A12); 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2009BB5395)

作者简介: 陈大霞(1968—), 女, 重庆人, 副研究员, 硕士, 主要从事药用植物分子生物学研究。Tel: (023)89029061 E-mail: 17837@163.com

* 通讯作者 李隆云 Tel: (023)89029118 E-mail: lilongyun8@163.com

较高的抗菌成分绿原酸，是西南、中南地区商品金银花的主要品种之一。目前国内学者对忍冬的分子生物学研究较多^[1-6]，但仅对灰毡毛忍冬栽培品种进行了 ISSR 分析^[7-8]，未有对灰毡毛忍冬野生种质资源遗传多样性的研究。因此，本研究拟采用 SRAP 标记研究灰毡毛忍冬野生资源的遗传多样性和对其栽培种质进行遗传评价，旨在揭示我国灰毡毛忍冬种质资源遗传关系，为灰毡毛忍冬种质资源科学保育及良种繁育策略的制定提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为 2 个花蕾型灰毡毛忍冬栽培品种（样品 14 和 15）和 15 份采自四川、重庆、贵州、湖南的野生灰毡毛忍冬（表 1），资源保存于重庆秀山灰毡毛忍冬种质资源圃，由重庆市中药研究院生药栽培室李隆云研究员鉴定。根据均匀分布、随机取样原则进行采样，尽量覆盖该居群的分布范围。取样方式参照文献方法^[9-11]进行，即每个自然群体

表 1 药材来源			
Table 1 Sources of materials used in study			
编号	来 源	编号	来 源
1	重庆秀山隘口镇	10	贵州湄潭回龙村
2	重庆秀山孝溪乡	11	贵州绥阳郑场镇
3	重庆秀山溶溪镇	12	四川宜宾兴文
4	重庆秀山钟灵乡	13	四川古蔺箭竹乡
5	重庆綦江永新镇	14	“渝蕾 1 号”
6	重庆江津东胜乡	15	“金萃蕾”
7	重庆南川三泉镇	16	重庆秀山
8	湖南溆浦龙庄湾乡	17	重庆秀山大叶片银花
9	湖南隆回小沙江镇		

取 10 株，选取成熟植株上的幼嫩叶片，低温带回实验室，材料等量混合为 1 个样本研究，以此代表该居群，并置于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

SRAP-PCR 扩增在 Eppendorf Mastercycler (R) gradient 梯度 PCR 仪（Eppendorf）上进行。SRAP 引物由北京赛百盛基因有限公司合成，所用引物序列见表 2。

表 2 SRAP 引物			
Table 2 SRAP primers used in this study			
引物	序 列	引物	序 列
上游引物 5'→3'		EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA
ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC
ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT	EM6	GACTGCGTACGAATTGCA
ME5	TGAGTCCAAACCGGAAG	EM7	GACTGCGTACGAATTCAA
ME6	TGAGTCCAAACCGGTAA	EM8	GA CTGCGTACGAATTCT G
下游引物 5'→3'		EM9	GACTGCGTACGAATTCGA
EM1	GACTGCGTACGAATTAAT	EM10	GACTGCGTACGAATTCAG
EM2	GACTGCGTACGAATTTGC	EM11	GACTGCGTACGAATTCCA

1.2 DNA 提取与纯度检测

采用 CTAB 法提取基因组总 DNA。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性后，用 Smart SpeeTM3000 型分光光度计（BIO-RAD 公司）测定 DNA 的浓度和质量分数，并根据检测结果将符合试验要求的样品稀释为 40 ng/L，用作 SRAP-PCR 扩增的模板。

1.3 SRAP-PCR 扩增及检测

SRAP-PCR 扩增程序参照 Li 等^[12]方法，PCR 反应总体积为 25 μL，每个反应体系含 1×PCR buffer，MgCl₂ 2.0 mmol/L，dNTPs 250 μmol/L，引物各 0.2 μmol/L，Taq DNA 聚合酶 1 U，模板 40 ng，用 ddH₂O 补足。SRAP 扩增程序采用复性变温法，

共 40 个循环，即 94 ℃ 预变性 5 min；前 5 个循环：94 ℃ 变性 30 s，35 ℃ 退火 1 min，72 ℃ 延伸 1.5 min；后 35 个循环：94 ℃ 变性 30 s，50 ℃ 退火 1 min，72 ℃ 延伸 1.5 min；循环结束后 72 ℃ 延伸 7 min；4 ℃ 保存。

1.4 扩增产物的检测

取扩增产物 5 μL 在 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离，以 0.5×TBE 为电泳缓冲液，稳压 150 V，电泳至溴酚蓝距凝胶边缘 1 cm 处结束。银染检测电泳结果。

1.5 数据统计与分析

将电泳图谱上的每个多态性谱带看作 1 个遗传位点，仅统计清晰可读的 SRAP 扩增条带。电泳结

果采取 0/1 赋值记带,以相同迁移位置上有带记为“1”,无带记为“0”,转换成 0、1 矩阵输入计算机,建立数据库。遗传相似系数(GS) = $2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 计算,式中 N_{ij} 表示在 i 和 j 材料中共有的带, N_i 、 N_j 分别是材料 i 、 j 的带。利用 TREECONW (Version 1.3) 分析软件计算材料间 GS,按 UPGMA 方法构建聚类图。利用 POPGENE1.32 软件计算群体的 Nei's 多样性指数、Shannon 遗传多样性指数。

2 结果与分析

2.1 SRAP 多态性分析

从 50 个 SRAP 引物组合中筛选出 24 个扩增谱带清晰、种质间带型差异明显、易于识别的引物组合用于 SRAP-PCR 扩增。扩增统计结果见表 3。24 对 SRAP 引物组合共扩增出 239 条扩增带,有 210 条带呈现多态性,占所观察到的总扩增带数的 87.8%;不同引物组合的效果差异较大,扩增条带数在 6~15 条,平均 9.96 条;多态性条带 5~13 条,平均每个引物产生 8.75 条多态性条带。以上统计结果表明:SRAP 标记在灰毡毛忍冬遗传资源中具有丰富的多态性,变异较大,适合对其遗传多样性水

平进行检测。

2.2 遗传多样性分析

利用得到的 239 个 SRAP 标记,用 Treeconw 软件计算 17 份灰毡毛忍冬种质的遗传相似系数,获得遗传相似系数矩阵(表 4)。种质间的成对 GS 在 0.442 3~0.940 2,平均为 0.673 0,表明灰毡毛忍冬种质具有较丰富的遗传多样性。9 与 15 号样品之间的 GS 最大,表明其亲缘关系最近,3 与 10 号样品之间的 GS 最小,表明其亲缘关系最远。来源于贵州的两份材料种质除与样品 2 之间的 GS 较大外,与其余 14 份种质之间的 GS 均较小,如样品 10 与其余 14 份种质的 GS 在 0.442 3~0.560 8,平均为 0.520 6,而样品 11 与其余 14 份种质的 GS 则稍大,在 0.503 3~0.600 0,平均为 0.576 6。两个栽培品种中“渝蕾 1 号”与野生种质的平均 GS 为 0.727 9,“金萃蕾”则为 0.684 7,说明“渝蕾 1 号”与野生种质间的亲缘关系更近。

POPGENE1.32 软件分析得出:Nei's 基因多样性指数 H_e 为 0.239 9,Shannon 多样性指数 I 为 0.372 4,同样表明各居群间具有较为丰富的遗传多样性。

表 3 SRAP 引物组合的总带数及多态性带数

Table 3 Number of total and polymorphic bands of SRAP primer combination

引物组合	总带数	多态性带数	引物组合	总带数	多态性带数	引物组合	总带数	多态性带数
ME1-EM1	11	10	ME2-EM6	12	10	ME5-EM10	6	5
ME1-EM2	7	6	ME2-EM7	15	12	ME6-EM2	9	8
ME1-EM4	12	10	ME2-EM9	12	11	ME6-EM8	12	11
ME1-EM5	10	8	ME2-EM10	11	10	ME6-EM9	11	9
ME1-EM7	8	7	ME3-EM2	9	8	ME6-EM10	11	9
ME1-EM9	12	11	ME3-EM3	8	7	ME6-EM11	8	7
ME1-EM10	13	13	ME3-EM4	8	7	总合	239	210
ME1-EM11	9	9	ME5-EM7	7	6	平均	9.96	8.75
ME2-EM5	8	7	ME5-EM9	10	9			

2.3 灰毡毛忍冬的 SRAP 聚类分析

据 SRAP 数据计算的 GS,按 UPGMA 法进行聚类分析,得到不同种质资源之间的系统进化关系图(图 1)。15 个灰毡毛忍冬的自然居群和 2 个栽培品种聚为两个大类群:第一类群共 14 份种质,包括来源于湖南、四川、重庆的 12 份野生种质及 2 个栽培品种,可细分为 2 个亚类,四川的 2 份种质分散在两个亚类中,来源于重庆秀山的野生种质分别聚在两个亚类中,归类有较明显的地理相关性。第二类群共有 3 份种质,贵州的 2 份种质均聚在这一类群中,同样具明显的地理相关性。2 个花蕾型品种

并未按花蕾不开裂这一性状聚为一小类,但由湖南选育的“金萃蕾”与湖南的 2 份种质聚在一起,由重庆选育的“渝蕾 1 号”与重庆秀山的种质聚在一起,具明显的地域分布规律,同时也说明栽培品种从当地的野生资源中选育出来,并未发生显著的遗传变异。总的看来,除四川的 2 份种质聚类无规律外,其余地理分布相近的种质聚为一类,显示出与地理分布较明显的一致性。

3 讨论

3.1 灰毡毛忍冬的遗传多样性

遗传多样性是物种长期进化的结果,通常认为

表 4 各材料间的遗传相似系数

Table 4 Genetic similarity coefficient among different materials

Table 4 Genetic similarity coefficient among different materials													01	01	01	01	01
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	1.000 0																
2	0.550 6	1.000 0															
3	0.660 3	0.523 1	1.000 0														
4	0.790 2	0.577 3	0.693 3	1.000 0													
5	0.707 6	0.550 0	0.658 0	0.745 6	1.000 0												
6	0.610 0	0.502 7	0.730 6	0.620 4	0.666 7	1.000 0											
7	0.741 8	0.545 5	0.689 7	0.777 3	0.825 5	0.681 6	1.000 0										
8	0.785 1	0.594 1	0.675 2	0.796 5	0.734 2	0.648 9	0.756 3	1.000 0									
9	0.779 3	0.584 2	0.652 4	0.782 6	0.745 8	0.633 9	0.776 4	0.878 7	1.000 0								
10	0.465 6	0.711 9	0.442 3	0.517 1	0.521 3	0.482 4	0.509 4	0.560 8	0.525 8	1.000 0							
11	0.598 9	0.643 7	0.588 2	0.587 1	0.550 7	0.512 8	0.586 5	0.600 0	0.593 3	0.597 8	1.000 0						
12	0.713 0	0.534 7	0.723 4	0.741 4	0.756 3	0.708 0	0.786 6	0.755 2	0.741 7	0.520 9	0.616 1	1.000 0					
13	0.601 9	0.518 1	0.750 0	0.633 5	0.678 4	0.790 7	0.675 4	0.643 5	0.611 4	0.490 2	0.540 0	0.761 9	1.000 0				
14	0.803 8	0.572 9	0.672 5	0.805 3	0.750 0	0.636 4	0.746 8	0.851 1	0.940 2	0.526 3	0.595 1	0.754 2	0.640 0	1.000 0			
15	0.778 5	0.551 7	0.574 9	0.788 2	0.739 9	0.596 3	0.760 2	0.763 0	0.755 8	0.525 6	0.503 3	0.731 4	0.618 2	0.760 2	1.000 0		
16	0.847 1	0.566 0	0.637 8	0.819 7	0.744 7	0.696 1	0.770 8	0.791 4	0.766 0	0.517 7	0.550 9	0.721 7	0.637 8	0.786 9	0.839 2	1.000 0	
17	0.847 3	0.559 6	0.654 7	0.818 2	0.716 8	0.626 2	0.740 1	0.829 7	0.842 1	0.492 6	0.582 9	0.721 7	0.648 4	0.848 2	0.785 3	0.824 2	1.000 0

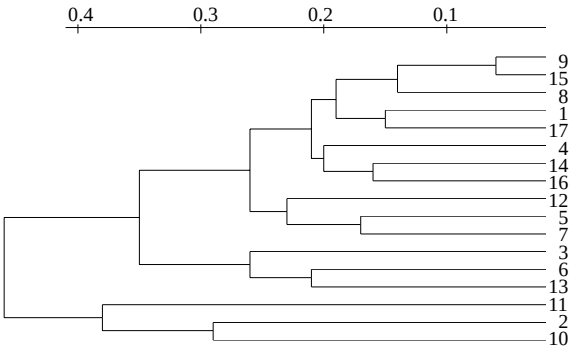


图 1 基于 SRAP 标记的灰毡毛忍冬种质的 UPGMA 聚类图
Fig. 1 UPGMA dendrogram of germplasmic resources of *L. macranthoides* based on SRAP markers

物种种质资源的 SRAP 条带表现出丰富的多态性, 存在的进化潜力和抵御外界不良环境的能力在很大程度上取决于遗传多样性。本实验对供试材料的遗传相似系数及聚类分析表明, 17 份供试灰毡毛忍冬有不同程度的差异, 并且 GS 的范围广(0.442 3~0.940 2), 说明不同种源的灰毡毛忍冬具有丰富的遗传多样性, 具有从现有遗传资源中筛选到优质高产品系的育种潜力。野生灰毡毛忍冬种质遗传多样性较高的主要原因可能与灰毡毛忍冬传粉特性和繁殖物特性有关。灰毡毛忍冬是多年生的异花虫媒传粉植物, 既可以利用蜂类在白天进行传粉, 又可以利用蛾类

昆虫在夜间进行授粉, 因此可将花粉散布得很远。此外, 灰毡毛忍冬同时具有有性和无性两种繁殖方式, 自然群体的繁殖方式主要为有性繁殖, 主要通过水流进行种子的传播。无性繁殖则主要采用扦插和嫁接, 这也是目前栽培品种的主要繁殖方式。

聚类分析结果表明, 来源于贵州、重庆秀山种质的归类以及“金萃蕾”与湖南野生种质、“渝蕾 1 号”与重庆秀山野生种质的归类均具有较明显的地理相关性, 这可能与生境有关, 地理距离近的种质生境相似, 地理距离远的种质生境差异相对较大。来源于四川的种质没有按照空间距离严格地的聚在一起, 而是混杂在其他种质中, 可能是由于其地理生态环境与其他种质差异不大造成的, 具体原因尚待进一步探索。

3.2 灰毡毛忍冬资源的保护策略

灰毡毛忍冬野生资源十分丰富, 自然分布的格局多呈散生状, 群体间没有形成阻止基因流的严重障碍, 因此, 群体间遗传分化程度低, 积累了较丰富的基因资源, 并形成较广的遗传基础, 其中蕴藏着不少优质高产品系, 但由于这部分资源较为分散, 因此利用率还很低。尽管野生灰毡毛忍冬种质资源在分子水平上确实存在较大的遗传差异, 但人工栽培已成为金银花药材的主要来源, 而用于生产的栽培品种长期采用无性繁殖方式, 导致所用的亲本材

料的遗传背景比较狭窄,在一定程度上造成了种质的不断融合。另一方面,尽管育种学家已选育出了不少花蕾型品种,但现行品种大多侧重于产量,这势必造成某些基因的定向选择,导致优良性状集中于少数材料上,而其他育种目标的多样化性状丢失。因此,在选育过程中要积极引入高质、抗病等外源基因,创造优质种质资源,拓宽种质的遗传基础。

近年来,随着应用范围的扩大和需求量的增加,金银花产业化基地规模不断扩大,不少人在利益驱使下,开始掠夺式地采割野生金银花成熟枝条用于扦插以快速扩充种植面积,不仅严重破坏了野生资源的分布格局,而且加剧了栽培品种的混杂度。因此,在灰毡毛忍冬遗传多样性保护上,一方面应保护与合理开发并重,在对野生灰毡毛忍冬资源进行全面调查的基础上,建立野生资源保护区;另一方面收集尽可能多的种质资源建立核心种质资源库,并运用现代高科技育种手段改善灰毡毛忍冬品种,以提高灰毡毛忍冬产量、质量及抗性。本研究利用分子标记技术对灰毡毛忍冬野生种质资源进行遗传多样性分析,不仅对其开发利用潜力进行了评价,为灰毡毛忍冬优良种质选育和遗传改良奠定了基础,同时也为野生资源的保护、修复、再生等提供理论依据。

参考文献

- [1] 于燕莉, 向凤宁, 夏光敏, 等. DNA 序列分析在金银花品种鉴定中的应用 [J]. 山东科学, 2000, 13(4): 39-40.
- [2] 于燕莉, 石俊英. RAPD 技术在金银花品种鉴定中的应用 [J]. 中药材, 2000, 23(11): 678-679.
- [3] 李 萍, 蔡朝晖, 邢俊波. 5S-rRNA 基因间区序列变异用于金银花药材道地性研究初探 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 834-837.
- [4] 王冲之, 李 娟, 李 萍. 金银花 nrDNA ITS 区聚合酶链反应条件的研究 [J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(4): 303-306.
- [5] 向增旭, 郭巧生. 不同金银花种源间遗传关系的 RAPD 分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(2): 57-59.
- [6] 杨 飞, 张 敏, 彭兴扬, 等. 金银花五个品系的 RAPD 分析及 DNA 指纹图谱的建立 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 235-238.
- [7] 王晓明, 谢碧霞, 李俊彬, 等. 金银花 ISSR 分子标记及遗传多样性分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(6): 14-18.
- [8] 王 珊, 周日宝, 潘清平, 等. 灰毡毛忍冬种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 药物生物技术, 2009, 16(2): 149-152.
- [9] 盛红梅, 安黎哲, 陈 拓, 等. 忍冬属植物的遗传多样性及其种间关系研究 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1405-1409.
- [10] 张春平, 何 平, 何俊星, 等. ISSR 分子标记对金荞麦 8 个野生居群的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1519-1522.
- [11] 倪开诚, 闵 芳, 郭卫东, 等. 采用 ISSR 分子标记进行草珊瑚 8 个种源的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1392-1396.
- [12] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brossica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2-3): 455-461.