

短葶山麦冬遗传多样性 SRAP 标记研究

张君毅*, 陈瑞凤, 许金榜

华侨大学 生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

摘要: 目的 对短葶山麦冬进行遗传多样性分析。方法 利用 SRAP 分子标记技术对 47 份短葶山麦冬材料进行遗传多样性分析。结果 15 对引物共扩增出 323 条多态性带, 平均多态位点百分率为 88.47%。平均引物多态信息量 (PIC) 为 0.90。Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.197 7, Shannon's 信息指数 (I) 为 0.319 0。遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.252 8。UPGMA 聚类表明遗传相似系数为 0.59~0.99。结论 短葶山麦冬遗传多样性水平较高, 遗传变异主要在居群内。

关键词: 相关序列扩增多态性 (SRAP); 短葶山麦冬; 遗传多样性; Shannon's 信息指数 (I); 遗传分化系数 (G_{st})

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0774-05

Genetic diversity of *Liriope muscari* using SRAP markers

ZHANG Jun-yi, CHEN Rui-feng, XU Jin-bang

Department of Bioengineering & Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

Abstract: Objective To study the genetic diversity of *Liriope muscari*. **Methods** The genetic diversity of 47 populations was analyzed by SRAP marker technique. **Results** Fifteen primers amplified 323 polymorphic bands, and the average percentage of polymorphic bands reached to 88.47%. The average of polymorphism information content (PIC) was 0.90. Nei's gene diversity index (H) was 0.197 7 and Shannon's information index (I) was 0.319 0. Gene differentiation index (G_{st}) was 0.252 8. Cluster analysis using UPGMA method showed that genetic similarity coefficient ranged in 0.59—0.99. **Conclusion** *L. muscari* shows higher genetic diversity and the majority of genetic variation occurs in populations.

Key words: sequence related amplified polymorphism (SRAP); *Liriope muscari* (Decne.) Bailey; genetic diversity; Shannon's information index (I); gene differentiation index (G_{st})

短葶山麦冬 *Liriope muscari* (Decne.) Bailey 为百合科山麦冬属植物, 以干燥块根入药, 具有养阴润肺、益胃生津、清心除烦的功效, 2005 年版《中国药典》增为“山麦冬”药材的基原植物^[1]。短葶山麦冬为福建道地药材, 经过长期的栽培利用, 表型性状已出现变异。尤海涛等^[2]通过调查分析其 9 个主要性状数据, 认为种内性状变异较大, 表型性状由基因控制受环境影响。为避免环境影响, 在分子水平研究短葶山麦冬遗传变异显得尤为重要。然而此方面研究较少, 现有报道多集中在种源鉴别方面, 如以 RAPD 标记鉴别山麦冬属 4 种植物^[3]和以 rDNA ITS 序列鉴别不同产区麦冬和山麦冬^[4]。徐柯等^[5]曾进行了四川麦冬自然居群间 RAPD 标记分析, 但 RAPD 技术稳定性差, 扩增产率低, 不利于对比分析。因此需要一种简便、稳定、高效的分子

标记开展短葶山麦冬遗传变异的研究。

相关序列扩增多态性 (sequence related amplified polymorphism, SRAP) 是一种以 PCR 为基础的新型分子标记技术, 针对基因 ORFs 中外显子富含 GC 而内含子富含 AT 特点设计引物, 具有简便、稳定、中等产率等特点^[6]。目前已在石斛、忍冬、丹参等多种药用植物中得以应用^[7-9]。本研究利用 SRAP 标记技术, 以我国短葶山麦冬主产区采集的 47 份种质为材料, 分析其遗传多样性, 为新品种选育和科学保护利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验材料主要来源于我国短葶山麦冬的主产区福建省泉州、莆田、南安等地, 海拔 35~464 m, 涉及 21 个村镇共计 47 份, 材料具有较高的代表性

收稿日期: 2010-09-07

基金项目: 福建省农业科技重点项目 (2009N0041); 福建省自然科学基金项目 (2009J05078); 泉州重点项目 (2008N40)

*通讯作者 张君毅 (1978—), 博士, 主要从事药用植物资源学研究。E-mail: zjy0054@yahoo.com.cn

和广泛性。其中 37 号和 38 号样品为野生资源，其他样品为地方品种或主栽品种。试验材料由南京农业大学郭巧生教授鉴定为 *Liriope muscari* (Decne.) Bailey。2009 年 4 月种植保存于华侨大学山麦冬种质资源工作圃和泉州罗溪镇短亭山麦冬 GAP 基地种质资源圃，见表 1。

1.2 SRAP-PCR 扩增

用改良 CTAB 法提取基因组 DNA。试验选用了 9 个正向引物和 10 个反向引物 (表 2)。PCR 反应体系: 60 ng DNA、2.5 μL 10×PCR Buffer、2.0 mmol/L MgCl₂、0.3 mmol/L dNTPs、0.3 μmol/L 上下游引物, *Taq* 酶 1.5 U, 总体积 25 μL, 用无菌水补足。PCR 扩增反应程序采用双温度变温法^[6]。扩增产物用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测。

表 1 供试材料来源

Table 1 Sources of materials tested

编号	产地	编号	产地	编号	产地	编号	产地
1	泉州市罗溪乡双溪村	13	泉州市罗溪乡洪泗村	25	泉州市罗溪乡建兴村	37	莆田盖尾镇蜚山(野生)
2	泉州罗溪乡大路脚村	14	泉州市罗溪乡洪泗村	26	泉州市罗溪乡三合村	38	莆田盖尾镇蜚山(野生)
3	泉州市罗溪乡三合村	15	泉州市罗溪乡洪泗村	27	泉州市罗溪乡三合村	39	泉州市罗溪乡种质圃
4	泉州市罗溪乡柏山村	16	莆田市榜头乡上昆村	28	泉州市罗溪乡后溪村	40	泉州市罗溪乡种质圃
5	泉州市罗溪乡柏山村	17	莆田市盖尾镇东公村	29	泉州市罗溪乡后溪村	41	泉州市罗溪乡种质圃
6	泉州市罗溪乡柏山村	18	莆田市榜头乡后板村	30	泉州市罗溪安内村	42	南安市乐峰乡炉星村
7	泉州市罗溪乡柏山村	19	莆田市榜头乡后堡村	31	泉州市罗溪乡新东村	43	泉州市罗溪乡洪泗村
8	泉州市罗溪乡柏山村	20	莆田市榜头乡象山村	32	泉州市罗溪乡新东村	44	泉州市罗溪乡洪泗村
9	泉州市罗溪乡三村	21	泉州市马甲乡梧峰村	33	泉州市罗溪乡东方村	45	莆田市榜头乡上昆村
10	泉州市罗溪乡三村	22	泉州市马甲乡梧峰村	34	泉州市罗溪乡东方村	46	莆田市榜头乡后板村
11	南安市乐峰乡炉星村	23	泉州市马甲乡梧峰村	35	泉州市罗溪乡翁山村	47	莆田市榜头乡象山村
12	泉州罗溪乡洪泗村	24	泉州市罗溪乡建兴村	36	泉州市罗溪乡永生村		

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 Sequences of SRAP primers

名称	正向引物(5'→3')	名称	反向引物(5'→3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTCAA
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTCTG
Me3	TGAGTCCAAACCGGACC	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACA	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGAGA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACG	Em7	GACTGCGTACGAATTGAG
Me8	TGAGTCCAAACCGGAAA	Em8	GACTGCGTACGAATTGCC
Me9	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em9	GACTGCGTACGAATTTCA
		Em10	GACTGCGTACGAATTCAT

1.3 数据分析

每个样品的扩增电泳谱带按有 (1) 和无 (0) 记录, 构成原始数据矩阵。用 POPGENE1.32 计算多态带数 (NP)、多态位点百分率 (PPL)、观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 信息指数 (I)、群体总遗传多

样性 (H_t)、群体内的遗传多样性 (H_s)、遗传分化系数 (G_{st}) 和基因流 (N_m) 等。用 Excel 2003 软件计算引物多态性信息量 (PIC), PIC 指一个标记可检测的等位基因数及其分布频率 ($PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$, P_{ij} 表示标记 i 的第 j 个带型出现的频率, 标记 i 的总带型从 1 到 n)。用 NTSYS-pc2.1 计算种质间的遗传

相似系数 (GS), 采用非加权类平均法 (UPGMA) 绘制亲缘关系树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及其多态性

从 90 对引物组合中筛选出 15 对扩增条带清晰、重复性好且稳定的多态引物组合用于 47 份种质的扩增分析。图 1 为引物组合 M9/E1 对部分短葶山麦冬扩增结果。15 对引物共扩增出 308 条谱带, 平均每对引物 20.5 条, 其中 Me1/Em7 组合多达

33 条, Me2/Em7 组合最少, 仅 11 条。多态性条带总计 276 条, 平均每对 18.4 条。每对引物产生的多态性位点百分率 (PPL) 为 53.85%~100%, 平均为 88.47%。引物 PIC 介于 0.74~0.96, 平均为 0.90, 其中 Me2/Em6 引物 PIC 值最高 0.96, 表明该引物扩增位点多态性最高, 见表 3。

另外, 表 3 显示不同引物组合所得到遗传变异统计数据不同。在 15 对引物中, 观测 N_a 最大值为 Me2/Em6 和 Me2/Em7 的 2 (标准差为 0), 最小值

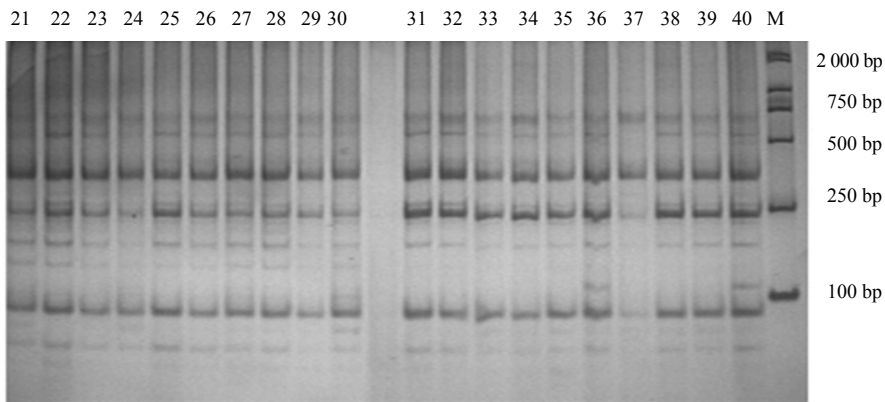


图 1 引物 M9/E1 对部分种质的 SRAP 扩增电泳图谱

Fig. 1 SRAP electrophoresis of part germplasms amplified with primer pair "M9/E1"

表 3 SRAP 引物组合的扩增结果及多态性

Table 3 Results and polymorphism of SRAP primer combinations

引物组合	总带数	NP	PPL/%	PIC	N_a		N_e		H		I	
					平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
Me1/Em1	19	17	89.47	0.90	1.894 7	0.315 3	1.337 1	0.330 7	0.209 7	0.183 2	0.328 2	0.254 7
Me1/Em10	22	13	59.09	0.95	1.590 9	0.503 2	1.527 7	0.492 1	0.268 8	0.249 7	0.375 8	0.346 0
Me1/Em3	16	15	93.75	0.74	1.937 5	0.250 0	1.099 7	0.162 8	0.077 5	0.095 6	0.153 3	0.137 7
Me1/Em7	33	32	100	0.94	2.000 0	0.000 0	1.315 2	0.322 6	0.200 2	0.168 9	0.322 6	0.228 4
Me1/Em8	21	19	90.48	0.89	1.904 8	0.300 8	1.187 1	0.176 7	0.141 9	0.112 3	0.252 3	1.165 6
Me2/Em3	26	21	84.62	0.93	1.846 2	0.367 9	1.285 8	0.319 8	0.183 8	0.163 7	0.299 5	0.225 2
Me2/Em4	20	17	85	0.90	1.850 0	0.366 3	1.215 6	0.170 8	0.162 7	0.110 9	0.282 4	0.167 3
Me2/Em6	30	29	100	0.96	2.000 0	0.000 0	1.572 8	0.253 0	0.346 8	0.114 9	0.522 1	0.143 9
Me2/Em7	11	11	100	0.87	2.000 0	0.000 0	1.409 1	0.280 0	0.266 6	0.132 7	0.425 7	0.162 0
Me3/Em8	17	16	94.12	0.91	1.941 2	0.242 5	1.338 2	0.233 4	0.231 9	0.128 6	0.377 8	0.174 6
Me9/Em1	21	20	95.24	0.91	1.952 4	0.218 2	1.348 4	0.302 2	0.225 3	0.157 7	0.361 3	0.212 2
Me9/Em2	18	18	100	0.92	2.000 0	0.000 0	1.204 5	0.149 7	0.158 2	0.099 1	0.282 5	0.141 0
Me9/Em3	21	21	100	0.91	2.000 0	0.000 0	1.249 6	0.247 7	0.173 7	0.140 0	0.294 5	0.193 4
Me9/Em6	20	17	85	0.90	1.850 0	0.366 3	1.230 4	0.247 4	0.160 0	0.144 4	0.269 9	0.205 6
Me9/Em8	13	7	53.85	0.88	1.538 5	0.518 9	1.198 2	0.286 8	0.128 5	0.168 8	0.205 0	0.250 0
平均值	20.5	18.2	88.47	0.90	1.887 1	0.230 0	1.301 3	0.265 0	0.195 7	0.144 7	0.316 9	0.267 2
物种水平	308	276	89.61	—	1.896 1	0.305 6	1.307 9	0.308 8	0.197 7	0.163 1	0.319 0	0.223 5

为 Me9/Em8 的 1.538 5 (标准差为 0.518 9)。N_e、H 和 I 的最大值均由引物 Me2/Em6 所得,分别为 1.572 8 (标准差为 0.253 0)、0.346 8 (标准差为 0.114 9) 和 0.522 1 (标准差为 0.143 9), 最小值均由引物 Me1/Em3 所得,分别为 1.099 7(标准差为 0.162 8)、0.077 5 (标准差为 0.095 6) 和 0.153 3 (标准差为 0.137 7)。可见不同引物会造成遗传多样性统计数据的巨大差异。

2.2 遗传多样性分析

47 份种质的 PPL 为 89.61%, 观测 N_a 值为 1.896 1 (标准差为 0.305 6), N_e 值为 1.307 9(标准差为 0.308 8), H 值为 0.197 7 (标准差为 0.163 1), I 值为 0.319 0 (标准差为 0.223 5), 见表 3。

按来源地和性质将供试材料划分为 3 个群体, 即泉州地区群体、莆田地区群体和野生资源群体, 分析其群体结构。结果显示, 3 个群体的 H_t、H_s、D_{st} 值分别为 0.195 5, 0.146 1 和 0.049 4。G_{st} 为 0.252 8, 表明短葶山麦冬群体遗传变异主要存在群体内, 占总变异的 74.72%, 而群体间仅占 25.28%, 见表 4。

3 个群体间的 Nm 值为 1.477 6, 说明短葶山麦冬群体间存在基因交换。其中, 泉州和莆田全体之间基因流为 11.059 9, 比泉州与野生群体 (N_m=1.317 6) 和莆田与野生群体 (N_m=1.196 3) 间有更高的基因流(表 4)。说明泉州与莆田群体之间具有很近的亲缘关系。GS 值表明泉州与莆田群体高达 0.980 5, 大于泉州与野生群体 (GS=0.880 4) 和莆田与野生群体 (GS=0.885 4) 遗传相似性, 见表 5。

2.3 聚类分析

基于供试材料的遗传相似系数矩阵, 采用 UPGMA 法构建了 47 份短葶山麦冬亲缘关系聚类图(图 2)。从图 2 看出, 各种质间遗传相似系数为 0.59~0.99。在相似系数 0.75 处可以将 47 个短葶山麦冬基因型分为 A、B、C、D 共 4 个类群。A 类群主要是来源于泉州地区种质, B 类群主要是来自莆田地区的种质。也有部分资源没有聚在来源地类群, 如来自莆田地区的 45 号、46 号和 47 号材料聚在 A 类群。C 类和 D 类分别只有 38 号和 37 号材料, 独自聚为一类, 可能与其是野生型有关。

表 4 3 个群体遗传多样性和遗传结构

Table 4 Genetic diversity and genetic structure in three groups of population

群体	H _t		H _s		G _{st}	N _m
	平均值	标准差	平均值	标准差		
泉州-莆田	0.186 9	0.028 0	0.178 8	0.025 3	0.043 3	11.059 9
泉州-野生	0.190 4	0.031 2	0.138 0	0.016 4	0.275 1	1.317 6
莆田-野生	0.172 2	0.032 9	0.121 4	0.018 0	0.294 8	1.196 3
3 个群体	0.195 5	0.030 3	0.146 1	0.017 0	0.252 8	1.477 6

表 5 3 个群体遗传相似性和遗传距离

Table 5 Genetic similarity and genetic distance among three groups of population

类群	泉州地区	莆田地区	野生资源
泉州地区	—	0.980 5	0.880 4
莆田地区	0.019 7	—	0.885 4
野生资源	0.127 4	0.121 7	—

上方为遗传相似性系数, 下方为遗传距离

Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

3 讨论

3.1 SRAP 分子标记评价遗传多样性

SRAP 标记的结果表明, 15 对引物对 47 份短葶山麦冬基因组 DNA 扩增出 276 条多态性带, PPL 值为 89.61%, 低于以 RAPD 标记研究麦冬及沿阶

草的 92.23%^[5], 这应与实验材料不同有关, 前者为种内水平, 后者为种间水平。该结果高于以 ISSR 标记研究相同实验材料的 PPL 值 (64.36%)^[10], 这可能因 SRAP 和 ISSR 两种标记的分辨效率不同所致。由 SRAP 和 TRAP 两种标记分析短葶山麦冬观测 N_a 值为 1.896 和 1.964, N_e 值为 1.308 和 1.332, H 值为 1.198 和 1.209, I 值为 0.319 和 0.334。前者结果略低于后者, 可能与 SRAP 标记引物多态性信息量 (PIC=0.90) 低于 TRAP 引物 (PIC=0.93) 有关。总体而言, SRAP 和 TRAP 两种标记分析短葶山麦冬遗传多样性结果基本一致。

本研究中泉州地区和莆田地区群体遗传距离为 0.019 7 (表 5), 符合 Gottlieb^[11]提出同种种内居群间遗传距离通常小于 0.05 判断, 且 rDNA-序列分析也表明泉州和莆田两地材料确为同一品种^[4]。而两

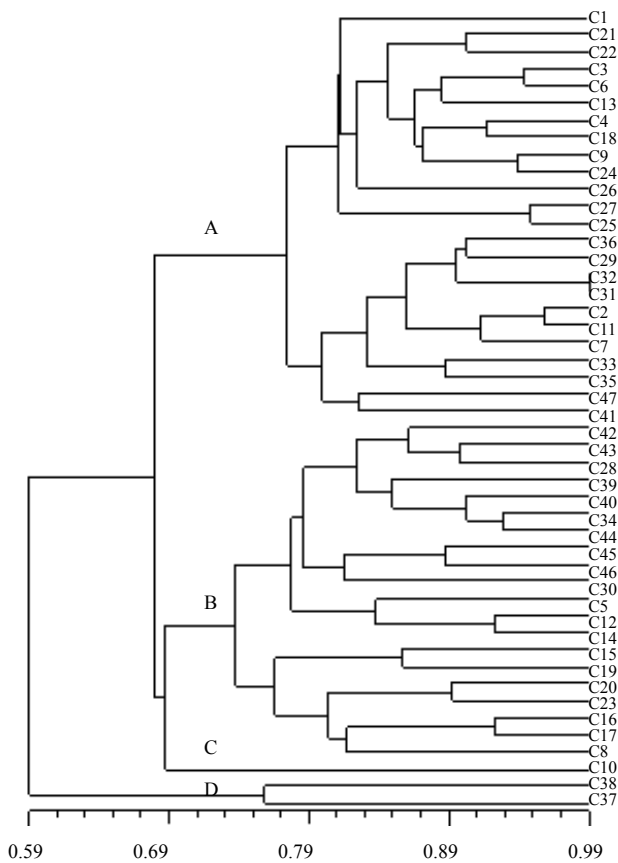


图 2 47 份短葶山麦冬 Nei 遗传距离 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 47 *L. muscari* germs by UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distance

者与野生群体遗传距离分别为 0.127 4 和 0.121 7, 说明栽培品种与野生种质间具有较大遗传变异。

Hamrick 等^[12]认为 N_m 大于 1, 就足以抵制遗传漂变的作用, 也同时防止了群体分化的发生。本实验结果显示群体间 N_m 为 1.477 6, 表明遗传漂变未成为群体遗传结构的主导因素之一。

3.2 聚类分析

SRAP 标记分析 47 份材料 GS 为 0.59~0.99, 与 TRAP 标记分析结果 (0.52~0.98) 和 ISSR 标记分析结果 (0.64~0.98) 基本一致, 说明短葶山麦冬种内遗传多样性较大, 与尤海涛^[2]短葶山麦冬主要数量性状变异研究结论一致。基于遗传相似系数构建亲缘关系聚类图。根据来源性质不同, 供试材料

可自聚为一类, 如 37 号和 38 号样品是野生资源。栽培品种根据来源地区不同, 大部分也可自聚为一类, 如 A 类群主要是来源于泉州地区种质, B 类群主要是来自莆田地区的种质。当然也有少部分材料聚在其他类群, 如来自泉州地区罗西乡洪泗村的 14、15 号样品与来自莆田地区榜头乡的 19、20 号样品都聚在 B 类。

致谢: 南京农业大学郭巧生教授对研究材料予以鉴定。

参考文献

- [1] 中国药典. [S]. 一部. 2005.
- [2] 尤海涛, 李松, 陈菁瑛. 短葶山麦冬主要数量性状变异及因子分析 [J]. 福建农业学报, 2008, 23(1): 53-57.
- [3] 吴韬, 王义权, 余伯阳, 等. RAPD 在山麦冬属四种植物分类中的应用 [J]. 中草药, 1998, 29(1): 37-40.
- [4] 黄玉吉, 陈菁瑛, 苏海兰, 等. 不同产区麦冬、山麦冬 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 福建农业学报, 2009, 24(6): 508-512.
- [5] 徐柯, 郑鸣, 曹毅, 等. 四川麦冬自然居群间 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2002, 33(7): 648-652.
- [6] Li G, Ouirou 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 *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [7] 邓婧, 陈新, 宣朴. 黄花蒿 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 125-128.
- [8] 陈大霞, 李隆云, 吴叶宽, 等. 灰毡毛忍冬自然群体遗传多样性的 SRAP 研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 143-147.
- [9] 王维婷, 单成钢, 倪大鹏, 等. 不同来源丹参种质遗传多样性的 SRAP 标记分析 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 632-635.
- [10] 陈瑞凤, 张君毅. 短葶山麦冬遗传多样性的 ISSR 标记研究 [J]. 福建农业学报, 2010, 25(3): 245-250.
- [11] Gottlieb L D. Electrophoretic evidence and plant populations [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1977, 64: 162-180.
- [12] Hoch D C, Stephnon A G. *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics* [M]. St Louis: Missouri Botanicl Garden, 1995.