

# 肉苁蓉种内变异的 AFLP 标记研究

甘晓燕, 李 苗, 马洪爱, 宋玉霞

(宁夏农林科学院 农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002)

**摘要:**利用 AFLP 标记方法对肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)种内不同花冠类型进行分子标记鉴定。结果表明:从 64 对引物组合中选出扩增带纹丰富清晰,且多态性较好的引物组合 15 对,共扩增出条带 266 条,多态性条带 148 条,多态性位点百分比为 55.6%。从花冠裂片类型可将肉苁蓉划分为 9 种不同类型,9 种类型遗传距离的变异范围在 0.1778~0.8462 之间。

**关键词:**肉苁蓉;AFLP;变异类型

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0141-03

种质的遗传多样性评价是植物育种研究的一个重要内容,它决定了这些种质在今后育种实践中的有效利用。以往利用形态标记、系谱分析、配合力表现以及同工酶等方法来研究种质资源的遗传多样性表现出一定的局限性<sup>[1]</sup>。而 DNA 分子标记技术的发展可为其研究提供新手段,在多种分子标记方法研究中,扩增片段长度多态性(AFLP)技术又被认为是一种很好的分子标记方法,它既有 RFLP 的可靠性,又有 RAPD 的方便性,而且所需 DNA 量少,重复性强,在一次扩增中,可产生条带多等特点,因而被广泛用于基因作图、基因定位、亲缘关系鉴定<sup>[2-4]</sup>。

肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)属于一种具有寄生生长特性的药用植物,为名贵中药材,是国家二级保护植物,主要分布于内蒙古、甘肃、宁夏、新疆及青海等地的荒漠地带<sup>[5]</sup>。肉苁蓉属于野生植物,未经人工驯化,在长期自然选择过程中形成了多种开花类型,这些类型的产生原因和遗传关系如何,需进行深入的研究。研究肉苁蓉种内自然类型的遗传关系对其遗传多样性的研究具有重要的价值。该试验首次利用 AFLP 分子标记技术对具多种开花类型的肉苁蓉个体进行亲缘关系分析,为中药肉苁蓉的品质鉴定以及系统与进化建立可靠的分析方法。

**第一作者简介:**甘晓燕(1982-),女,宁夏中宁人,本科,研究实习员,现主要从事分子标记研究工作。E-mail: ganxiaoyan1982@163.com。

**通讯作者:**宋玉霞(1963-),女,宁夏银川人,硕士,研究员,现主要从事生物技术育种研究工作。E-mail: songyx666@163.com。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30260008);宁夏自然科学基金资助项目(nz0522,nz0643)。

**收稿日期:**2010-11-10

## 1 材料与方法

### 1.1 生境概况

肉苁蓉天然分布在内蒙古阿拉善左旗苏海图苏木。该地区年平均气温 8.6℃,最高气温 40.9℃,最低气温 -31.2℃,年平均地温 10.5℃,年日照数 3 293 h,无霜期 160 d,年平均降水量 104 mm,年平均蒸发量 3 023.7 mm。年平均风速 3.6 m/s,最大瞬时风速 24 m/s。主风向东北风,主害风西北风。地形以平缓的沙地为主,固定和半固定沙丘相间分布,梭梭林分布于风沙地,地下水位深 10 m,群落内主要分布有旱生和超旱生植被,建群种为梭梭,伴生种为白刺(*Nitraria*)、红砂(*Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim)、猪毛菜(*Salsola callina*) Y. L. Chang)、沙蒿(*Artemisia intramongolica*)、沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)等。

### 1.2 试验材料

肉苁蓉于 2005 年 5 月 9~13 日采自内蒙古阿拉善左旗苏海图苏木。在野外依据肉苁蓉种内个体间花冠裂片的不同颜色,初步将肉苁蓉种内变异划分为 9 个类型,9 种花冠裂片颜色分别为:乳白色(类型 I)、黄白色(类型 II)、粉白色(III)、浅粉色(IV)、粉色(V)、浅粉紫色(VI)、粉紫色(VII)、紫色(VIII)、茄紫色(IX),采用肉质茎为试验材料。将肉质茎切成薄片状 1 g/袋,存放在超低温冰箱中待用。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 模板 DNA 的制备** 采用改进的 CTAB 法提取肉苁蓉基因组 DNA。将肉苁蓉材料在液氮中研磨成粉末状,加入 5 mL 无 CTAB 缓冲液(200 mM Tris, 50 mM EDTA, 250 mM NaCl, 2% PVP)充分混匀后,4℃放置 10 min,7 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,将沉淀溶于 3% CTAB 缓冲液中,其余步骤同 CTAB 法。

**1.3.2 AFLP 扩增** 采用购自鼎国生物公司的 AFLP

试剂盒(EcoRI/MseI型)进行试验。试验步骤均按试剂盒使用说明进行。选择扩增结束后,加入上样缓冲液,95℃变性5 min,冰浴,上样。

1.3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 扩增产物采用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,在50 W恒功率下电泳2 h,然后采用银染法检测。银染方法参照白瑞霞方法<sup>[6]</sup>。

#### 1.4 数据统计

标记 AFLP 扩增片段大小,以0和1建立数据库。在相同迁移率位置上,有带的记为1,无带的记为0。参照DNA分子标记数据分析方法,将AFLP标记作为等位基因进行多态性研究,每条扩增条带视为1个性状,处理数据。根据Nei等<sup>[7]</sup>的计算方法计算2品种间的遗传相似度(Genetic similarity)和遗传距离(Genetic distance, D)。利用NTSYS 2.1软件对数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 模板质量检测与定量

获取高质量的基因组DNA是AFLP分析成功的关键步骤之一。采用改进的CTAB法提取DNA可有效去除各类杂质,尤其是去除多糖效果明显。通过琼脂糖凝胶电泳检测,点样孔杂质少,无降解,DNA带型整齐,浓度在200 ng/μL左右。经紫外分光光度计检测A260/A280比值为1.7~1.8。

### 2.2 扩增产物多态性

从64对引物组合中选出扩增带纹丰富清晰,且多态性较好的引物组合15对,共扩增出条带266条,多态性条带148条。多态性位点百分比为55.6%。其中多态性位点百分比比较高的引物组合7对,如表1所示。图1为引物E-ACG/M-CAG在9份肉苁蓉种质资源中的扩增电泳图谱。

表1 筛选出的7对AFLP引物组合的扩增结果

引物组合	扩增位点数	多态位点数	多态位点比例/%
E-ACG/M-CTC	20	13	65
E-ACG/M-CAG	17	11	65
E-ACG/M-CTA	16	9	56
E-ACT/M-CAC	15	9	60
E-ACT/M-CTT	27	15	56
E-AGC/M-CTC	16	10	62
E-AAC/M-CTG	17	10	59

### 2.3 肉苁蓉种内变异分析

2.3.1 遗传距离分析 9种不同类型肉苁蓉遗传距离的变异范围在0.1778~0.8462。类型Ⅲ和类型Ⅴ之间遗传距离最近为0.1778,类型Ⅰ和类型Ⅷ之间遗传距离最远为0.8462。

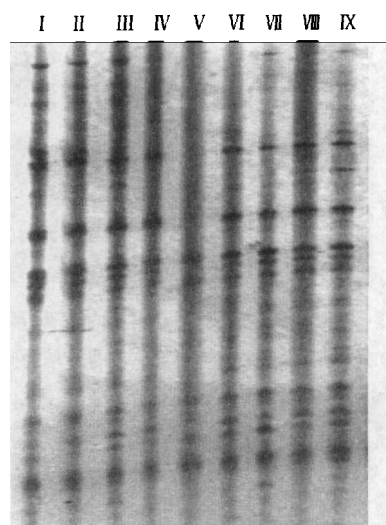


图1 引物E-ACG/M-CAG扩增电泳图谱

表2 不同类型肉苁蓉的遗传距离

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
I	1.0000								
II	0.6119	1.0000							
III	0.8113	0.5376	1.0000						
IV	0.5738	0.3864	0.6111	1.0000					
V	0.7616	0.5281	0.1778	0.5465	1.0000				
VI	0.7556	0.3846	0.4163	0.3874	0.3831	1.0000			
VII	0.6629	0.4655	0.3942	0.5091	0.3600	0.4245	1.0000		
VIII	0.8462	0.5593	0.4190	0.5714	0.3861	0.3475	0.5143	1.0000	
IX	0.7011	0.4035	0.4272	0.3333	0.3737	0.2555	0.3529	0.4058	1.0000

2.3.2 聚类分析 根据遗传距离,用聚类平均法对9种不同类型的肉苁蓉进行聚类分析,聚类结果见图2。从聚类图可看出,9种不同类型肉苁蓉可以分为3个类群,第1类群只包括类型Ⅰ;第2类群包括类型Ⅱ、类型Ⅳ、类型Ⅵ、类型Ⅸ;第3类群包括类型Ⅲ、类型Ⅴ、类型Ⅶ、类型Ⅷ。

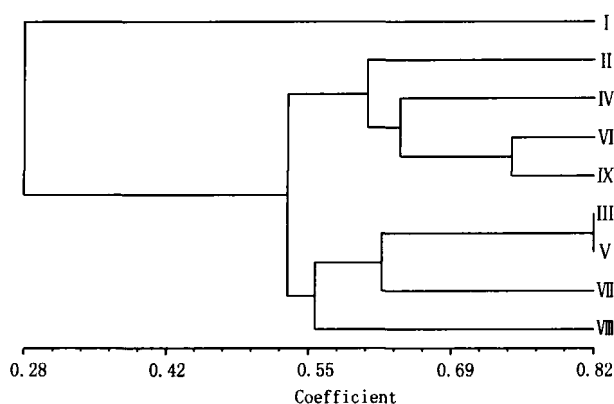


图2 不同开花类型肉苁蓉的遗传聚类图

## 3 结论与讨论

人们在传统的分类当中只能选取少数有差异的性状作为分类的依据,但还有一些差异是表型不可见的,或者无法为常规的分析方法所检测,因而很难做到全面分析差异性。同时表型可见的差异中有些又是依赖环境的,用其作为分类依据不够客观。DNA分子标记是

个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记,它可以反映生物个体和种群基因组的差异。AFLP 具有多态性丰富、用样量少、灵敏度高等优点,因此被认为是一种十分理想的、有效的、先进的分子标记<sup>[8]</sup>。在 AFLP 分析当中,不同的扩增片段对应着基因组上的不同位点,不同样品 AFLP 带型的差异反映了其 DNA 水平上酶切位点分布的差异。因此,可以将每一扩增片段看作其基因组的一个特征,并且这种特征数目众多,不受环境条件的影响,非常稳定可靠。AFLP 技术因此成为研究遗传多样性的有利工具。Pan 等<sup>[9]</sup>用 AFLP 方法分析了 44 个栽培梨品种的遗传关系和多样性。王涛<sup>[10]</sup>等利用 AFLP 分析了 20 个重要苹果砧木间的亲缘关系。试验中仅用 15 对引物就检测了 266 个位点,且多态性丰富,相当于分析了 266 个有差异的性状,这是传统的分类很难做到的。

肉苁蓉作为名贵中药材,其研究工作已有很多报道,但关于肉苁蓉遗传多样性的报道比较少见。研究肉苁蓉的分子标记进而分析其遗传多样性,可有助于肉苁蓉种质资源的保护。试验中发现,AFLP 分析对反应条件非常敏感,要想获得稳定可靠的指纹图谱,必须对反应条件进行严格控制。肉苁蓉作为一种寄生植物,DNA 含量较少,同时含有大量的多酚和多糖,它们的存在将会严重地影响酶切和连接的效率,给试验增加难度。采用改进的 CTAB 法经多次抽提去除杂质可以获得高质量的模板 DNA。其次,在酶切和连接过程中,时间的掌握很重要,采取酶切、连接两步反应相结合,这样既简化反应过程又提高了工作效率。

对肉苁蓉聚类结果分析可以看出,肉苁蓉各类型在 DNA 水平上的差异与其花冠颜色存在一定的对应关

系,花冠颜色较深的类型和花冠颜色较浅的类型属于不同类群。类型 I 在 DNA 水平上与形态学方面存在一致性,类型 I 在 DNA 水平上表现出与其它类型遗传距离较大;在形态方面,类型 I 花冠裂片颜色也与其它各类型有较大差异,同时鳞片叶在长度和宽度上比其它各类型都大,且在肉质茎上排列比其它各类型疏松,可能为一个肉苁蓉变种,这需要进行深入研究。试验结果表明,在进行肉苁蓉分类时尽量将其形态特征和 AFLP 相结合,其结果更准确、更科学、更合理。

### 参考文献

- [1] Hallauer A R. Corn breeding, In Sprague GF, Dudley JW (Eds) Corn and corn improvement 3rd edn. Agronomy Monograph 18[J]. American Society of Agronomy Madison W I, 1988.
- [2] 李本逊,蔡健. AFLP 在水稻类群划分研究中的应用[J]. 种子, 2001 (4): 26-27.
- [3] 李丽,郑晓鹰. AFLP 分子标记应用于白菜品种鉴定[J]. 分子植物育种, 2006, 5(4): 685-689.
- [4] 谢渊,张晓蕾,李毅,等. AFLP 技术在天麻遗传变异中的初步应用[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 141-144.
- [5] 周志锦. 肉苁蓉的研究进展[J]. 中医药信息, 1995(5): 28.
- [6] 白瑞霞. AFLP 技术在枣种质资源鉴别和分类研究中的应用[D]. 保定:河北农业大学, 2005.
- [7] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [8] 潘新法,徐春明. RAPD 在枇杷品种鉴定中的应用[J]. 果树学报, 2002, 19(2): 136-138.
- [9] PAN Z, Kawabatas, Sugiyama N, et al. Genetic diversity of cultivated resources of pear in north China [J]. Acta Hort, 2002: 187-194.
- [10] 王涛,祝军. 苹果砧木亲缘关系 AFLP 分析[J]. 中国农业科学, 2001, 34(3): 256-259.

## Study on Intraspecific Variations of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma Using AFLP Molecular Markers

GAN Xiao-yan, LI Miao, MA Hong-ai, SONG Yu-xia

(Key Lab of Agricultural Biotechnology, Yinchuan, Ningxia 750002)

**Abstract:** Identification of *Cistanche deserticola* relationship using AFLP. The results showed that the from 64 primer combinations, 15 polymorphic primer combinations were selected to perform the AFLP. 266 bands have been amplified altogether, among which 148 bands showed polymorphism, amounting to 55.6%. *Cistanche deserticola* Y. C. Ma was divided 9 types from the types of corolla the genetic distances varied from 0.1778~0.8462.

**Key words:** *Cistanche deserticola* Y. C. Ma; AFLP; variation type