

基于 SRAP 分子标记的天麻遗传多样性研究

柴 钔^{1,2}, 刘红昌², 李金玲², 罗夫来², 王华磊², 黄明进², 罗春丽², 赵 致^{2*}

1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州省药用植物繁育与种植重点实验室, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 利用 SRAP 分子标记技术对天麻种质资源进行遗传多样性研究, 为天麻不同亲缘物种间的分类及其优良种质资源的筛选提供依据。**方法** 采集 7 个不同生态区域的天麻种质资源, 包括红杆 *G. elata* f. *elata*、乌杆 *G. elata* f. *glauca* 和绿杆 *G. elata* f. *viridis* 3 种变型和红乌杂交天麻, 共 24 份样品。运用 SRAP 分子标记方法构建天麻种质的 DNA 指纹图谱, 从分子水平检测其遗传多样性。**结果** 33 对引物扩增出 637 条多态性条带, 多态性百分率达 73.16%。24 份天麻种质样品间相似度分布于 0.404 0~0.908 0, 整个群体之间的相似程度差异较大。其中红天麻样品间的相似度在 0.906 6~0.996 4, 遗传差异较小; 乌天麻、杂交天麻和绿天麻样品间的相似度分别在 0.410 4~0.999 6、0.541 0~0.950 4 和 0.578 2, 遗传差异较大。AMOVA 分析结果显示, 天麻变型内变异大于变型间变异, 天麻各变型间有很大的遗传分化 ($F_{ST}=0.33$, $P<0.05$)。另外, 人工栽培对遗传分化有影响, 但不显著。**结论** SRAP 分子标记方法得到的 24 份天麻样品多态性丰富, 能有效地反映出天麻的遗传多样性。红杆天麻的遗传性状较为稳定, 与其他变型间缺乏基因交流, 遗传多样性匮乏; 其他 2 个变型具有较高的遗传多样性。

关键词: 天麻; SRAP; 变型; 遗传分化; DNA 指纹图谱; 遗传多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)20-2974-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.020

Genetic diversity of *Gastrodia elata* based on SRAP analysis

CHAI Kun^{1,2}, LIU Hong-chang², LI Jin-ling², LUO Fu-lai², WANG Hua-lei², HUANG Ming-jin², LUO Chun-li², ZHAO Zhi²

1. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Engineering Laboratory of Propagation and Cultivation on Traditional Chinese Medicinal Materials, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective In order to correctly identify the different germplasm resources of *Gastrodia elata* and gain the excellent germplasm resources, SRAP molecular marker was used to analyze the genetic diversity of *G. elata*. **Methods** *G. elata* was collected from seven different areas, which included 24 samples of *G. elata* f. *elata*, *G. elata* f. *glauca* and *G. elata* f. *viridis*, the DNA fingerprint of *G. elata* was constructed with SRAP molecular marker, and the genetic diversity was analyzed. **Results** Six hundred Thirty-seven belts were amplified by 33 primers pairs, and the polymorphic percentage was 73.16%. The range of genetic similarity coefficient was 0.404 0—0.908 0, the genetic similarity coefficient among *G. elata* f. *elata* was in the range of 0.906 6—0.996 4, and those of *G. elata* f. *glauca*, *G. elata* f. *viridis*, and hybrid was in the range of 0.410 4—0.999 6, 0.541 0—0.950 4 and 0.578 2, respectively. They showed small genetic differences. The analysis of molecular variance showed higher percentages of genetic variation within population than those among populations in all species. Populations showed higher genetic structure ($F_{ST}=0.33$, $P<0.05$). In addition, artificial cultivation had influence to the genetic differentiation, but not significantly. So in terms of different cultivation conditions so far had no significant impact on the genetic differentiation of *G. elata*. Mantel's test has been used to detect the correlation between genetic distance and geographic distance of all sorts of germplasm resources, the result had no significant correlation, and due to the limited number of samples, the result is not representative. **Conclusion** SRAP molecular marker method can more effectively reflect the genetic polymorphisms of *G. elata*. Compared with other two phenotypes, *G. elata* f. *elata* is more conservative and has lower genetic diversity. The other two variants have higher genetic diversity.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; SRAP; phenotype; genetic divergence; DNA fingerprint; genetic diversity

收稿日期: 2014-03-26

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAI13B04-03)

作者简介: 柴 钔 (1987—), 女, 在读硕士研究生, 遗传学。Tel: (0851)3859044 E-mail: chaikun_2008@126.com

*通信作者 赵 致 (1951—), 男, 教授, 研究方向为作物生理生态理论及其应用、药用植物代谢与药材质量控制。E-mail: zzhao@gzu.edu.cn

天麻 *Gastrodia elata* Bl. 为兰科 (Orchidaceae) 天麻属 *Gastrosia* R. Br. 植物的干燥块茎, 具息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的作用。用于治疗小儿惊风, 癫痫抽搐、破伤风、头痛眩晕、手足不遂、肢体麻木、风湿痹痛^[1]。作为入药的天麻, 主要有红杆天麻 *G. elata* Bl. f. *elata* S. Chow、绿天麻 *G. elata* Bl. f. *viridis* Malkino、乌杆天麻 *G. elata* Bl. f. *glauca* S. Chow 和黄天麻 *G. elata* Bl. f. *flavida* S. Chow 等 4 种变型^[2]。目前对于各变型是否能够稳定遗传尚有争议, 曾有少量报道关于野生天麻人工种植后下一代变型发生改变的现象^[3], 但据对大方和德江常年种植天麻的农户了解到栽种了十几年天麻还没有出现类似的情况。天麻中检测到的主要活性成分有天麻苷、香草醇、天麻苷元及其衍生物等^[4], 其中天麻素量最高, 故被用于作为评估天麻质量优劣的指标。各变型的化学成分基本相同但质量分数却有所差异^[5], 其中乌杆天麻和绿天麻的天麻素量最高, 其次是红杆天麻, 黄天麻不稳定^[6]。不同变型在产量和质量上也有差异, 天麻的 4 种变型中, 乌杆天麻和绿天麻为椭圆形, 黄天麻和红杆天麻为长椭圆形或三角形。红杆天麻和乌、绿天麻相比种麻有较强的分生能力, 每穴产量高, 但外形和折干率较差^[7]。然而天麻种子不能靠外形来正确判断是属于哪种变型的天麻, 在栽种时不能保证种子的质量, 种源比较混乱, 导致产量和质量不稳定。作为药用的天麻, 药材质量稳定是关键, 劣质天麻或达不到《中国药典》标准的天麻不但没有药用价值, 也会存在医疗隐患; 同时过大剂量食用天麻也会出现药用反应^[9], 因此用药时也需要限定相应的剂量标准, 而单一来源的天麻是药用规范的保证。因此, 天麻优良种源的筛选工作是很必要的。传统的育种主要依赖于植株的表现型选择, 但环境条件、基因间互作、基因型与环境互作等多种因素会影响表型选择效率。以 DNA 多态性为基础的分子标记, 目前已在作物遗传图谱构建^[9-10]、重要农艺性状基因的标记定位^[10-12]、种质资源的遗传多样性分析^[13-14]与品种指纹图谱及纯度鉴定^[15-16]等方面得到广泛的应用, 尤其是分子标记辅助选择育种备受遗传育种工作者的重视^[17-19]。

SRAP 分子标记技术^[20]主要针对基因组中的开放阅读框 (ORFs) 进行多态性扩增, 相对于其他分子标记具有重复性高、扩增出的片段可用于基因的定位与克隆等优点。本研究旨在采用 SRAP 分子标记技术, 对收集自四川、贵州、云南等不同生态条

件下的天麻种质资源进行遗传多样性分析与评价, 探讨不同种内变型的各天麻种质资源的遗传分化程度, 并对不同栽培环境对天麻遗传分化是否造成影响进行了分析, 从而为天麻优良种源的筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

PCR 反应试剂 (10×缓冲液, dNTPs, Mg^{2+} , Taq 酶) 购自 Takara 生物公司, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, DNA Marker (DL2000) 购自 Takara 生物公司。40% 丙烯酰胺溶液购自上海生工, 琼脂糖凝胶 (HyAgarose), 天麻 DNA 提取试剂盒 (新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP230) 购自 TIANGEN 公司。

C1000TM PCR 仪 (BIO-RAD 公司), Eppendorf 移液器, DYCZ-22A 水平电泳槽 (北京六一有限公司), DYCZ-24A 垂直电泳槽 (北京六一有限公司), 离心机 (Thermo 公司), -80 °C 超低温冰箱 (Thermo 公司), 制冰机 (SANYO 公司), 酶标仪 (Thermo 公司), 凝胶成像仪 (BIO-RAD 公司)。天麻种质来源及详细信息见表 1, 经贵州大学农学院罗夫来教授鉴定。

1.2 方法

1.2.1 天麻 DNA 提取及纯度检测 取幼年期天麻或成年期天麻抽茎后茎尖幼嫩部位 50~100 mg, 加液氮充分研磨成粉状, 使用 TIANGEN DNAsecure Plant Kit 试剂盒提取。用 0.8% 琼脂糖凝胶对提取的总 DNA 进行电泳, 检测其浓度, 用紫外分光光度计检测其纯度。

1.2.2 SRAP 分子标记引物组合筛选 自由组合 11 个上游引物和 12 个下游引物 (表 2), 得到 132 对引物, 筛选 SRAP 分子标记原始引物, 初始反应扩增体系 10 μ L: 1.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.5 U Taq DNA 聚合酶、0.05 mmol/L dNTPs、0.25 μ mol/L 引物、30 ng DNA 模板。反应程序参考 Li 等^[20]的反应程序。扩增后经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳筛选出条带丰富且清晰的条带。将用于 PCR 扩增的天麻 DNA 模板的浓度稀释至 10 ng/ μ L, 用于 SRAP 实验。

1.2.3 SRAP 反应体系优化 为了确定 PCR 反应体系 (10 μ L) 中模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs、TaqDNA 聚合酶 5 个因素的适宜水平, 采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 进行 5 因素 4 水平试验, 3 次重复, 各因素水平见表 3。

表 1 天麻样本信息

Table 1 Samples of information *G. elata*

编号	样品来源	类型	栽培方式	编号	样品来源	类型	栽培方式
1	安徽霍山	红杆	人工栽培	13	四川荣经 2	乌杆	仿野生栽培
2	四川平武	红杆	仿野生栽培	14	四川马边	乌杆	仿野生栽培
3	四川青川	红杆	仿野生栽培	15	四川平武	乌杆	仿野生栽培
4	四川荣经 1	红杆	仿野生栽培	16	四川峨边山市	乌杆	野生
5	贵州德江	红杆	仿野生栽培	17	四川青川	乌杆	野生
6	贵州大方 1	红杆	仿野生栽培	18	云南昭通	乌杆	仿野生栽培
7	湖南溆浦	红杆	野生	19	四川平武	红乌杂交	人工栽培
8	湖北宜昌 1	红杆	仿野生栽培	20	湖南溆浦	红乌杂交	人工栽培
9	陕西略阳	红杆	人工栽培	21	湖北宜昌 2	红乌杂交	人工栽培
10	山东海阳	红杆	人工栽培	22	湖北宜昌 3	红乌杂交	人工栽培
11	湖南溆浦	乌杆	野生	23	贵州大方 2	绿杆	仿野生栽培
12	湖南绥宁	乌杆	野生	24	云南昭通	绿杆	仿野生栽培

表 2 SRAP-PCR 所用引物

Table 2 Primers for SRAP-PCR

引物编号	正向引物	引物编号	反向引物
F1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	R1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
F2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	R2	5'-GACTGCGTACGAATTGTC-3'
F3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	R3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
F4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	R4	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
F5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	R5	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
F6	5'-TGAGTCCAAACCGGATG-3'	R6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
F7	5'-TGAGTCCAAACCGGAGG-3'	R7	5'-GACTGCGTACGAATTGAT-3'
F8	5'-TAGGTCCAAACCGGCAC-3'	R8	5'-GACTGCGTACGAATTGGC-3'
F9	5'-TGAGTCCAAACCGGAGT-3'	R9	5'-GACTGCGTACGAATTGTA-3'
F10	5'-TAGGTCCAAACCGGGTC-3'	R10	5'-GACTGCGTACGAATTTAA-3'
F11	5'-TAGGTCCAAACCGGCGC-3'	R11	5'-GACTGCGTACGAATTGTT-3'
		R12	5'-GACTGCGTACGAATTAC-3'

表 3 SRAP 反应体系优化各因素水平

Table 3 Factors and levels of SRAP-PCR reaction system

水平	因素				
	TaqDNA 聚合酶 / U	Mg ²⁺ 浓度 / (mmol·L ⁻¹)	DNA 模 板 / ng	dNTPs 浓度 / (mmol·L ⁻¹)	引物浓度 / (μmol·L ⁻¹)
1	0.25	0.5	10	0.05	0.25
2	0.5	1.0	20	0.10	0.50
3	1.0	1.5	30	0.25	0.75
4	1.5	2.0	40	0.5	1.00

1.2.4 电泳及银染 用 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶对扩增产物进行电泳检测, 电压 (V) = 150 V, 功率 (W) = 4 W, 缓冲液为 0.5×TBE, 电泳时间 2 h。银染步骤: 固定 (10% 乙醇 + 5% 冰醋酸溶液)

10 min → 水洗 2 min, 洗 3 次 → 银染染色 (100 mL 0.2% AgNO₃ + 50 μL 37% 甲醛) 20~30 min → 水洗 20 s, 洗 2 次 → 显色 (100 mL 1.5% NaOH + 500 μL 甲醛) 2~4 min → 水洗终止显色 → 凝胶成像系统照相保存。

1.3 数据处理

根据筛选的引物对所有样本进行扩增。SRAP 标记每条带记录为 1 个位点, 以有带记为 “1”, 无带记为 “0”, 形成 0/1 矩阵。数据统计利用 NTSYS-pc2.1 软件计算 Nei's 的遗传距离 (D)、遗传一致度, 并进行非加权算术平均聚类 (UPGMA) 分析。结合 DCFA 和 Arlequin ver3.1 软件进行 AMOVA 分析, 计算居群内、居群间的遗传分化所

占的比例。结合 DCFA 和 popgene32 软件计算多态位点百分率 (PPB)、Shannon's 信息指数 (I)、Nei's 基因多样性 (H_e)、总的遗传多样性 (H_t)、居群内的平均遗传多样性 (H_s)、居群间的平均遗传多样性 (D_{st})、遗传分化系数 (G_{st}/H_t) 和基因流 (N_m)。

2 结果与分析

2.1 天麻基因组 DNA 提取结果

采用 TIANGEN 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP230) 提取天麻基因组 DNA, A_{260}/A_{280} 值为 1.7~2.2, 适宜进行下游的 SRAP 标记实验。电泳结果见图 1。

2.2 SRAP 引物筛选结果

对 11 条上游引物和 12 条下游引物进行自由组

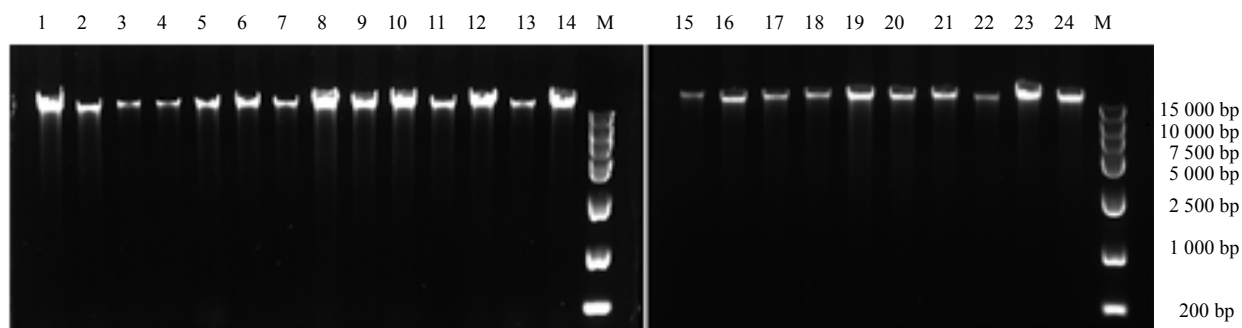
合, 得到 132 对引物, 选择扩增条带数不少于 5 条且条带清晰的引物组合, 最终得到 42 对供试引物组合 (表 4)。

2.3 SRAP 反应体系优化结果

优化后的 PCR 反应体系 (10 μ L 体系): 10 $\times$ 缓冲液 1 μ L, dNTPs 0.4 μ L, $MgCl_2$ 0.8 μ L, DNA 模板 1 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 各 0.25 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.1 μ L, ddH₂O 6.2 μ L。该体系扩增条带数最多, 最清晰, 且没有引物二聚体 (图 2)。

2.4 PCR 反应产物的电泳检测结果

从 42 对引物中筛选得到条带清晰、多态性丰富的电泳胶图共 33 张。图 3 中显示出 2 对引物的电泳凝胶图情况。



M-Marker 标序号同表 1, 下同

M-Marker figures corresponding to Table 1, same as below

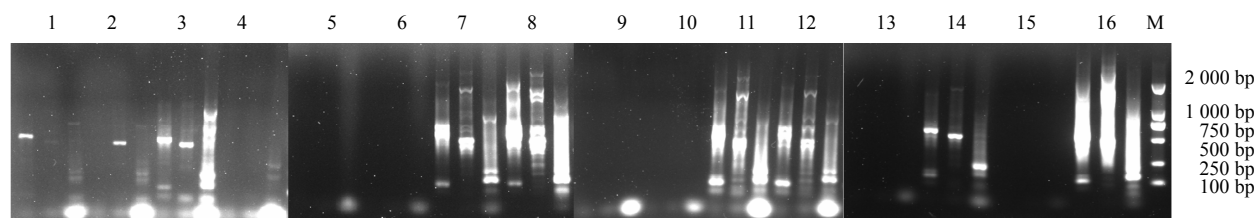
图 1 天麻基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *G. elata* genome DNA

表 4 SRAP-PCR 引物组合

Table 4 Primers for SRAP-PCR

引物组合		引物组合		引物组合		引物组合		引物组合		引物组合	
上游	下游	上游	下游	上游	下游	上游	下游	上游	下游	上游	下游
F1	R4	F2	R7	F4	R1	F5	R9	F6	R4	F8	R5
F1	R5	F3	R11	F4	R8	F5	R10	F6	R8	F8	R8
F1	R9	F3	R12	F4	R11	F5	R11	F6	R11	F8	R9
F1	R11	F3	R1	F5	R1	F5	R12	F6	R12	F8	R10
F2	R4	F3	R3	F5	R7	F6	R2	F7	R3	F9	R1
F2	R5	F3	R5	F5	R8	F6	R3	F7	R12	F9	R12
										F11	R9



1~16 分别是 16 组正交水平, 每组用 3 对引物分别 3 个重复 M-Marker

1—16-orthogonal levels in 16 groups, each group of three repetition and three primers respectively M-Marker

图 2 PCR 体系优化琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR system optimization

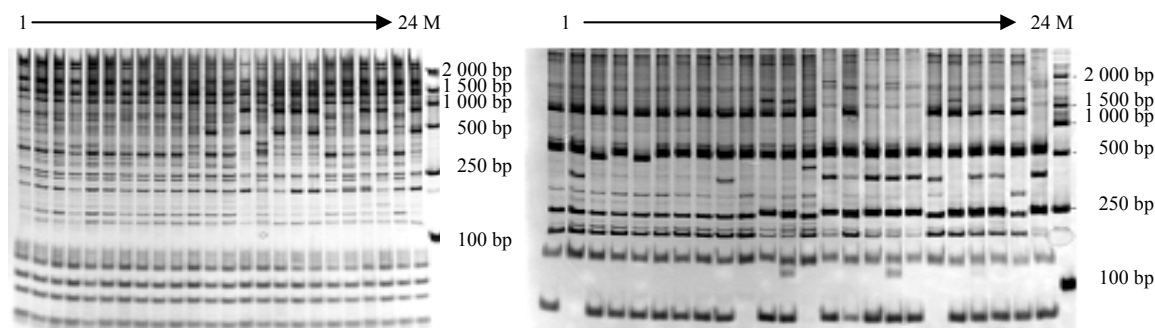


图3 引物组合 F10R11 和 F6R12 的 PAGE 凝胶电泳图

Fig. 3 PAGE gel electrophoresis figure for primers combination of F6R12 and F10R11

2.5 24个天麻种质资源的遗传结构分析

2.5.1 天麻群体内与群体间的遗传差异分析 将原始“0/1 矩阵”由 DCFA 软件生成“欧式距离平方系数”，采用 Arlequin ver3.1 软件对天麻样本分别从不同变型和不同栽培条件两方面进行 AMOVA 分析，所得结果显示，天麻不同变型内的变异率 (66.51%) 大于变型间变异率 (33.49%)，固定系数 $F_{ST}=0.33$ ($P<0.05$)，说明天麻各变型间有很大的遗传分化 ($F_{ST}>0.25$)，其中红杆天麻对产生遗传分化的贡献最大 ($F_{ST}=0.418\ 37$)，分化程度最高，其次是杂交天麻、乌杆天麻和绿天麻的分化程度相似。

不同栽培条件下，虽然变型内的变异较大，占总变异的 93.97%，特别是人工栽培的天麻对变异的贡献最大 ($F_{ST}=0.103\ 90$)，但变异不显著，因此从本实验材料中分析发现，到目前为止，不同栽培条件下尚未影响天麻在遗传上的变异。

2.5.2 天麻变型间的遗传分化 将原始“0/1 矩阵”由 DCFA 软件处理成符合 POPGENE 软件分析的数据类型，采用 Nei's 无偏遗传距离估算群体间的遗传分化，计算群体间平均遗传距离和群体间遗传一致度，在 3 个天麻变型和杂交天麻中，乌和绿天麻的遗传一致度最高 (0.967 5)，遗传距离最小 (0.033 1)；红杆天麻和乌杆天麻、红杆天麻和绿杆天麻之间的遗传一致度相似，分别为 0.800 2 和 0.825 9。说明乌杆天麻和绿天麻之间的基因交流高于和红杆天麻之间的基因交流。其次红乌杂交和红杆天麻间遗传距离为 0.080 8；杂交天麻和乌杆天麻、绿杆天麻间的遗传距离相近，分别为 0.156 3 和 0.144 2。见表 5。

2.5.3 天麻不同变型的遗传多样性 用 DCFA 和

表5 天麻3种变型及杂交天麻的 Nei's 遗传一致度及遗传距离

Table 5 Nei's genetic identity and genetic distance among four populations of *G. elata*

类型	红杆天麻	乌杆天麻	红×乌杆天麻	绿天麻
红杆天麻	****	0.800 2	0.922 4	0.825 9
乌杆天麻	0.222 9	****	0.855 3	0.967 5
红×乌杆天麻	0.080 8	0.156 3	****	0.865 7
绿天麻	0.191 3	0.033 1	0.144 2	****

斜线上方的数据表示群体间的遗传一致度；斜线下方的数据表示群体间的遗传距离

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

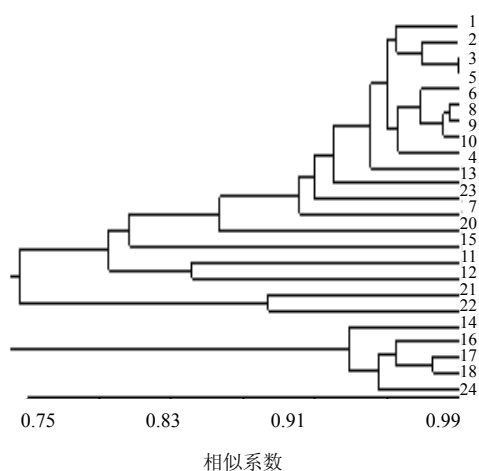
POPGENE 软件分析，筛选出的 42 对 SRAP 引物对 3 个天麻变型和红乌杂交麻群体共 24 个种质资源进行 PCR，共扩增出 637 条清晰度高、重复性好的条带，其中多态性条带 466 条，多态位点百分率为 73.16%。各变型的多态位点百分比依次为红杆天麻 (17.74%) < 红乌杂交麻 (33.44%) < 绿天麻 (48.68%) < 乌杆天麻 (64.05%)。4 个天麻变型的 H_e 、 I 、 A_e 是衡量群体间遗传多样性的重要参数，在这 4 个群体中，乌杆天麻变型的遗传多样性最高，而红杆天麻变型的遗传多样性最低。利用 G_{st} 对各群体进行遗传结构分析， G_{st} 结果为 0.351 3，表明在总的遗传变异中，35.13% 的变异存在于居群间，64.87% 的变异存在居群内，和 MOAVE 分析结果一致。不同天麻变型间的基因流为 0.923 4。具体结果见表 6。

2.6 天麻各种质资源的聚类结果与分析

运用 NTSYS-pc2.1 软件对凝胶电泳图中的条带数据进行聚类分析，得到 UPGMA 天麻聚类图 (图 4)。

表 6 天麻 3 种变型及杂交天麻的遗传多样性
Table 6 Genetic diversity of four populations of *G. elata*

类型	A_e	H_e	I	$PPL / \%$	G_{st}	N_m
红杆天麻	$1.086\ 8 \pm 0.238\ 8$	$0.051\ 2 \pm 0.131\ 3$	$0.078\ 7 \pm 0.191\ 0$	17.74		
乌杆天麻	$1.393\ 6 \pm 0.368\ 6$	$0.230\ 3 \pm 0.199\ 4$	$0.343\ 3 \pm 0.284\ 0$	64.05		
红×乌杆天麻	$1.221\ 0 \pm 0.352\ 3$	$0.126\ 8 \pm 0.190\ 2$	$0.187\ 5 \pm 0.274\ 4$	33.44		
绿天麻	$1.344\ 1 \pm 0.353\ 7$	$0.201\ 6 \pm 0.207\ 2$	$0.294\ 3 \pm 0.302\ 5$	48.68		
物种水平	$1.372\ 0 \pm 0.351\ 5$	$0.223\ 4 \pm 0.189\ 2$	$0.340\ 2 \pm 0.266\ 7$	73.16	0.351 3	0.923 4



图中数字同表 1

Figures corresponding to Table 1

图 4 24 份天麻材料 UPGMA 图

Fig. 4 UPGMA dendrogram of 24 samples of *G. elata*

当相似性系数达到 77% 时, 可以将 24 份天麻种质资源分为 3 类, 第一类包括来自安徽霍山、四川平武、青川、荣经 1, 贵州德江、大方 1, 湖北宜昌 1、陕西略阳, 山东海阳和湖南溆浦的红杆天麻; 四川平武和湖南溆浦的红乌杂交天麻; 贵州大方 2 的绿杆天麻; 四川荣经 2 和平武, 湖南溆浦和绥宁的乌杆天麻。第二类包括来自湖北宜昌的两份红乌杂交天麻种质。第三类包括四川马边、峨嵋山、青川的乌杆天麻, 云南昭通的乌杆天麻和绿天麻。24 份天麻样品间遗传相似程度在 0.908 0~0.404 0, 3 号四川青川和 5 号贵州德江的红杆天麻遗传相似度最高, 为 0.908 0。6 号贵州大方红杆和 14 号四川马边乌杆遗传相似度最小, 为 0.404 0。SRAP 分析得到的 24 个样本除红杆天麻全聚为一类外, 其他 2 种变型以及红乌杂交天麻在 3 类中均有分布。表明红杆天麻相对于其他 2 种变型在遗传上较为稳定。

利用 TFGA 软件中的 mentel 分析, 对 24 个样品的遗传距离和采得地之间的直线距离进行了相关性分析, 发现 r 值为 -0.005 2, p 值为 0.556 0, 所得结果遗

传距离和地理距离没有明显的相关性, 由于样本数量过小, 并不能反映出总体中的相关性程度, 这和目前天麻的种植资源比较混杂, 群体数量有限有关 (图 5)。

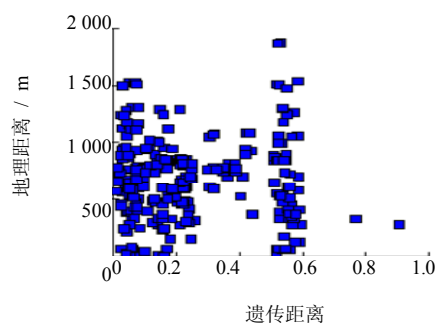


图 5 天麻遗传距离与地理距离 Mantel 检验图

Fig. 5 Mantel's test between genetic and geographic distances

3 讨论

3.1 天麻变型和遗传的关系

随着分子标记应用于中药资源鉴定越来越普遍^[21-23], 有关天麻多态性研究的相关报道也日益增多。目前, 对天麻的分子标记方法主要有 AFLP^[24-25]、ISSR^[26]、ITS 序列分析^[27]等, 其中王德信等^[27]利用 ITS 方法鉴定了黄、绿、乌三种变型天麻的亲缘关系, 研究结果认为乌杆天麻相对于黄、绿天麻而言是更古老的类型, 绿天麻是较为进化的类型, 黄、绿天麻是由乌杆天麻进化而来。关萍等^[24]分别利用 ISSR 和 AFLP 分子标记方法对天麻的多态性进行了分析, 其中在陈祖云等^[26]研究中提出野生和栽培天麻出现较大遗传差异, 红杆天麻和黄天麻的变异程度小于乌杆天麻和绿天麻。现有报道对天麻各种变型出现的原因观点不统一, 关萍等^[24]认为出现的原因只是环境修饰的结果, 与遗传没有较大关系, 其依据是天麻各变型之间的遗传距离并不远, 同一区域的遗传距离差异反而更明显。也有研究者提出天麻的变型和遗传有关系^[28], 并且是在长期进化过程中发生突变产生^[29]。本实验的研

究结果更偏向后者的观点,即天麻的变型是遗传和外界环境相互作用的结果。在对24份天麻样品的聚类分析中,遗传相似系数在77%时,来自于5个省的17份样品被聚到同一类,而这5个省的气候、海拔等环境因素均不相同,虽然包含绿、红、乌不同变型,但并不能由此说明,变型的出现只和环境有关系,而和遗传无关。

另外,供试的2份绿杆天麻材料,它们的相似系数只有42.18%,同一变型的遗传距离差距如此远,值得深入研究。天麻变型之间的颜色可能受单基因控制,遗传相似度低的天麻都有在这些基因位点发生突变的可能,所以也能表现出同种表现型之间的遗传距离出现较大差异。

3.2 不同栽培环境对天麻遗传多样性的影响

天麻质量除了和种质资源有关系外,还与菌株种类、萌发菌种类、蜜环菌质量、光照、温度以及水分有关^[30],因此环境因子对天麻的生长也起到约束作用。在本实验中,对分别来自野生、人工栽培和林下仿野生栽培3种不同栽培条件下的24份种质资源分成3个群体,探讨不同栽培条件对天麻的遗传多样性是否产生影响,对3个生长环境下的群体进行AMOVA分析,发现群内的变异占总变异的93.97%,大于群间变异。其中人工栽培条件对天麻产生变异的贡献最大($F_{ST}=0.103\ 90$),但变异不显著,因此就目前分析的天麻材料而言,不同的栽培条件还没有导致天麻发生遗传上的变异,但不难发现长期进行人工选育会导致遗传分化增大的趋势,因此在育种工作者培育杂交天麻种子的同时,也需要注重丰富亲本资源种质的遗传资源多样性。

3.3 天麻的遗传结构和多样性

通过构建UPGMA聚类图,天麻的24个样品没有完全按天麻变型聚为一类,其中红杆天麻的所有样品均在0.9的相似度以内,分化程度较高。其他3个群体分析中,变型间有的遗传相似度很高,变型内有的相似度很低。为了进一步分析不同外界条件和不同变型对天麻遗传多样性的影响规律,通过POPGENE和Arlequin软件对样品的遗传结构进行分析,AMOVA分析后发现,变型间的遗传分化很大,变型内变异大于变型间的变异。其中各变型间的特殊固定系数(special F_{ST} index)体现出各变型的分化程度,大小依次为红杆天麻>杂交麻>绿、乌杆天麻。另外,各变型的多态性百分数也得到相同的结果,即红杆天麻的遗传多样性最小,与其他变型间没有太

多的基因交流,遗传物质较固定。产生这种差异的原因可能在于,红杆天麻长期的人工驯化或者不同地方红杆天麻相互引种使不同种质频繁杂交导致各地方的红杆天麻种质资源逐渐失去遗传多样性,引起红杆天麻在遗传进化中出现瓶颈效应。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 周 铨.当今药市上的各种天麻[M].北京:中国科学院药用植物研究所,2013.
- [3] 徐锦堂.中国天麻栽培学[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993.
- [4] 房 超,李跃进.应用SRAP分子标记构建茄子遗传图谱初探[J].西南农业学报,2010,28(5):1591-1594.
- [5] 杨世林,兰 进,徐锦堂.天麻的研究进展[J].中草药,2000,31(1):66-69.
- [6] 刘小琴,汪鋈植,袁 琴.天麻不同品种及不同组织中天麻素的含量比较[J].时珍国医国药,2009,20(4):908-909.
- [7] 刘明学,李琼芳,李 梁.平武天麻 GAP 基地三种天麻变异类型质量评价[J].现代中药研究与实践,2009,23(5):3-5.
- [8] 李德勋,陈 桂,等.天麻不同变异类型药材中天麻素含量比较[J].现代中药研究与实践,2007,22(3):23-24.
- [9] Chen W, Zhang Y. Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (*Brassica napus*) using DH and immortalized F2 populations[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 849-858.
- [10] Lu Y Q, Wu W R. Identification of salt-responsive genes in English cordgrass (*Spartina anglica*) roots using SRAP technique[J]. *J Zhejiang Univ*, 2006, 32(5): 511-514.
- [11] 栾 丽.同源四倍体水稻三系亲本的遗传差异、细胞遗传学比较研究及低直链淀粉含量突变体 Wx 基因序列分析[D].成都:中科院研究生院,2007.
- [12] 邓传良,曹 莹.菠菜性别相关SRAP分子标记的筛选及分析[J].基因组学与应用生物学,2013,32(4):516-521.
- [13] 胡 秀,刘 念.中国姜花属基于SRAP分子标记的聚类分析[J].植物分类学报,2008,46(6):899-905.
- [14] 刘雅辉,刘大群.23个小麦抗叶锈近等基因系SRAP多态性[J].中国农业科学,2008,41(5):1333-1340.
- [15] 王世峰,王 军.斜带髯鲃野生与养殖群体遗传结构的ISSR分析[J].海洋学报,2007,29(4):105-110.
- [16] 段艳凤,金黎平.中国88个马铃薯审定品种SSR指纹图谱构建与遗传多样性分析[J].作物学报,2009,35(8):1451-1457.

- [17] Aneja B, Neelam R, Chawla V, *et al.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement [J]. *Mol Breed*, 2012, 30: 1635-1648.
- [18] 陈名红, 李 玉. 分子标记技术在药用植物研究中的应用前景 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39(2): 19-22.
- [19] Mutlu N, Abak K. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant [J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 1303-1312.
- [20] 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 Genetics*, 2001, 103: 455-461.
- [21] Ku C, Chung W C. The Complete Plastid genome sequence of madagascar Periwinkle *catharanthus roseus* (L.) G. Don: plastid genome evolution, molecular marker identification, and phylogenetic implications in asterids [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e6858.
- [22] 尹海波, 王吉华, 涂秀文, 等. 不同产地老鹳草遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3206-3211.
- [23] 阳 翠, 刘 萍, 刘姣蓉, 等. 苦豆子 ISSR 标记的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1323-1327.
- [24] 关 萍, 石建明. 不同分布区天麻的 AFLP 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1): 66-73.
- [25] 谢 渊, 张小蕾. AFLP 技术在天麻遗传变异研究中的初步应用 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 141-144.
- [26] 陈祖云, 王晓丽. 贵州天麻遗传多态性的 ISSR 初步分析 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(7): 436-439.
- [27] 王德信. 天麻 ITS 序列分析及变异类型鉴定 [J]. 生物技术, 2010, 20(6): 33-35.
- [28] 李作洲, 暴朝霞, 黄宏文. 药用植物天麻 (*Gastrodia elata* Bl.) 的等位酶遗传变异及其变型间的遗传关系 [J]. 植物科学学报, 2011, 29(1): 64-73.
- [29] 王德信. 天麻 ITS-1 测序及单核苷酸多态性变异位点分析 [J]. 生物技术, 2012, 22(5): 48-51.
- [30] 徐锦堂. 家栽天麻与野生天麻质量比较 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 511-513.