

AFLP 技术在天麻遗传变异研究中的初步应用

谢渊¹, 张小蕾^{2,*}, 李毅¹, 蒋朝晖³, 单可人¹, 吴晓黎³

贵阳医学院¹分子生物学重点实验室, ²医学检验系, 贵阳 550004; ³贵阳中医学院, 贵阳 550003

Preliminary Application of AFLP for Study on *Gastrodia elata* Genetic Diversity

XIE Yuan¹, ZHANG Xiao-Lei^{2,*}, LI Yi¹, JIANG Zhao-Hui³, SHAN Ke-Ren¹, WU Xiao-Li³

¹Key Laboratory of Molecular Biology, ²Department of Laboratory Science, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China;

³Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China

摘要: 为探讨 AFLP 技术在天麻遗传变异研究的应用, 选取 11 对 AFLP 引物对 11 份不同来源天麻品种之间遗传关系进行 AFLP 分析的结果表明, 11 对引物共扩增出 543 条扩增带, 每个引物组合在个体间扩增条带的数目有 33~83 条, 平均为 49.5。采用 UPGMA 法聚类分析得到的天麻各品种之间遗传距离为 0.0792~0.6004。UPGMA 聚类图显示, 11 份样品分为两大组群, 其中的贵州天麻一群又分为 2 个组群。

关键词: 天麻; 扩增片段长度多态性(AFLP); 遗传变异

天麻作为名贵中药, 对其研究的报道已很多(邓士贤和莫云强 1979; 周铨和陈心启 1983), 但对天麻遗传多样性的报道还少见。本文用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术(Vos 等 1995), 构建了 11 个天麻品种的 DNA 指纹图谱, 采用其遗传多样性对天麻品种鉴定进行探讨, 以期能为中药天麻提供一种稳定、快速和准确的鉴定方法。

材料和方法

1 材料

贵州大方地区、乌当地区、雷公山地区野生和人工栽培天麻的 3 个品种: ‘红杆天麻’(*Gastrodia elata* Bl. f. *elata*)、‘黄杆天麻’(*G. elata* Bl. f. *flavida* S. Chow)、‘乌杆天麻’(*G. elata* f. *glauca* S. Chow)以及云南天麻鲜品, 材料名称及来源见表 1。取其地下块茎或鹦哥嘴嫩芽洗净, 刮弃表皮, 以避免共生蜜环菌污染, 留其核心成分提取天麻基因组 DNA。

2 仪器与试剂

主要仪器: PE2400 PCR 仪、DYY-III 20B 型电泳槽、BIO-RAD power/PAC3000 电泳仪。引物和接头均由上海生工生物工程有限公司合成, 序列见表 2。限制性内切酶购自 NEB 公司, T4-DNA 连接酶购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司和华美公司。

3 方法

3.1 基因组 DNA 的提取 采用我组改进的 CTAB/SDS 方法(李毅和张小蕾 2005)。

3.2 模板 DNA 酶切-连接 用限制性内切酶 *Mse*I 和 *Pst*I 双酶切, 然后连接上通用接头。酶切-连接混合液包括 2.5 μ L DNA (200 ng· μ L⁻¹)、*Mse*I 3 U、*Pst*I 3 U、NEB 缓冲液 1.0 μ L、*Mse*I 接头和 *Pst*I 接头 1.0 μ L、10×Ligase 缓冲液 2.5 μ L、牛血清白蛋白(BSA) 0.2 μ L、T4-DNA 连接酶 0.5 μ L, 加双蒸水至 25 μ L, 于 37 °C 下酶切-连接 10 h。

3.3 预扩增 预扩增采用 M+0/P+0 引物组合, 取 2 μ L 酶切-连接完成的 DNA 样品, 依次加入 0.6 μ L *Mse*I 引物 M00 (50 ng· μ L⁻¹)、0.6 μ L *Pst*I 引物 P00 (50 ng· μ L⁻¹)、2.0 μ L 10×PCR 缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ KCl; 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂; 0.1% 明胶)、1.2 μ L 的 MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹)、1.6 μ L dNTP (2.5 mmol·L⁻¹)、0.2 μ L Taq DNA 酶 (5 U· μ L⁻¹), 加双蒸水至 20 μ L。反应条件为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 80 s, 共 36 个循环; 最后于 72 °C 下延伸 5 min。预扩增完成后, 用超纯水稀释 15 倍, 贮于 -20 °C 中保存待用。

收稿 2007-01-07

资助 贵州省中药现代化专项项目[(2003)22号]。

* 通讯作者(E-mail: xiaolei0501@sohu.com; Tel: 0851-6770942)。

表1 天麻品种及其来源

编号	品种	来源	生态生理特性
1	‘乌杆天麻人工栽培2代’	贵州大方县云龙天麻开发基地	地下块茎呈椭圆形、不规则, 海拔1 510 m
2	‘乌杆天麻人工栽培1代’	贵州大方县云龙天麻开发基地	地下块茎呈长椭圆, 海拔1 510 m
3	品种名不清(天麻鲜品)	云南省	不详
4	‘黄杆天麻0代种麻’	贵州大方县云龙天麻开发基地	地下块茎呈小梭形, 海拔1 000 m
5	‘黄杆天麻0代种麻’	贵州大方县云龙天麻开发基地	地下块茎呈小梭形, 海拔1 510 m
6	‘红杆天麻人工栽培多代’	贵州大方县大方镇龙昌坝	地下块茎呈长梭形, 海拔1 000 m以下
7	‘红杆天麻人工栽培多代’	贵州大方县黑桃乡钢厂	地下块茎呈长梭形, 海拔1 200 m
8	‘红杆天麻’	贵州贵阳乌当区百宜乡	地下块茎呈长梭形, 海拔1 300 m
9	‘野生乌杆天麻’	贵州台江县雷公山	地下块茎呈椭圆形, 标本不完整, 海拔1 820 m
10	‘野生乌杆天麻’	贵州台江县雷公山	地下块茎呈长梭形, 海拔1 820 m
11	‘野生乌杆天麻’	贵州雷山县雷公山	地下块茎呈椭圆, 海拔1 750 m

表2 AFLP人工接头和引物序列

引物	序列
<i>Pst</i> I接头	5' CTCGTAGACTGCGTACATGCA 3' 3' CATCTGACGCATGT 5'
P00	5' GACTGCGTACATGCAG 3'
P35	5' GACTGCGTACATGCAGACA 3'
P42	5' GACTGCGTACATGCAGAGT 3'
P66	5' GACTGCGTACATGCAGGAT 3'
P71	5' GACTGCGTACATGCAGGGA 3'
<i>Mse</i> I接头	5' GACGATGAGTCCTGAG 3' 3' TACTCAGGACTCAT 5'
M00	5' GATGAGTCCTGAGTAA 3'
M22	5' GATGAGTCCTGAGTAAGT 3'
M49	5' GATGAGTCCTGAGTAACAG 3'
M54	5' GATGAGTCCTGAGTAACCT 3'

3.4 选择性扩增 选择性扩增选用M+3/P+3、M+2/P+3引物组合, 共选用11对引物。取2 μ L稀释后的预扩增产物, 加入1 μ L *Mse*I引物 (50 ng· μ L⁻¹)、1 μ L *Pst*I引物 (50 ng· μ L⁻¹)、2.0 μ L 10 \times PCR缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ KCl; 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂; 0.1%明胶)、1.2 μ L的MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹)、1.6 μ L dNTP (2.5 mmol·L⁻¹)、0.2 μ L Taq DNA酶 (5 U· μ L⁻¹), 加双蒸水至20 μ L。反应条件为95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 共12个循环, 每个循环降低0.7 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 共23个循环, 最后于72 $^{\circ}$ C下延伸5 min。

3.5 扩增产物的凝胶电泳分析 选择扩增后的样品中加入5 μ L上样缓冲液 (98%甲酰胺; 10 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0; 0.25%溴酚蓝; 0.25%二甲酚

蓝), 于95 $^{\circ}$ C下变性8 min, 然后迅速放入冰浴中冷却, 在功率为80 W下用5%的聚丙烯酰胺凝胶电泳2 h, 含预电泳(40 min)。银染检测扩增产物(Bassam等1995)。

3.6 数据分析 每个样品AFLP的扩增谱带按有无分别赋予1或0, 以获得矩阵。不同引物组合的扩增效果用多态性信息指数(PIC)表示(郝晨阳等2003)。按公式: $PIC = \sum(1 - p_i^2) / n$ 计算。其中, p_i 为任一引物组合第*i*条多态性带在所有供试材料中出现的频率; n 为供试材料的总数。

用NTSYS-pc 2.1软件中的DICE法计算品种之间的相似系数, 按公式 $G_s = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算。其中, N_{xy} 为任意两品种共享谱带数; N_x 和 N_y 分别代表每个品种总的带谱数。根据品种间遗传距离(D)公式 $D = 1 - G_s$ 得到品种间遗传距离。用UPGMA法进行聚类分析, 绘制树状聚类图。

实验结果

1 AFLP扩增结果

11对引物组合对11份天麻标本进行的AFLP分析都得到清晰的指纹, 共扩增出清晰可辨的条带543条(表3)。每个引物组合在个体间扩增条带的数目在33~83条, 平均为49.5; 平均PIC为0.32, 变化范围为0.28~0.37, 其中, P66/M54、P42/M49这2对引物组合的PIC值达到或超过0.35。这些引物组合扩增出的多态性谱带数也反映其扩增产物具有较高的多态性(图1), 据此认为在天麻遗传多样性研究中应优先采用这些引物组合。

表3 11对引物组合的AFLP扩增产物多态性比较

引物编号	引物组合	扩增多态性带数	PIC
P35/M22	P-ACA/M-GT	83	0.28
P35/M49	P-ACA/M-CCT	56	0.31
P35/M54	P-ACA/M-CAG	40	0.31
P42/M22	P-AGT/M-GT	49	0.28
P42/M49	P-AGT/M-CCT	50	0.35
P42/M54	P-AGT/M-CAG	34	0.33
P66/M22	P-GAT/M-GT	69	0.30
P66/M49	P-GAT/M-CCT	39	0.30
P66/M54	P-GAT/M-CAG	45	0.37
P71/M22	P-GGA/M-GT	45	0.32
P71/M49	P-GGA/M-CCT	33	0.34
合计		543	0.32

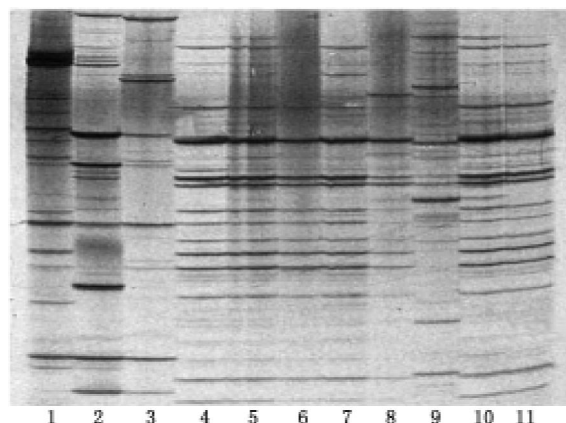


图1 P-GGA/M-GT引物组合11个品种扩增的AFLP指纹图谱

2 AFLP数据的聚类分析

采用DICE系数对11个天麻标本进行遗传相似系数 G_s 和遗传距离计算, 所得遗传距离矩阵的结果(表4)表明, 不同天麻标本间遗传距离差异较大(0.0792~0.6004), 表明天麻各品种的遗传多样性十分丰富。采用上述AFLP数据进行聚类分析, 绘制出树状图(图2)。在45%的相似水平上, 聚类图将11个品种分为2大群。有趣的是云南鲜品独立成为1个群, 而贵州各地天麻品种归为另一群。在60%的相似水平上, 贵州天麻又分为2个亚群, 仍然按天麻的来源进行分类, 雷公山地区的天麻聚为一类, 大方地区天麻聚为另一类, 说明天麻类群划分结果与它们的地理区域分类相吻合。对于不同品种天麻来说, 可能是由于样本较少的缘故, 未显示出明显的特征。

讨论

AFLP是基于RLFP和RAPD的PCR方法, 是目前国际上构建DNA指纹图谱的最新方法之一。AFLP技术能检测到大量的基因位点, 灵敏度和分辨率都很高, 而且具有良好的重复性。选用不同的引物组合, 不同基因型DNA可以有不同的酶切位点, 从而产生扩增片段的长度多态性, 即使亲缘关系很近的品种间DNA差异也可以检测出来。因此, 此项技术在分子生物学、遗传学及生物育种等领域有广泛的应用前景(易干军等2002; 马小军等2000)。

天麻作为名贵中药, 其研究工作已多有报道, 但就天麻遗传多样性的报道比较少见。研究天麻的分子标记进而分析其遗传多样性, 可有助

表4 各天麻品种间的遗传距离

品种编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	—										
2	0.0792	—									
3	0.5672	0.5543	—								
4	0.2284	0.2228	0.5488	—							
5	0.1584	0.1676	0.6004	0.2026	—						
6	0.1252	0.1418	0.5414	0.1584	0.1584	—					
7	0.1179	0.1197	0.5783	0.1879	0.1621	0.1326	—				
8	0.1087	0.1215	0.5581	0.2560	0.1861	0.1492	0.1419	—			
9	0.4862	0.4807	0.5083	0.4309	0.4862	0.4384	0.4715	0.4954	—		
10	0.4457	0.4512	0.5157	0.4502	0.4126	0.4126	0.4568	0.4586	0.4163	—	
11	0.5046	0.5064	0.4789	0.4457	0.4715	0.4568	0.4973	0.5212	0.3131	0.3868	—

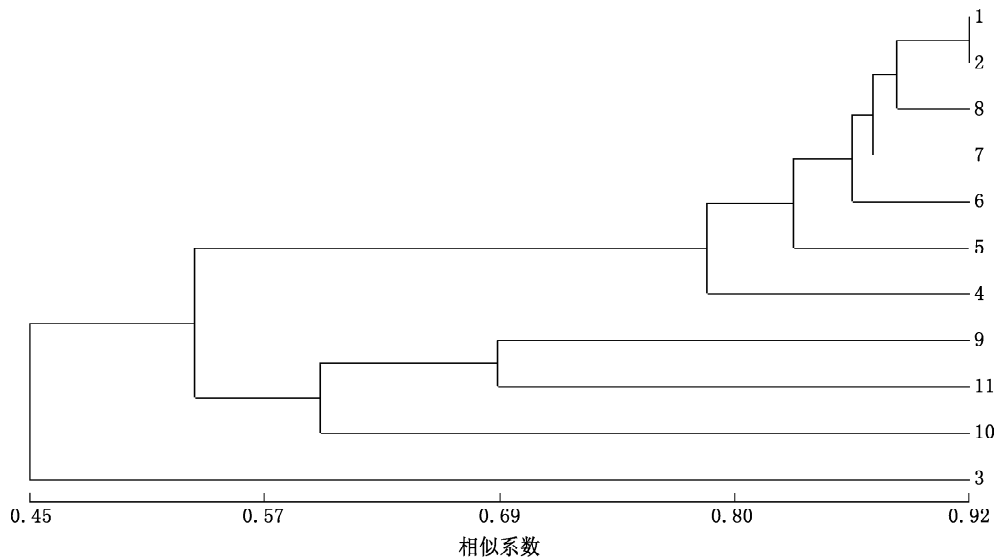


图2 各天麻品种的UPGMA 聚类图

于天麻优良品种的选育。实验过程中发现,天麻是植物中的一个特殊品种,它仅含有少量DNA,而含有大量的多酚和多糖,它们的存在将会严重影响酶切和连接的效率,给实验带有很大的难度。AFLP分析对反应条件要求非常高,要想获得稳定可靠的指纹图谱,必须对实验条件进行严格控制。尤其是在提取天麻DNA过程中,务必要除净杂质以获得高纯度DNA。其次,在酶切与连接过程中,时间的掌握很重要,只有找到最适合酶切和连接时间才可以使酶切彻底又提高工作效率。本文将改进的常规的CTAB法和SDS法有效结合,对天麻标本进行处理和纯化,同时将酶切和连接两步反应相结合,于37℃下酶切-连接10h,然后通过预扩增和选择性扩增PCR反应条件的优化,这样方可获得稳定的结果。

天麻的UPGMA聚类图表明,天麻种内存在广泛的遗传多样性,这可能是地域、气候和遗传因素影响的结果。天麻主要靠地下块茎繁殖,也有是异花和自花授粉有性繁殖的,繁殖方式的多样化也可能是天麻遗传多样性的原因(胡忠等1999;刘成运1981)。采自不同地区的天麻在UPGMA聚类中都分在不同的类群,从DNA水平上来说天麻具有地域性,这表明丰富多变的地势和气候条件也可能是天麻遗传多样性的原因之一,同时也表明道地药材的重要性及其在栽培地域上的局限性。相同的地域和气候条件下,相同天麻品

种出现不同的图谱,这种情况多出现于人工栽培的天麻,这可能是同一地域栽培天麻的种麻来源不同,也有可能是受其他来源品种的影响,以致出现不同的DNA多态性。本文中样本例数可能较少,所以不同品种天麻之间以及野生天麻和人工栽培天麻之间的遗传分化未表现出明显的特征,对此还需继续研究。

参考文献

- 邓士贤,莫云强(1979).天麻的药理研究.云南植物研究,1(2):66~73
- 郝晨阳,王兰芬,董玉琛,尚勋武,张学勇(2003).我国西北春麦区小麦育成品种遗传多样性的AFLP分析.植物遗传资源学报,4(4):285~291
- 胡忠,黄清藻,刘小焯(1999).天麻抗真菌蛋白GAFP-I的一级结构和cDNA克隆.云南植物研究,21(2):131~138
- 李毅,张小蕾(2005).天麻总DNA提取及聚合酶链反应扩增鉴定.贵阳医学院学报,30(4):311~314
- 刘成运(1981).天麻发育过程中多糖的变化及分布.云南植物研究,3(3):375~380
- 马小军,汪小全,肖培根,洪德元(2000).人参农家类型的AFLP指纹研究.中国中药杂志,25:707~710
- 易干军,霍合强,蔡长河(2002).荔枝AFLP分析体系的建立.果树学报,19:361~364
- 周铨,陈心启(1983).国产天麻属植物的整理.云南植物研究,5(4):361~368
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Greshoff PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem, 196: 80~83
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M et al (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 23(21): 4407~4414