

川续断种质资源遗传多样性的 SRAP 分析

艾强¹, 周涛^{1*}, 江维克¹, 袁媛², 肖承鸿¹, 熊厚溪¹, 贺勇³

1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002
2. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700
3. 贵州同济堂制药有限公司, 贵州 贵阳 550002

摘要: 目的 开展川续断种质资源的遗传多样性研究, 为合理利用川续断种质资源提供理论依据。方法 运用 SRAP 分子标记方法对川黔境内川续断的遗传多样性进行分析。结果 10 对引物共检测到 124 个位点, 其中 102 个位点具有多态性, 多态位点百分率 (PPL) 为 82.26%。川续断总的 Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.280 0, Shannon's 多态性信息指数 (I) 为 0.435 3; 居群水平上川续断的 PPL 为 53.92%, H 为 0.121 2~0.244 0, I 为 0.179 6~0.361 1, 其中 5 个高海拔、小生境特征的居群遗传多样性指标较高。居群间的基因分化系数 Gst 为 0.293 0, 基因流 (Nm) 为 1.206 4。基于遗传相似性, 14 个居群可聚为 3 类。结论 川续断居群的遗传多样性水平丰富, 遗传变异主要存在居群内, 地理位置 (海拔) 和气候是川续断居群遗传多样性较高的影响因素, 而地理隔离 (小生境) 是造成居群内遗传变异高于居群间的另一因素。

关键词: 川续断; 种质资源; 遗传多样性; 居群; SRAP

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)15-2155-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.023

SRAP analysis on genetic diversity for germplasm resources of *Dipsacus asper*

AI Qiang¹, ZHOU Tao¹, JIANG Wei-ke¹, YUAN Yuan², XIAO Cheng-hong¹, XIONG Hou-xi¹, HE Yong³

1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China
2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China
3. Guizhou Tongjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550002, China

Abstract: Objective To study the genetic diversity of *Dipsacus asper* from different populations and provide a reference for the rational utilization of its germplasm. **Methods** The genetic diversity of the 14 populations of *D. asper* was analyzed by SRAP molecular markers. **Results** Ten pairs of primers produced 124 sites, among which 102 were polymorphic sites. The percentage of polymorphic loci (PPL) was 82.26%. The Nei's genetic diversity index (H) and the Shannon's information index (I) were 0.280 0 and 0.435 3, respectively. At the population level, PPL was 53.92%, H was 0.121 2—0.244 0, and I was 0.179 6—0.361 1. The genetic diversity values of the five populations were relatively high, and the populations had the characteristics of high altitude and microhabitat. Genetic differentiation coefficient (Gst) was 0.293 0, gene flow (Nm) was 1.206 4. Cluster analysis based on genetic similarity indicated that the 14 populations could be divided into three groups. **Conclusion** The genetic diversity among the populations of *D. asper* was at relatively high level. The genetic variance of *D. asper* mainly existed within the populations. The high genetic diversity could be attributed to the geographical position (altitude) and climate, while geographic isolation (microhabitat) was another important factor for the genetic variance within the populations.

Key words: *Dipsacus asper* Wall. ex Henry; germplasm resources; genetic diversity; population; sequence related amplified polymorphism

川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 为常用中药材, 具有补肝肾、强筋骨、续折伤、止崩漏的功能, 用于肝肾不足、腰膝酸软、风湿痹痛、跌扑损伤、筋伤骨折、崩漏、胎漏等症的治疗^[1]。我国贵州、四川、云南、湖北为川续断野生资源的主要分布区, 大部分采收的药材经两广、四川集散后销往

收稿日期: 2013-03-02

基金项目: 国家自然科学基金地区基金资助项目 (81160501); 国家“十一五”科技支撑项目 (2009BA174B01); 贵阳市科技创新公共技术平台项目 (2010 筑科合字第 3-2 号)

作者简介: 艾强 (1977—), 男, 硕士, 主要从事中药资源鉴定与评价研究。Tel: 13511991672 E-mail: aiqiang2011@163.com

*通信作者 周涛 (1968—), 女, 教授。E-mail: taozhou88@163.com

全国。近年来, 在一些中成药如“仙灵骨葆胶囊”、“骨康胶囊”、“大活络丹”、“祛风止痛片”等的市场需求带动下, 对川续断药材资源的需求急剧增加。据文献报道^[2-3]和本课题组前期的研究结果, 川续断药材的质量不仅随产地不同有差异, 而且不同原植株间的植物学性状、栽培抗性等也存在较明显差别, 提示川续断存在丰富的生物多样性。但就目前有关川续断种质资源的遗传多样性研究还鲜见报道。

遗传多样性是指种内不同居群之间和同一居群不同个体之间的遗传变异的总和, 它是生物多样性的基础和内在形式。近年来, 利用分子标记技术开展药用植物种质资源研究已有广泛报道^[4-7]。其中的相关序列扩增多态性 (SRAP) 分子标记技术可反映生物体基因组内含子、间隔序列及启动子长度的多态性水平, 具有简便、易从序列中得到分离的条

带等优点^[8]。本实验运用 SRAP 分子标记方法对川黔境内的川续断种质资源开展遗传多样性水平分析, 旨在通过阐明川续断物种、居群之间及个体的遗传分布水平, 为合理利用川续断种质资源、探讨川续断道地药材品质形成的影响机制提供理论基础。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

样品于 2009—2011 年采自四川西昌、盐源, 贵州六枝、雷山、关岭、盘县等 14 个地区的不同生境, 统一种植于贵州省龙里县麻芝乡贵州同济堂中药材种植公司的川续断种质资源圃。2012 年 3 月采集 14 个居群共 140 单株样的新鲜幼嫩叶片, 置 -20 °C 冰箱保存。所有样品凭证标本均经贵阳中医学院生药教研室江维克教授、魏升华副教授共同鉴定。见表 1。

表 1 实验材料

Table 1 Experimental materials

| 居群编号 | 采集地 | 样本数 | 经度 (E) | 纬度 (N) | 海拔 / m |
|------|---------|-----|---------|--------|--------|
| 1 | 贵州六枝堕却乡 | 10 | 105°15' | 26°17' | 1 777 |
| 2 | 贵州雷山西江镇 | 10 | 108°12' | 26°30' | 1 353 |
| 3 | 贵州关岭永宁镇 | 10 | 105°31' | 25°56' | 1 314 |
| 4 | 贵州盘县旧营乡 | 10 | 104°45' | 25°49' | 1 578 |
| 5 | 贵州大方长石镇 | 10 | 105°40' | 27°31' | 1 632 |
| 6 | 贵州麻江龙山镇 | 10 | 107°41' | 26°30' | 914 |
| 7 | 贵州盘县羊场镇 | 10 | 104°49' | 25°52' | 1 700 |
| 8 | 贵州开阳禾丰乡 | 10 | 106°53' | 26°54' | 1 300 |
| 9 | 贵州龙里龙山镇 | 10 | 106°56' | 26°27' | 1 140 |
| 10 | 贵州水城野钟乡 | 10 | 104°53' | 26°18' | 2 090 |
| 11 | 贵州修文扎佐镇 | 10 | 106°42' | 26°52' | 1 296 |
| 12 | 贵州大方凤山乡 | 10 | 105°44' | 27°16' | 1 866 |
| 13 | 四川西昌大箐乡 | 10 | 102°20' | 27°46' | 1 933 |
| 14 | 四川盐源卫城镇 | 10 | 101°39' | 27°27' | 2 452 |

1.2 仪器与试剂

PCR 仪 (Mastercycler, 德国 Eppendorf); 凝胶成像系统 (GGM/D2, 英国 Syngene); 核酸定量分析仪 (Nanodrop 2000, 美国 Thermo); 电泳仪 (DYY—6C 型, 北京六一仪器厂); 冷冻离心机 (Centrifuge 5810R, 德国 Eppendorf); 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型, Tiangen 公司); Premix Ex Taq™ Version 2.0 (Loading dye mix, 宝生物工程大连有限公司); 5×TBE 缓冲液 (Tris 硼酸电泳缓冲液, 临用前配成 0.5×TBE); 琼脂糖 (西班牙 Biowest

agarose); EB (溴化乙锭溶液 RT203, Tiangen 公司); Marker (D2000, Tiangen 公司)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

采用 DNA 提取试剂盒提取各单株基因组 DNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量, 核酸定量分析仪检测 DNA 的纯度和质量浓度, 并将质量浓度调整为 20 ng/μL, -20 °C 保存备用。

2.2 SRAP 引物的合成与筛选

SRAP 引物序列参考加州大学蔬菜作物系 Li 等^[8]

发表的序列，由上海捷瑞生物工程公司合成，共 80 对。以居群 6 的 2 号个体 DNA 为模板，筛选多态性好、条带清晰的引物用于川续断种质资源遗传多样性分析。

2.3 PCR 扩增与产物检测

反应体系为：Ex Taq mix 10 μ L，引物正反向各 1 μ L，DNA 模板 1 μ L，ddH₂O 补足至 20 μ L。扩增程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94 $^{\circ}$ C、30 s，35 $^{\circ}$ C、60 s，72 $^{\circ}$ C、60 s，5 个循环；94 $^{\circ}$ C、30 s，35 $^{\circ}$ C、60 s，72 $^{\circ}$ C、60 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min，4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物 5 μ L 于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 1 h 后在凝胶成像系统下观察并拍照。

2.4 数据统计与分析

2.4.1 条带记录 从 80 对 SRAP 引物中筛选出 10 对条带清晰、多态性丰富、重复性好的引物。10 对引物针对某一同源带（同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带），有记作“1”，无记作“0”，只判读清晰易辨的扩增带，生成“0，1”二态性数据矩阵。对于多态性位点，将重复试验中能稳定重复出现的条带做统计分析。

2.4.2 数据分析 运用 POPGENE 1.32 软件进行遗传参数分析，运用 NTSYS 2.1 软件对川续断居群进行聚类分析，构建遗传聚类图。

3 结果与分析

3.1 川续断 SRAP-PCR 扩增结果

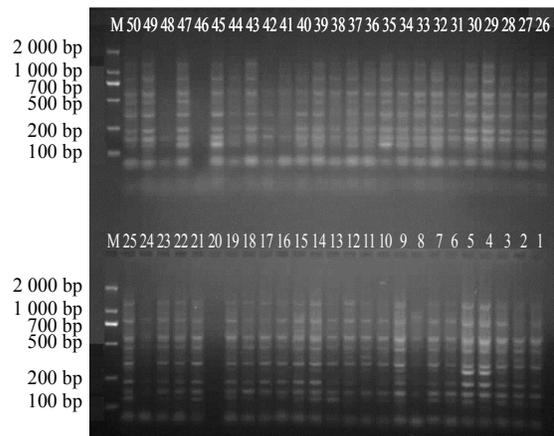
结果显示，10 对引物共扩增 124 个位点，每对引物最少扩增 9 个位点，最多扩增 15 个位点，平均每对引物扩增 12 个位点。扩增片段大小在 100~1 600 bp，见图 1、2。其中，多态性位点 102 个，多态性位点百分率(PPL)为 82.26%。引物 ME1EM8 和 ME1EM4 的 PPL 最高，ME3EM12 的 PPL 最低。见表 2。

3.2 川续断的遗传多样性与遗传变异水平

川续断在物种水平上的 PPL 达到 82.26%， H 为 0.280 0， I 为 0.435 3，显示出较高的遗传多样性水平。居群水平上川续断的 PPL 为 53.92%， H 在 0.121 2~0.244 0、 I 在 0.179 6~0.361 1，其中居群 1、4、5、10 和 13 的遗传多样性较高，居群的 I 值均达到 0.300 0 以上。而居群 2、6、7 和 12 的遗传多样性低。见表 3。

3.3 川续断的遗传多样性 Nei's 分析

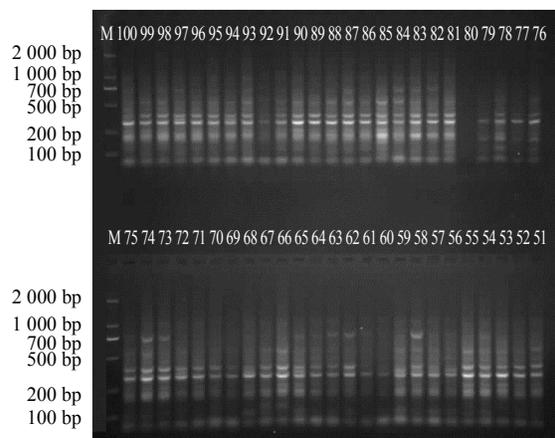
川续断总的基因多样性 (H_t) 为 0.280 0，川续断居群内和居群间基因多样性分别为 0.198 0



M-Marker, 1~50 依次为 1、2、3、4 及 5 居群的 10 个个体样本
M-Marker, 1—50 are samples of 1, 2, 3, 4, and 5, respectively

图 1 引物 ME3EM11 对川续断居群样品的 SRAP 扩增图

Fig. 1 SRAP electrophoresis of *D. asper* population samples amplified with Primer ME3EM11



M-Marker, 51~100 依次为居群 10~14 的 10 个个体样本
M-Marker, 51—100 are samples of 10—14, respectively

图 2 引物 ME1EM4 对川续断居群样品的 SRAP 扩增图

Fig. 2 SRAP electrophoresis of *D. asper* population samples amplified with Primer ME1EM4

和 0.082 0，分别占 H_t 的 70.70%、29.30%。居群间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.293 0，即有 29.30% 的遗传变异存在于居群间，70.70% 的遗传变异存在于居群内，显示川续断居群内的遗传变异大于居群间的遗传变异。川续断居群的平均基因流 (N_m) 为 1.206 4 > 1.0，表明各居群间的基因流水平较高。

3.4 川续断居群的 UPGMA 聚类

依据 Nei's 遗传相似度，以 NTSYS 2.1 软件构建的遗传聚类图显示，当遗传相似度为 0.88 时，川续断居群明显聚为 3 大类：居群 12 独立为 1 类；居

表 2 SRAP 引物组合的扩增结果及其多态性

Table 2 Amplification results and polymorphism of SRAP primer combinations

| 引物名称 | 正向序列 | 反向序列 | 总带数 | 多态性带数 | PPL / % |
|----------|-------------------|---------------------|-----|-------|---------|
| ME3EM16 | TGAGTCCAAACCGGAAT | GACTGCGTACGAATTAAC | 14 | 12 | 85.71 |
| ME3EM12 | TGAGTCCAAACCGGAAT | GACTGCGTACGAATTCAA | 12 | 7 | 58.33 |
| ME3EM11 | TGAGTCCAAACCGGAAT | GACTGCGTACGAATTCCGG | 15 | 12 | 80.00 |
| ME1EM12 | TGAGTCCAAACCGGATA | GACTGCGTACGAATTCAA | 10 | 8 | 80.00 |
| ME1EM16 | TGAGTCCAAACCGGATA | GACTGCGTACGAATTAAC | 14 | 12 | 85.71 |
| ME1EM8 | TGAGTCCAAACCGGATA | GACTGCGTACGAATTGCC | 13 | 13 | 100.00 |
| ME1EM4 | TGAGTCCAAACCGGATA | GACTGCGTACGAATTTGA | 12 | 12 | 100.00 |
| ME1EM2 | TGAGTCCAAACCGGATA | GACTGCGTACGAATTTGC | 12 | 8 | 66.67 |
| ME10EM17 | TGAGTCCAAACCGGTCT | GACTGCGTACGAATTGAC | 9 | 6 | 66.67 |
| ME10EM16 | TGAGTCCAAACCGGTCT | GACTGCGTACGAATTAAC | 13 | 12 | 92.31 |
| 合计 | — | — | 124 | 102 | 82.26 |

表 3 不同居群川续断遗传多样性比较分析

Table 3 Comparative analysis on genetic diversity in different *D. asper* populations

| 居群编号 | 多态位点数 | PPL / % | Na | Ne | H | I |
|------|-------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 78 | 62.90 | 1.629 0±0.485 0 | 1.401 4±0.398 4 | 0.227 7±0.210 1 | 0.336 3±0.295 3 |
| 2 | 60 | 48.39 | 1.483 9±0.501 8 | 1.307 7±0.380 9 | 0.176 7±0.204 8 | 0.261 9±0.292 9 |
| 3 | 60 | 48.39 | 1.483 9±0.501 8 | 1.336 0±0.393 9 | 0.189 9±0.212 4 | 0.277 7±0.303 2 |
| 4 | 82 | 66.13 | 1.661 3±0.475 2 | 1.471 6±0.394 9 | 0.265 2±0.209 5 | 0.386 4±0.296 1 |
| 5 | 73 | 58.87 | 1.588 7±0.494 1 | 1.381 5±0.401 9 | 0.215 8±0.211 0 | 0.318 6±0.297 5 |
| 6 | 42 | 33.87 | 1.338 7±0.475 2 | 1.214 6±0.360 4 | 0.121 2±0.190 4 | 0.179 6±0.272 0 |
| 7 | 58 | 46.77 | 1.467 7±0.501 0 | 1.287 8±0.381 5 | 0.164 1±0.203 6 | 0.243 9±0.289 5 |
| 8 | 66 | 53.23 | 1.532 3±0.501 0 | 1.359 3±0.396 4 | 0.203 1±0.213 1 | 0.297 8±0.302 8 |
| 9 | 66 | 53.23 | 1.532 3±0.501 0 | 1.335 3±0.394 6 | 0.190 3±0.208 9 | 0.281 9±0.295 6 |
| 10 | 82 | 66.13 | 1.661 3±0.475 2 | 1.422 1±0.377 2 | 0.244 0±0.202 9 | 0.361 1±0.287 6 |
| 11 | 72 | 58.06 | 1.580 6±0.495 5 | 1.340 2±0.392 8 | 0.194 8±0.205 3 | 0.291 5±0.288 8 |
| 12 | 56 | 45.16 | 1.451 6±0.499 7 | 1.284 7±0.373 5 | 0.164 0±0.201 6 | 0.243 5±0.289 3 |
| 13 | 78 | 62.90 | 1.629 0±0.485 0 | 1.413 7±0.396 2 | 0.234 8±0.209 8 | 0.345 9±0.295 8 |
| 14 | 63 | 50.81 | 1.508 1±0.502 0 | 1.314 2±0.384 2 | 0.179 9±0.205 8 | 0.267 2±0.292 6 |
| 平均 | 66 | 53.92 | 1.539 2±0.492 4 | 1.347 9±0.387 6 | 0.198 0±0.206 4 | 0.292 4±0.292 8 |
| 物种水平 | 102 | 82.26 | 1.822 6±0.142 1 | 1.452 4±0.310 1 | 0.280 0±0.150 8 | 0.435 3±0.192 5 |

群 13 和 14 聚为 1 类；其余居群则出现交叉聚类的关系，具体表现为：①位于贵州西部的居群 3、4、5 与东部的居群 2 聚为 1 类；②贵州中部的居群 8、9、11，西部的居群 1、10 和东部的居群 6 聚为 1 类，再与西部的居群 7 聚为 1 大类。见图 3。

4 讨论

川续断为多年生草本植物，分布较广。其雄蕊伸出花冠外，花药丁字着生，体现出异花和风媒授粉特征。Hamrick 等^[9]认为，寿命长、地理分布广、异交为主、风媒传粉、结实率高的物种大多有较高

的遗传多样性。依据 Nybom^[10]的研究，多年生、广布种在植物种群水平 *H* 和 *I* 的平均值分别为 0.25 和 0.22，若为双子叶植物，其居群水平的 *H* 的平均值为 0.19^[11]。本研究中川续断在物种水平上 PPL 为 82.26%，*H* 为 0.198 0、*I* 为 0.292 4，这与 Hamrick、Nybom 的研究结论相一致。由于实验的样本主要为贵州境内分布的居群，没有包括其他自然分布区，故川续断实际的遗传多样性指标应还要略高于本文数值。庞广昌等^[12]认为，物种居群间的遗传多样性水平越高，表明该物种适应的环境就越广。川续断

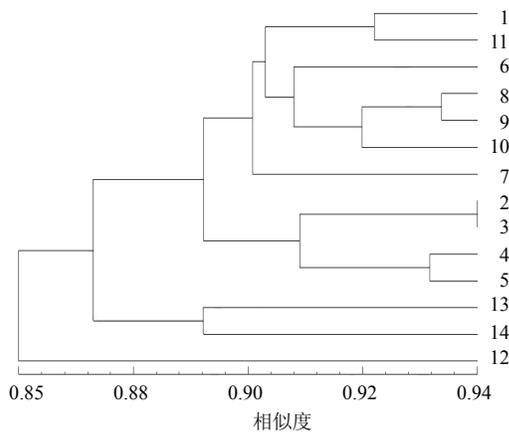


图 3 川续断居群的 UPGMA 聚类图
Fig. 3 Dendrogram of *D. asper* populations by UPGMA cluster analysis

来自中高海拔、喀斯特复杂地形、偏寒小生境中的 5 个居群 (1、4、5、10、13) 具有较高的遗传多样性, 其 PPL、*H* 和 *I* 值也高于地处低海拔、开阔河滩生境居群 6 的近 2 倍, 这种环境差异导致的遗传多样性结果, 体现了川续断对不同环境适应的一个广泛程度。如果对遗传多样性水平高的居群的每个基因位点进行 χ^2 检验, 并结合居群的环境差异, 可推断出基因和环境适应性的关系, 这对选择育种有一定的指导意义^[12]。笔者建议将上述这 5 个续断居群作为优良种质资源进行保存和关注。

川续断居群间的平均基因流 N_m 为 1.206 4, 提示居群间基因的交流比较顺利, 能够防止由遗传漂变引起的遗传分化, 有利于种群的稳定。但由于本实验样本仅限贵州境内, 故其 N_m 低于 Hamrick 总结的广布种植物的 N_m (1.881)^[13]。在植物中, 基因流会受花粉、种子的扩散和传播影响, 也受分布区地理隔离的影响。从川续断居群遗传聚类分组来看, 居群 13 与 14 同处在四川西南部, 彼此较近的地理距离与其遗传距离相一致; 居群 12 独立为一支, 推测是贵州的高原喀斯特地貌使生境片段化, 所形成的小生境可能对该居群川续断的基因交流产生一定的隔离影响。综合而言, 推测分布区的海拔和气候对川续断居群遗传多样性水平有较大影响, 而地理隔离 (小生境) 是造成居群内遗传变异增加的另一因素。

此外, 分析显示, 川续断的遗传变异主要存在于居群内, 说明居群内需要足够的个体差异方有利

于种群 (居群) 的稳定, 但这种变异水平一般不稳定, 是其不断适应生存环境产生的结果。这与本课题组另一项针对上述居群的川续断药材次生代谢物积累水平分析的结果吻合, 即居群内个体间的化学成分差异显著, 居群间化学成分与海拔有相关性。提示在制定川续断遗传资源的保育策略和良种选育时应重点关注那些变异较大的居群。

参考文献

[1] 中国药典 [S] 一部. 2010.
 [2] 卫莹芳, 刘永, 谢达温, 等. 不同产地续断的质量比较 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(2): 173-174.
 [3] 卫莹芳, 刘永, 王化东, 等. 全国不同产地续断中总生物碱的含量测定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(4): 559-561.
 [4] 李小侠, 陶正明, 吴志刚, 等. 采用 ISSR 和 SRAP 技术评价浙南忍冬属药材遗传多样性 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2030-2035.
 [5] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 96-100.
 [6] 魏宝阳, 曹亮, 李顺祥, 等. 吴茱萸遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2523-2528.
 [7] 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.
 [8] 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 Brassica [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2/3): 455-461.
 [9] Hamrick J L, Godt M J W. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [M]. Sunderland: Sinauer, 1990.
 [10] Nybom H D. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. *Mol Ecol*, 2004, 13: 1143-1155.
 [11] Nybom H, Igor V B. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspect Plant Ecol Evol Syst*, 2000, 3(2): 93-114.
 [12] 庞广昌, 姜冬梅. 群体遗传多样性和数据分析 [J]. 林业科学, 1995, 31(11): 543-549.
 [13] Hamrick J L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations [A] // Urbanska K. *Differentiation Patterns in Higher Plants* [C]. New York: Academic Press, 1987.