广西草珊瑚种质资源遗传多样性的 AFLP 分析

唐美琼[1,2]，韦荣昌[1,2,3]，姚绍嫦[1,2]，蓝祖栽[1,2*]，凌征柱[1,2]

1. 广西药用植物园，广西 南宁　530023
2. 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室，广西 南宁　530023
3. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所，北京　100193

摘　要：目的　探索广西草珊瑚 *Sarcandra glabra* 种质资源的遗传多样性，为草珊瑚及其他中药种质资源保护、亲缘关系研究、品种选育和引种栽培提供分子生物学依据。**方法**　利用 AFLP 标记对来自广西不同产地的 18 份草珊瑚开展遗传多样性分析，采用 NTSYS 软件进行聚类和主坐标分析。**结果**　从 64 对 AFLP 引物组合中筛选出 8 对用于扩增，共获得 319 条清晰可辨条带，其中多态性条带 251 条，多态性位点百分率为 78.68%。聚类和主坐标分析表明广西草珊瑚种质资源的遗传基础存在一定的多样性，但遗传相似性系数（0.630 3～0.836 6）较大，遗传距离较近。**结论**　广西草珊瑚种质资源的遗传多样性偏低，应该尽快采取相应措施，对草珊瑚资源进行合理保护。

关键词：草珊瑚；种质资源；遗传多样性；AFLP；多态性条带

中图分类号：R282.23　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2012)07 - 1398 - 05

AFLP analysis on genetic diversity of *Sarcandra glabra* in Guangxi region

TANG Mei-qiong[1,2], WEI Rong-chang[1,2,3], YAO Shao-chang[1,2], LAN Zu-zai[1,2], LING Zheng-zhu[1,2]

1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China
2. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Nanning 530023, China
3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective　To evaluate the genetic diversity of germphlasm resources for *Sarcandra glabra* and provide biological reference for germplasm resources protection, genetic relationship analysis, breeding, and introduction and cultivation of *S. glabra* and other Chinese herbal medicines. **Methods**　Amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker was developed to analyze the genetic diversity among 18 samples of *S. glabra* from various habitats in Guangxi region, and cluster analysis and principal coordinate analysis were revealed by the NTSYS software. **Results**　Eight out of sixty-four AFLP primer combinations selected were used for amplification and a total of 319 unambiguous bands were obtained, among which 251 (PPB＝78.68%) were polymorphic. The results of cluster analysis and principal coordinate analysis showed that there was a certain genetic basis of diversity in *S. glabra*. The genetic similarity coefficients (0.630 3—0.836 6) were bigger while the genetic distance was closer. **Conclusion**　The genetic diversity of germplasm resources for *S. glabra* in Guangxi region is not abundant and protection strategies should be carried out on *S. glabra*.

Key words: *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai; germplasm resources; genetic diversity; amplified fragment length polymorphism (AFLP); polymorphic bands

草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 是金粟兰科草珊瑚属多年生常绿亚灌木，别名肿节风、九节茶，接骨木等，收载于《中国药典》2010 版[1-2]。草珊瑚生态适应性强，在我国广泛分布。作为草珊瑚主产区的广西，有着丰富的种质资源，全区大部分市县都有野生分布。近年来，随着市场需求量的增长及不合理的采集，野生草珊瑚存储量逐年递减，草珊瑚野生资源受到严重威胁，绝大部分野生草珊瑚种质处于濒危状态。丰富的种质资源遗传多样性是草珊瑚育种的前提和先决条件，草珊瑚野生种质消亡不仅极大影响其优良品种的选育，还将导致其对环境适应能力的降低，不利于其种群的生息繁衍。

收稿日期：2012-02-14

基金项目：广西科学研究与技术开发计划项目资助（桂科攻 1099063-13）

作者简介：唐美琼（1984—），女，广西全州人，研究实习员，硕士，研究方向为药用植物分子育种。
Tel: (0771)5607502　E-mail: tangmeiqiong2006@163.com

***通讯作者**　蓝祖栽　Tel: (0771)5602850　E-mail: zuzai@126.com

网络出版时间：2012-06-04　　网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120604.1059.002.html

因此，开展不同产地野生草珊瑚种群的遗传多样性研究，对探讨草珊瑚濒危机制，建立合理的草珊瑚种质资源保护策略以及草珊瑚优良品种选育等具有重要意义。本研究应用 AFLP 技术对来自广西不同产地的 18 份草珊瑚种质开展了遗传多样性分析，以了解其遗传背景，从分子水平上为今后开展草珊瑚种质资源保护及优良种质选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为广西不同产地采集的 18 份野生草珊瑚种质，各居群间间隔≥50 km，见表 1。每份草珊瑚种质选取生长状况良好的 3～5 个单株，每个单株采集约 10 片健康幼嫩叶片，用硅胶干燥保存，带回实验室中待用。

表 1 草珊瑚种质来源

Table 1 Germplasm resources of *S. glabra*

编号	采集地点	经度	纬度	编号	采集地点	经度	纬度
GF	南宁市高峰林场	108°21′	22°57′	LY	凌云伶站	106°34′	24°21′
GP	桂平天湾度林场	110°04′	23°22′	DL	东兰县东兰镇百豪村	107°22′	24°31′
RA	融安县雅瑶乡苏田村	109°15′	25°05′	BT	罗城宝坛就完山	108°44′	25°04′
LC	陆川县马坡镇镇西村	110°16′	22°19′	JX	靖西县录洞乡	106°16′	23°08′
LG	临桂黄沙乡	110°11′	25°14′	DX	东兴马路镇	108°00′	21°41′
CW	苍梧新地	111°14′	23°25′	LS	灵山	109°28′	22°29′
RX	容县都桥山	110°32′	22°51′	SS	上思那板水库	108°02′	22°07′
BL	北流大容山	110°21′	22°42′	GY	灌阳县三江村	108°02′	22°07′
BB	博白县那林镇	109°59′	22°16′	LP	荔浦县杜莫镇	109°28′	22°29′

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的提取 每个居群的所有样本各称取 0.2 g 草珊瑚叶片并混合，用植物基因组 DNA 提取试剂盒由天根生化科技（北京）有限公司提取草珊瑚基因组 DNA。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的纯度和完整性，根据标准的 λDNA 浓度将提取的草珊瑚基因组 DAN 统一稀释为 50 ng/μL。

1.2.2 AFLP 反应 AFLP 实验流程按照 Vos 等的方法进行[3]。基因组 DNA（50 ng/μL）用两种限制性内切酶（MseI 和 EcoRI）在 37 ℃保温 4 h 进行双酶切；限制性内切酶消化后，用 T_4DNA 连接酶在 16 ℃保温 3 h 将酶切片段连接到双链 MseI 和 EcoRI 接头上；连接产物用预扩增引物进行预扩增；预扩增产物稀释 15 倍后进行选择性扩增。扩增产物用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶分离；银染、扫描保存图片。从 64 对 AFLP 选择性引物组合中最终选用了 8 对均能产生谱带清晰、多态性强的组合进行样品的选择性扩增，得到 AFLP 的 DNA 指纹图谱。

1.2.3 数据处理 AFLP 为显性标记，同一引物的扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性，按照相同迁移位置上有扩增条带记录为 1、无扩增条带记录为 0 的方法记录电泳谱带，构建 0，1 原始矩阵。仅清晰、稳定、可分辨的并且长度在 600～1 000 bp 内的 AFLP 扩增条带才被记录。分别统计得到的总扩增位点数和多态性位点数。应用 NTSYS-pc Version 2.02[4] 软件中的 Similarity Qualitative 命令求得 DICE 相似性系数矩阵，用 SANH 中的非加权平均数（unweight pair-group method using arithmetic averages，UPGMA）法对统计数据进行聚类分析，并最终由 Tree plot 命令生成聚类图；Dcenter 程序对相似系数矩阵进行转换，Eigen 程序求特征值和特征向量，进行主坐标分析，生成主坐标图。

2 结果与分析

2.1 草珊瑚种质的 AFLP 分析

经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测，用试剂盒提取的草珊瑚基因组 DNA 条带清晰、明亮，而且没有明显的降解。草珊瑚基因组 DNA 经 EcoRI 和 MseI 双酶切及预扩增，从 64 对 AFLP 引物组合中筛选出 8 对扩增稳定、条带清晰、多态性高的 AFLP 引物组合（表 2），即：MseI-CAA/EcoRI-AGC、MseI-CTC/EcoRI-AGG、MseI-CAT/EcoRI-AGG、MseI-CTG/EcoRI-ACA、MseI-CAC/EcoRI-ACG、MseI-CTA/EcoRI-ACA、MseI-CTA/EcoRI-ACG、MseI-CTA/EcoRI-AGG。

8 对引物共扩增出 319 条清晰可辨条带，平均约 40 条/对引物，其中 251 条是多态性带，平均每对引物 31.4 条，多态性位点的百分比率（PPB）为 73.33%～86.96%，平均 78.68%（表 3）。图 1 是

表 2　用于 AFLP 分析的 MseI 引物和 EcoRI 引物

Table 2　Primers of MseI and EcoRI used in AFLP analysis

名 称	核苷酸序列	名 称	核苷酸序列
Mse I 接头 1	5’-TACTCAGGACTCAT-3’	EcoR I 接头 1	5’-CTCGTAGACTGCGTACC-3’
Mse I 接头 2	5’-GACGATGAGTCCTGAG-3’	EcoR I 接头 2	5’-AATTGGTACGCAGTCTAC-3’
MC	5’-GATGAGTCCTGAGTAA-3’	EA	5’-GACTGCGTACCAATTC-3’
MCAA	5’-GAT GAG TCC TGA GTA A CAA-3’	EAGC	5’-GAC TGC GTA CCA ATT C AGC-3’
MCTC	5’-GAT GAG TCC TGA GTA A CTC-3’	EAGG	5’-GAC TGC GTA CCA ATT C AGG-3’
MCAT	5’-GAT GAG TCC TGA GTA A CAT-3’	EACC	5’-GAC TGC GTA CCA ATT C ACC-3’
MCTG	5’-GAT GAG TCC TGA GTA A CTG-3’	EACA	5’-GAC TGC GTA CCA ATT C ACA-3’
MCAC	5’-GAT GAG TCC TGA GTA A CAC-3’	EACG	5’-GAC TGC GTA CCA ATT C ACG-3’
MCTA	5’-GAT GAG TCC TGA GTA A CTA-3’	EACT	5’-GAC TGC GTA CCA ATT C ACT-3’
MCTT	5’-GAT GAG TCC TGA GTA A CTT-3’	EAAG	5’-GAC TGC GTA CCA ATT C AAG-3’
MCAG	5’-GAT GAG TCC TGA GTA A CAG-3’	EAAC	5’-GAC TGC GTA CCA ATT C AAC-3’

表 3　8 对 AFLP 引物组合的扩增结果

Table 3　Amplification from eight pairs of primer combinations

引物组合	总扩增带数	多态性条带数	多态性位点百分率 / %
MseI-CAA/EcoRI-AGC	45	33	73.33
MseI-CTC/EcoRI-AGG	38	31	81.58
MseI-CAT/EcoRI-AGG	41	31	75.61
MseI-CTG/EcoRI-ACA	46	40	86.96
MseI-CAC/EcoRI-ACG	38	28	73.68
MseI-CTA/EcoRI-ACA	32	25	78.13
MseI-CTA/EcoRI-ACG	43	33	76.74
MseI-CTA/EcoRI-AG	36	30	83.33
总数	319	251	
平均	39.8	31.37	78.68

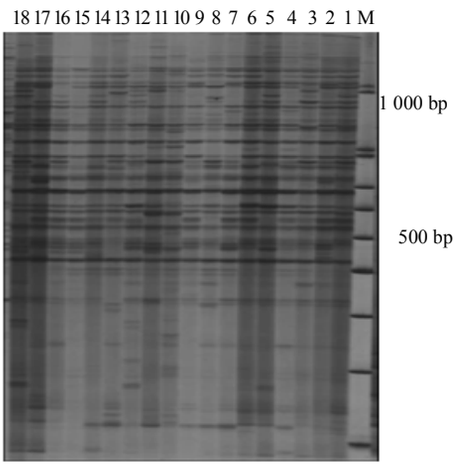

图 1　AFLP 引物组合 MseI-CAT/EcoRI-AGG 的扩增图谱

Fig. 1　AFLP amplification by MseI-CAT/EcoRI-AGG

引物组合 MseI-CAT/EcoRI-AGG 的扩增图谱，在大于 1 000 bp 的区域，扩增带多而密，不易辨认，小于 600 bp 的扩增带多数较弱，亦不易辨认，故都不予记录；在 600～1 000 bp 内，扩增带清晰稳定且易于辨认，本研究记录的多态性带来自这一部分。

2.2　草珊瑚遗传距离及聚类分析

用 NTSYS-pc Version 2.02 软件对 18 份不同产地的草珊瑚种质进行遗传分析，获得种质间的遗传相似性（GS）系数。

其中 DL 和 GY 的 GS 系数最小（0.730 3），GF 和 GP 相似性系数最高（0.836 6）。基于 GS 系数，利用 UPGMA 法对 18 份供试材料进行聚类分析（图 2）。根据聚类图可知，GF 和 GP 及 LS 和 SS 最先直接聚为一类，两两之间距离较近，其中 GF 和 GP 的距离最近，因为它们的 GS 系数最高（0.836 6）。在 GS 系数 0.79 水平将 18 份种质分为 6 个类群，第 I 类群由 GF、GP、RA、LC、LG、CW、BT、RX、BB、DX、LS、SS、LP 共 13 份种质组成，第 Ⅱ、V、VI、VII、VIII 类群皆只有 1 份种质，分别是 JX、BL、GY、LY、DL。

2.3　草珊瑚主成分分析

主坐标分析是基于 Nei 氏遗传距离及相应的 GS 系数进行的，因此，主坐标分析图（图 3、4）中各个供试材料间的位置关系反映它们在遗传上的相似性。对 18 份种质资源 AFLP 标记结果进行主坐标分析，前 3 个主坐标解释的变异分别为 30.48%、11.65%、9.92%，相对应的累积贡献率分

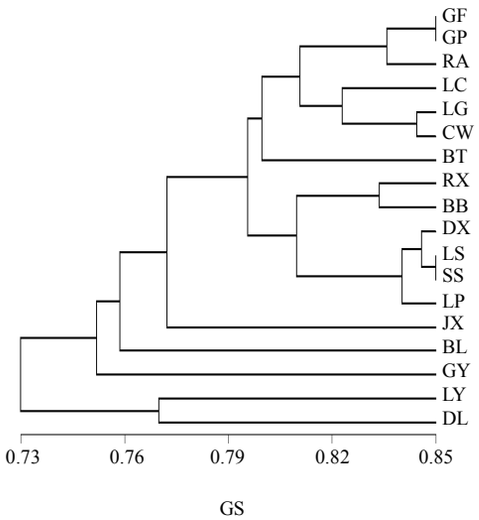

图 2 18 份种质的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 18 germplasms

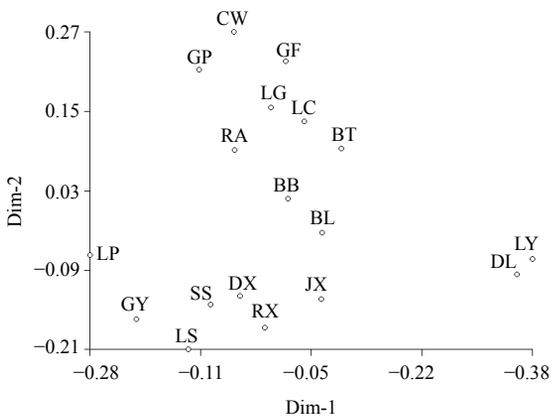

图 3 18 份种质的主坐标散点二维图

Fig. 3 Tow-dimensional plot of principal coordinate scatter for 18 germplasms

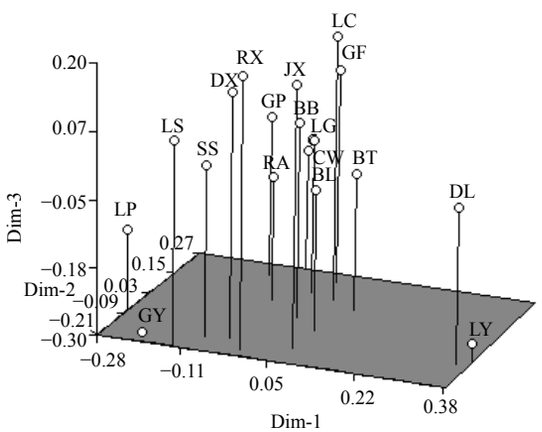

图 4 18 份种质的主坐标散点三维图

Fig. 4 Three-dimensional plot of principal coordinate scatter for 18 germplasms

别为 30.48%、42.13%和 52.05%。一般认为，如果前 3 个主要特征向量的方差占总方差的 40%以上，则排序效果是满意的[5]，18 份材料的前 3 个主要特征向量的方差累积贡献率高达 52.05%，说明了降维效果较好。因此，对供试材料做第一、第二主坐标二维图的排序和前 3 个主坐标三维图的排序。

比较图 2～4 可知，对 18 份材料所进行的亲缘关系聚类分析和主坐标分析的结果基本上是一致的，不同地区种质之间的遗传距离相对较近聚在一起，而主坐标分析能从多个方向、多个层面更直观和准确地反映材料间的遗传关系。

3 讨论

3.1 AFLP 技术在广西草珊瑚种质资源研究中的可行性

研究种质资源多样性状况、品种的遗传背景、遗传结构及品种间的亲缘关系，可以为种质资源的利用与开发提供帮助，进而制定合理开发利用的方案和育种策略，这就需要一种甚至多种可靠的、鉴别力强的分类鉴定手段。本研究中采用 AFLP 技术，利用筛选到的 8 对引物组合，在 18 份草珊瑚种质上均能得到清晰的 AFLP 指纹图谱，表明该技术能稳定、高效地扩增草珊瑚基因组 DNA，对不同产地的草珊瑚种质能够有效区分，是研究草珊瑚种质资源遗传多样性的理想方法。

3.2 广西草珊瑚种质资源的遗传多样性

由 AFLP 标记结果可知，在 18 个草珊瑚居群中共扩增得到 319 条清晰可辨的条带，其中 251 条具有多态性，多态性位点比率达 78.86%，表明广西草珊瑚种质资源的遗传基础存在一定的多样性，但遗传相似性系数较大，遗传距离较近。从聚类结果来看，广西草珊瑚不同种质间的遗传距离与空间距离间不存在明显可见的相关性，来自相近或相邻地理区域的种质资源并没有完全聚在一起，某些种质与一些地理距离较远的种质遗传关系较近，遗传差异与其来源地的关系并不明显，这与张志勇[6]采用 RAPD 标记研究西南地区草珊瑚种质资源遗传多样性的结果相似。分析其原因，可能与特有的地理位置和环境因素有关，在生物进化的过程中，基因与环境之间相互作用导致不同地理位置居群在分子水平上存在差异，在大的地理位置相同的情况下，草珊瑚生存的小环境更相似的居群在分子水平上表现更加一致，所以才得到以上聚类结果。

综上所述，考虑到目前草珊瑚兼作药用和保健

品，国内外需求量将不断增大，及时采取措施对现有优良品种进行合理保护，将广西草珊瑚种质资源的遗传多样性保持在较高水平，不仅有助于草珊瑚新品种选育及现有推广品种（系）的遗传改良，也有助于提供草珊瑚的环境适应和生存能力，使其长期为人类服务。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 徐艳琴, 刘小丽, 黄小方, 等. 草珊瑚的研究现状与展望 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2552-2559.

[3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al*. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.

[4] Rohlf F J. NTSYS-pc: *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* [M]. Version 2.02. New York: Exeter Publications, 1998.

[5] Gauch H G. 群落生态学中的多元分析 [M]. 杨 持, 译. 北京: 科学出版社, 1982.

[6] 张志勇. 药用植物草珊瑚群落生态和遗传多样性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2007.

2012 海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会通知 (第 2 轮)

为了促进中药及天然药物资源科学利用与可持续发展，由中国自然学会天然药物资源专业委员会、中国药材 GAP 研究促进会（香港）和甘肃省人民政府共同主办的“2012 海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会”拟定于 2012 年 8 月 14～18 日在甘肃省兰州市召开。

一、会议时间：2012 年 8 月 14 日全天报到，8 月 15～16 日会议学术交流，8 月 17～18 日赴中药材 GAP 基地考察。

二、会议地点：西北宾馆（兰州军区司令部），甘肃省兰州市南昌路 289 号。

三、会议日程：（1）8 月 14 日晚 19:30，召开大会预备会。（2）8 月 15 日上午，大会开幕式、特邀报告；下午大会报告。（3）8 月 16 日上午，分会场报告；下午分会场报告及大会闭幕式。（4）8 月 17、18 日 GAP 基地考察。

四、学术研讨会主题及分会场

（1）会议主题：**中药及天然药物资源的科学利用与可持续发展—甘肃陇药资源研究及中医药文化产业论坛**

（2）分会场

第一分会场：中药及天然药物资源调查研究与保护

交流内容： 1、中药及天然药物资源调查研究；2、中药及天然药物资源保护

第二分会场：中药材规范化生产（GAP）与中药资源科学利用

交流内容： 1、中药材规范化生产（GAP）；2、中药及天然药物资源化学与科学利用

第三分会场：中医药文化产业与中药资源学科建设

交流内容： 1、中医药文化传播与产业化；2、中药及天然药物资源学科建设与人才培养

五、会议注册费：1、会议注册费：1 000 元/人（研究生凭有效学生证 500 元/人），包括会务费、材料费及会议期间餐费。费用由南京中医药大学开具事业单位收据。请于 6 月 30 日前汇入以下账户：

账号户名：南京中医药大学 开户行：南京市工商银行汉中门支行

账 号：4301010109001027264 汇款用途请注明：2012 资源学会研讨会

六、会议重要事项提示：（1）论文及摘要报送 6 月 30 日截止。论文将收载入本次大会论文集，如作者同意，将择优推荐至《中国现代中药》杂志并优先录用。论文集将被中国知网全文收录。（2）代表回执报名 6 月 30 日截止。（3）大会报告和分会场交流的代表请将 PPT 电子稿 7 月 10 日发至会务组。（4）8 月 14 日全天报到。

七、会务组联系方式

联系地址：江苏省南京仙林大学城仙林大道 138 号（邮政编码：210046）

南京中医药大学药学院 CSNR 天然药物资源专业委员会办公室

Tel: (025)85811519 (025)85811514 **Fax:** (025)85811524

联系人：单鸣秋 15951802806 严 辉 13512537853 **E-mail:** tryw2010@126.com

会议通知将在天津中草药杂志社网站（www.tiprpress.com; www. 中草药杂志社. 中国）上全文发布。

CSNR 天然药物资源专业委员会

中国药材 GAP 研究促进会（香港）