

鼠尾草属部分物种 AFLP 指纹图谱构建及遗传多样性分析

邓科君¹, 张 勇¹, 鄢 丹², 彭金华¹, 张 硕¹, 任正隆¹

(¹电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054; ²中国人民解放军第三〇二医院全军中药研究所, 北京 100039)

摘要: 为了建立适用于鼠尾草属植物的 AFLP 技术体系, 并对鼠尾草属部分物种遗传多样性进行分析。作者经筛选得到 24 对有效 AFLP 引物组合, 共检测 1616 个有效扩增位点; 其中 22 对 AFLP 引物组合针对不同材料可检测到特异性扩增位点, 每对引物检测强度从 1 到 16 个位点不等; 依据 AFLP 数据计算的 22 个鼠尾草属植物材料间 231 个配对遗传相似系数介于 0.5677~0.9898, 显示了丰富的遗传多样性; 系统树显示 AFLP 分析可以将 11 个鼠尾草属植物准确区分, 其中种内不同居群的材料可有效聚为亚组, 说明本文所构建的 AFLP 技术体系能够有效应用于鼠尾草属植物种间及种内鉴定、遗传多样性分析及系统发育研究中。

关键词: 鼠尾草属; 遗传多样性; AFLP

Construction of AFLP Fingerprint and Genetic Diversity Analysis of the Genus *Salvia*

DENG Ke-jun¹, ZHANG Yong¹, YAN Dan², PENG Jin-hua¹, ZHANG Shuo¹, REN Zheng-long¹

(¹ School of Life Sciences and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054;

² Institute of Traditional Chinese Medicine, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039)

Abstract: To establish the AFLP fingerprinting system of good reproducibility and high distinguishability. The genetic diversity in the plants from the genus *Salvia* was analyzed by using AFLP. The 24 selected amplification primer combinations produced a total of 1616 amplified fragments and 1 to 16 special amplified fragments were obtained, according to different primer combinations used. The coefficient of gene similarity ranged from 0.5677 to 0.9898 between species. This wide distribution indicated that the genetic diversity of *Salvia* was plentiful. The cluster map including all samples was obtained by UPGMA method. Based on the results of AFLP, all samples could be classified into 11 clusters, which were consistent with the *Salvia*'s taxonomy, and each sample could be correctly identified. The results indicated that the AFLP fingerprinting analysis system could be used effectively to identify the species, analyse the genetic diversity and system evolution of the genus *Salvia*.

Key words: *Salvia*; Genetic diversity; AFLP

鼠尾草属植物(*Salvia*)全世界约存 1000 余种, 广泛分布于热带和温带地, 我国有 83 种, 分布于全国各地, 西南为最多^[1]。该属植物花色鲜艳丰富, 富含挥发油类、二萜类和酚酸类成分, 是重要的绿化植物资源、芳香植物资源、食物添加剂和传统药用植物。

国内外对鼠尾草属植物的研究近年来均集中在形态分类、化学成分以及药理药效等方面^[2-4]。近年来, 针对鼠尾草属植物丹参, 研究者应用不同的分子标记体系开展了遗传多样性分析及种质分类鉴定等研究工作^[5-10]。但对于鼠尾草属内的分子系统研究, 则多限于通过对叶绿体基因组 psbA、trnL-F 序

收稿日期: 2009-04-21

修回日期: 2010-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(30670211, 30701087); 国家博士后科学基金(20070411158); 电子科技大学青年基金

作者简介: 邓科君, 博士研究生, 讲师, 从事药用植物分子遗传学研究。E-mail: dengkj@uestc.edu.cn

通讯作者: 张勇, E-mail: zhangyong916@uestc.edu.cn; 任正隆, 教授, 博导, E-mail: renzl@uestc.edu.cn

列^[11]、核基因组 rDNA ITS 序列^[5]进行测序,进而依据序列信息进行分子系统学分析。但此类研究实质上是检测位点的序列多样性代替了物种多样性,由于测定序列的分子进化速率可能与物种水平上的进化速率存在一定差异,因此,基于全基因组水平多态位点检测的结果更具代表性。

本文以引自美国植物种质资源中心及我国的鼠尾草属部分物种材料为代表,建立了适用于鼠尾草属植物基因组多态性位点检测的稳定且高效的 AFLP 分析体系,并构建了高分辨率指纹图谱,在此基础上对实验材料遗传多样性进行了分析,从全基因组水平比较鼠尾草属植物基因组组成及遗传结构差异,为更

好开发利用鼠尾草属植物资源奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以鼠尾草属 11 个物种为实验材料,其中*S. azurea* var. *grandiflora* 源自美国 3 个不同地理居群,*S. sclarea* 源自欧洲 2 个不同地理居群,*S. tesquicola* 源自俄罗斯和前苏联 2 个不同地理居群,*S. scapiformia* 源自我国四川峨嵋 2 个不同居群,*S. miltiorrhiza* 源自我国四川中江 7 个不同地理居群,其余样本均由独立居群构成。凭证标本存于电子科技大学生命科学与技术学院分子细胞研究室,具体信息详见表 1。

表 1 用于 AFLP 分析的鼠尾草属植物
Table 1 Description of species from the genus *Salvia* used in AFLP analysis

序号 Code	物种 Species	来源 Origin	序号 Code	物种 Species	来源地 Origin
1	<i>S. azurea</i> var. <i>grandiflora</i> -1	美国密苏里州	12	<i>S. substolonifer</i>	中国四川
2	<i>S. azurea</i> var. <i>grandiflora</i> -2	美国堪萨斯州	13	<i>S. splendens</i>	中国四川
3	<i>S. azurea</i> var. <i>grandiflora</i> -3	美国爱德华州	14	<i>S. scapiformia</i> -1	中国四川
4	<i>S. sclarea</i> -1	南斯拉夫	15	<i>S. scapiformia</i> -2	中国四川
5	<i>S. sclarea</i> -2	阿富汗	16	<i>S. miltiorrhiza</i> -1	中国四川
6	<i>S. tesquicola</i> -1	前苏联	17	<i>S. miltiorrhiza</i> -2	中国四川
7	<i>S. tesquicola</i> -2	俄罗斯	18	<i>S. miltiorrhiza</i> -3	中国四川
8	<i>S. verbenaca</i>	西班牙	19	<i>S. miltiorrhiza</i> -4	中国四川
9	<i>S. viridis</i>	南斯拉夫	20	<i>S. miltiorrhiza</i> -5	中国四川
10	<i>S. officinalis</i>	意大利巴西利卡塔	21	<i>S. miltiorrhiza</i> -6	中国四川
11	<i>S. cavalerici</i>	中国四川	22	<i>S. miltiorrhiza</i> -7	中国四川

S. azurea var. *grandiflora* 后简写为 *S. azurea*;相同字母代码后不同数字表示来源于不同地区的居群

1.2 DNA 提取

取样本的新鲜幼嫩叶片 0.5g 用于 DNA 提取,提取方法参考 Murray 等^[12]的方法并做修改,详见前文报道^[6]。DNA 的纯度和浓度用 0.8% 琼脂糖凝胶和 BioSpec-mini 分光光度仪 (Shimadzu, Japan) 检测。最后将 DNA 稀释至约 200ng/μl, -20℃ 保存备用。

1.3 AFLP 分析

EcoR I、*Mse* I 接头及引物序列以 Vos 等^[7]序列为参照,接头序列: *EcoR* I -adaptors-F: 5'-CTCG-TAGACTGCGTACC-3'; *EcoR* I -adaptors-R: 5'-AATT-GGTACGCAGTC-3'; *Mse* I -adaptors-F: 5'-GACGAT-GAGTCCTGAG-3'; *Mse* I -adaptors-R: 5'-TACTCAG-GACTCAT-3'; 预扩引物序列: *EcoR*I-A: 5'-GACTGCG-TACCAATTCA-3'; *Mse* I-C: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-

TAAC-3'。所有序列由 Invitrogen 公司 (Invitrogen, America) 合成。AFLP 分析流程基本参照 Vos 等^[7]的方法并经修改,详见前文报道^[6]。

1.4 数据分析

AFLP 带为显性标记,按照扩增条带的有无分别记为 1 和 0,只选用 150 ~ 500 bp 间且在两次重复中均出现的清晰条带进行记分。其结果为一个 0、1 二元矩阵,将其输入 NTSYS pc2. 1 处理分析,以 SIMQUAL 子程序计算样本间的 Jaccard 相似系数。之后,基于遗传相似系数矩阵,依据 UPGMA 算法并以 SHAN 子程序进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 AFLP 指纹图谱构建

在 AFLP 指纹图谱构建过程中,基因组 DNA

完整性及纯度、酶切程度、连接效率及预扩增效率均关系到后续的选择性扩增能否获得理想的结果。本文采用 CTAB 法,获得了鼠尾草属植物高质量基因组 DNA,OD 值均在 1.70 ~ 1.90;酶切后用 1% 的琼脂糖电泳检测,呈均匀明亮带,证明酶切成功;预扩增产物形成连续的弥散带,稀释 25 倍后用作选择性扩增反应的模板;筛选了

24 对 AFLP 引物,均可产生清晰可辨的 AFLP 指纹图谱(图 1)。24 对引物总共扩增得到 1616 条清晰条带,分子量在 150 ~ 500 bp 之间。不同引物组合扩增出的谱带数存在明显差异,谱带最多的引物组合为 E-AAC + M-CAC,共扩增出 84 条带,最少的引物组合为 E-ACG + M-CAT,共扩增出 34 条带。

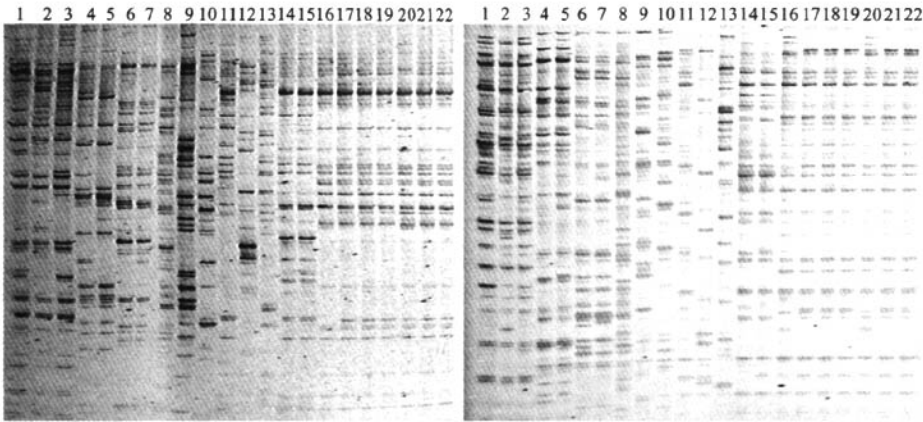


图 1 鼠尾草属植物 AFLP 指纹图谱
Fig. 1 The AFLP fingerprint of *Salvia* spp. entries
(1 ~ 22: 检测材料,编号同表 1)
(1 ~ 22: the numbers for each lane correspond with table 1)

2.2 鼠尾草属植物遗传多样性分析

鼠尾草植物 AFLP 分析中所扩增的条带多态位点比率(PPB)为 99.94%。其中,特异性条带共 89 条,只有 1 条单态性条带。依据 AFLP 在丹参及其同属植物的扩增结果,统计扩增位点并转化为 0、1 二元矩阵,以 NTSYS pc 2.1 计算供试材料间的 Jaccard 相似性系数,得到的相似性系数介于 0.5677 ~ 0.9898 间,均值为 0.7518。其中相似性系数最大的是 *S. azurea* var. *grandiflora* 中来自 Missouri 和 Kansas 两个不同居群之间,为 0.9898;最小的是 *S. azurea* var. *grandiflora* 与 *S. miltiorrhiza*-6 之间,为 0.5698。这些数据表明各物种间遗传多样性比较丰富,不同物种间含有独特的基因资源。

2.3 鼠尾草属植物聚类分析

依据 Jaccard 相似性系数,以 UPGMA 算法对所有供试材料进行聚类分析,构建供试材料的系统发育树(图 2),以 0.81 为阈值可将 11 种鼠尾草植物在物种水平进行准确区分。在物种水平之下,包括不同数量居群的 *S. azurea*、*S. sclarea*、*S. tesquicola*、*S. scapiformia*、*S. miltiorrhiza* 材料同样在聚类分析中依

照居群关系相聚成簇。进一步分析种内居群间的起源关系发现由 2 个居群样本构成的 *S. scapiformia* 以及由 7 个居群样本构成的 *S. miltiorrhiza* 显示了相对较近的起源关系,而包括 *S. azurea*、*S. sclarea*、*S. tesquicola* 在内的 3 个物种居群间则表现了较大的遗传歧化度。

3 讨论

AFLP 的技术关键在于高质量的基因组的提取,酶切连接反应,扩增反应体系和银染方法的优化。本文所建立的方法成功在鼠尾草属多种植物中得以实现,获得了条带清晰、稳定性好、多态性较丰富高质量的 AFLP 指纹图谱(图 1),能将实验所用的 11 种鼠尾草属植物完全区分开。王冰等^[6]利用 AFLP 技术能将鼠尾草属中国传统药用植物丹参 *S. miltiorrhiza* 27 个居群的材料正确识别的,这说明植物 AFLP 指纹图谱在鼠尾草属资源材料识别和区分上表现出高分辨率,完全可以用于鼠尾草属植物遗传多样性、分类、演化及与地理分布间关系的研究。

本研究通过对 11 种鼠尾草属植物进行 AFLP 分

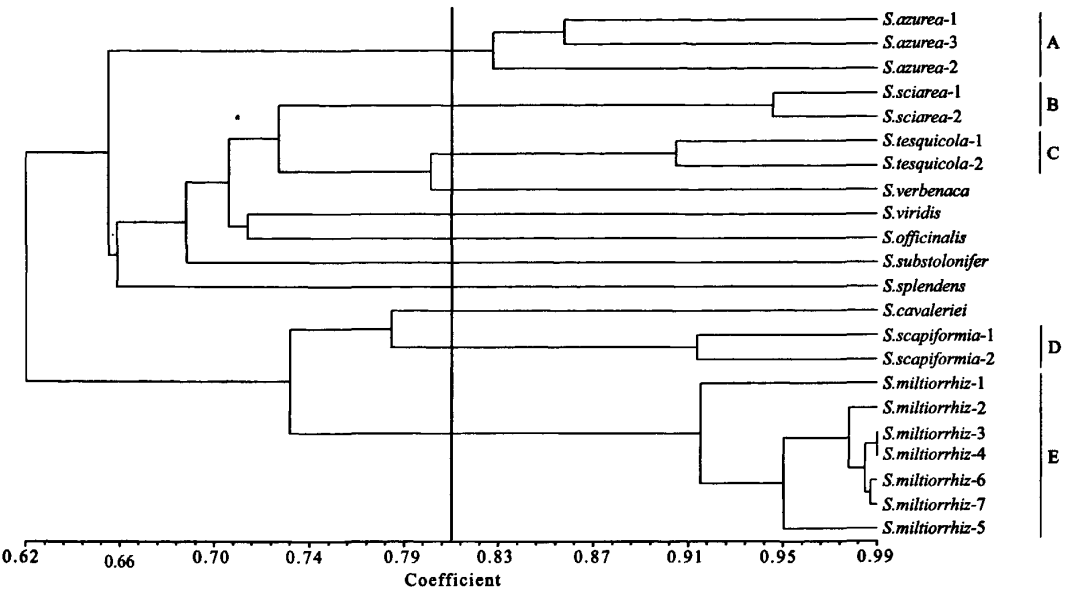


图 2 基于鼠尾草属植物 AFLP 分析的
UPGMA 聚类图
Fig.2 UPGMA dendrogram for genetic relationships of
Salvia based on the AFLP analysis

析,24 对 AFLP 引物组合共得到了 1616 条带,多态性条带为 99.94%,说明本文研究材料间遗传距离较大,种间蕴藏丰富的遗传多样性。Bruna 等^[8]以 7 个随机引物进行 RAPD 分析,共得到 143 条多态性条带,可将 17 种鼠尾草属植物进行个体鉴定。王迎等^[5]通过对 27 种鼠尾草属药用植物及其近缘种的 ITS 序列分析得知,各亚属间差异明显,且原产我国的该属植物与欧美引进种明显具有不同起源。但同时指出,ITS 系统树对于亚属和组的处理较为合理,而对组下的划分则表现出了信息量不足,需要其他相关证据的支持。而本文的研究结果表明,AFLP 分子标记技术在鼠尾草属种间及种内水平上的遗传多样性分析中具有明显优势,能够准确进行基源鉴定。

在种内遗传多样性的研究上,Echeverrigaray 等^[9]运用 RAPD 技术对来自巴西野生和栽培品种 *S. officinalis* 进行了遗传多样性分析,18 个随机引物扩增了 195 条带,多态性位点为 59.3%,聚类分析表明巴西南部的一部分品种是来源于欧洲,在栽培类型中存在着较低的变异。郭宝林等^[10]用 RAPD 技术对中国 9 个居群的丹参遗传多样性进行了研究,11 个 RAPD 引物共得到 129 条扩增带,全部为多态

性带,即所有样本没有共有带,丹参种内多态位点比率为 100%。王冰等^[6]用 AFLP 技术对中国 27 个丹参居群遗传多样性进行了研究,10 对 AFLP 引物组合共得到 528 条带,多态位点比率为 90.15%。本文的实验结果也表明,鼠尾草属植物中种内也存在着丰富的遗传多样性。依据 AFLP 的扩增模式进行聚类分析,在鼠尾草属植物种间及种内不同水平上均可进行有效区分,体现了鼠尾草属物种不同程度的遗传分化及多样性分布(图 2)。然而,由于本文所用材料相关物种测试数目有限,所检测到的种间及种内居群间的遗传变异还不够全面,有待于增加测试材料和使用引物的数目,以加深对鼠尾草属植物遗传多样性的理解。

参考文献

[1] 中国科学院北京植物研究所,中国高等植物图鉴(第三册) [M]. 北京:科学出版社,1985:667-675
[2] 肖小河,方清茂,夏文娟,等. 药用鼠尾草属数值分类与丹参药材道地性[J]. 植物资源与环境,1997,6(2):17-21
[3] 屈英薇,李桔,王淑月. 鼠尾草属植物的化学成分及药理活性[J]. 河北医科大学学报,2005,26(6):701-702
[4] Antonio R, Diego R, Jose Antonio P, et al. Numerical Taxonomy Study of *Salvia* sect. *Salvia* (Labiatae) [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2004, 145(3): 353-371

(下转第 490 页)

带到船上,船到岸以后,船员便把它们丢在海边,其中极少数在海边生根。由于商船由绿玉树原产地非洲等地至华南沿海之间的往返是重复进行的,因此绿玉树枝条也有可能被重复带至。由于绿玉树在原产地主要为种子繁殖,具有丰富的遗传多样性。来自同一地区的绿玉树其原产地可能不同,可能存在较大的遗传差异,而来自不同地区的绿玉树其原产地可能相同,遗传差异较小。如上海植物园的绿玉树引自华南,具有与华南绿玉树相同的遗传多样性特点。

参考文献

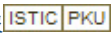
- [1] 蒋丽娟. 引进植物绿玉树 (*Euphorbia tirucalli* L.) 的繁殖技术及提高抗寒性的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2002
- [2] Maugh T H. The petroleum plant; Perhaps we can grow gasoline [J]. Science, 1976, 194: 46
- [3] Calvin M. Hydrocarbons from plants: Analytical methods and observations [J]. Naturwissenschaften, 1980, 67: 525-533
- [4] Sow D, Ollivier B, Viaud P, et al. Mesophilic and thermophilic methane fermentation of *Euphorbia tirucalli* [J]. MIRCEN Journal, 1989, 5: 547-550
- [5] Kalita D. Hydrocarbon plant—New source of energy for future [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2008, 12: 455-471
- [6] 李凌, 李政. 绿玉树分布状况的调查研究 [J]. 西南农业大学学报 (自然科学版), 2005, 27 (5): 644-647
- [7] 刘万勃, 宋明, 刘富中, 等. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质遗传多样性的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2002, 10 (3): 231-236
- [8] 杨庆文, 张万霞, 时津霞, 等. 广东高州普通野生稻 *Oryza rufipogon* Griff. 的遗传多样性和居群遗传分化研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5 (4): 315-319
- [9] 程春明, 石云素, 宋燕春, 等. ISSR 分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6 (2): 172-177
- [10] 马艳明, 李斯深, 范玉顶, 等. 黄淮麦区小麦品种 (系) 的 ISSR 位点遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7 (1): 13-17
- [11] 赵丽娟, 张宗文, 黎裕, 等. 苦芥种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7 (2): 159-164
- [12] 孙群, 佟汉文, 吴波, 等. 不同种源乌拉尔甘草形态和 ISSR 遗传多样性研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (1): 56-63
- [13] 高山, 许端祥, 林碧英, 等. 38 份瓠瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (4): 396-400
- [14] 杜黎明, 毛伟海, 包崇来, 等. 茄子基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 反应体系优化 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15 (4): 723-724
- [15] 赵杨, 陈晓阳, 王秀荣, 等. 二色胡枝子遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (2): 195-199
- [16] 黄玮, 孙平, 张文生, 等. 北京东灵山地区不同海拔柴胡居群的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (4): 453-457
- [17] 刘本英, 王丽鸾, 周健, 等. 云南大叶种茶树种质资源 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (4): 458-464
- [18] 孙芳, 杨敏生, 张军, 等. 刺槐不同居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10 (1): 91-96
- [5] 王迎, 李大辉, 张英涛. 鼠尾草属药用植物及其近缘种的 ITS 序列分析 [J]. 药学报, 2007, 42 (12): 1309-1313
- [6] 王冰, 张勇, 陈成彬, 等. 中国不同地理居群丹参遗传多样性分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (19): 2000-2003
- [7] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA finger printing [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23 (5): 4407-4414
- [8] Bruna S, Giovannini A, De Benedetti L, et al. Molecular analysis of *Salvia* of spp. through RAPD markers [C]. International Symposium on the Labiatae, Italy, 2006
- [9] Echeverrigaray S, Agostini G. Genetic relationships between commercial cultivars and Brazilian accessions of *Salvia officinalis* L. based on RAPD markers [J]. Revista brasileira de medicina, 2006, 8: 13-17
- [10] 郭宝林, 林生, 冯毓秀, 等. 丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究 [J]. 中草药, 2003, 33 (12): 1113-1116
- [11] Walker J B, Sytsma K J. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the Staminal Leve [J]. Annals of Botany, 2007, 100: 375-391
- [12] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321-4325

(上接第 486 页)

鼠尾草属部分物种AFLP指纹图谱构建及遗传多样性分析

作者: 邓科君, 张勇, 鄢丹, 彭金华, 张硕, 任正隆, [DENG Ke-jun](#), [ZHANG Yong](#), [YAN Dan](#), [PENG Jin-hua](#), [ZHANG Shuo](#), [REN Zheng-long](#)

作者单位: 邓科君, 张勇, 彭金华, 张硕, 任正隆, [DENG Ke-jun](#), [ZHANG Yong](#), [PENG Jin-hua](#), [ZHANG Shuo](#), [REN Zheng-long](#)(电子科技大学生命科学与技术学院, 成都, 610054), 鄢丹, [YAN Dan](#)(中国人民解放军第三〇二医院全军中药研究所, 北京, 100039)

刊名: [植物遗传资源学报](#) 

英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)

年, 卷(期): 2010, 11(4)

参考文献(12条)

1. [Murray M G;Thompson W F](#) [Rapid isolation of high molecular weight plant DNA](#) 1980
2. [Walker J B;Sytsma K J](#) [Staminal evolution in the genus Salvia\(Lamiaceae\):Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the Staminal Leve](#)[外文期刊] 2007(2)
3. [Echeverrigaray S;Agostini G](#) [Genetic relationships between commercial cultivars and Brazilian accessions of Salvia officinalis L.based on RAPD markers](#) 2006
4. [Bruna S;Giovannini A;De Benedetti L](#) [Molecular analysis of Salvia of spp.through RAPD markers](#) 2006
5. [Vos P;Hogers R;Bleeker M](#) [AFLP:a new technique for DNA finger printing](#) 1995(05)
6. 王冰;张勇;陈成彬 [中国不同地理居群丹参遗传多样性分析](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2007(19)
7. 王迎;李大辉;张英涛 [鼠尾草属药用植物及其近缘种的ITS序列分析](#)[期刊论文]-[药学报](#) 2007(12)
8. [Antonio R;Diego R;Jose Antonio P](#) [Numerical Taxonomy Study of Salvia sect.Salvia\(Labiatae\)](#)[外文期刊] 2004(03)
9. 屈英薇;李拮;王淑月 [鼠尾草属植物的化学成分及药理活性](#)[期刊论文]-[河北医科大学学报](#) 2005(06)
10. 肖小河;方清茂;夏文娟 [药用鼠尾草属数值分类与丹参药材道地性](#)[期刊论文]-[植物资源与环境](#) 1997(02)
11. 郭宝林;林生;冯毓秀 [丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究](#) 2003(12)
12. [中国科学院北京植物研究所](#) [中国高等植物图鉴](#) 1985

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201004018.aspx