

野生白及资源遗传多样性的 SRAP 分析

洪建聪¹, 郭艳¹, 翟利娜¹, 陈妮钹¹, 丁志山², 金波^{1*}

1. 浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学医学技术学院, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 对不同来源的野生白及遗传多样性进行分析, 为白及种质的选育、保护和开发提供参考。**方法** 以全国不同地区的 50 份野生白及样品为材料, 利用序列相关多态性扩增 (SRAP) 分子标记技术进行遗传多样性分析, 使用 UPGMA 法进行白及亲缘关系的聚类分析。**结果** 利用筛选出的 15 对 SRAP 引物组合, 50 份样品扩增获得共 117 个条带, 平均每个引物产生 7.8 个条带, 其中多态性条带 106 条, 多态性比率为 90.60%。聚类结果表明供试 50 份白及样品的遗传相似系数为 0.59~0.87, 以遗传系数 0.66 为基准可以分成 6 大类。遗传距离最近的 2 份紫花白及分别来自云南丽江市 2 号和湖北京山县 2 号, 其遗传距离与地理距离无直接关联。**结论** 野生白及资源间存在较丰富的遗传多样性, 且地理距离与遗传距离并无直接关联, SRAP 技术可为白及的资源保护、品种选育提供理论依据, 为白及后续开发利用提供参考。

关键词: 白及; 遗传多样性; SRAP; 聚类分析; 分子标记技术

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1966-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.029

Genetic diversity of wild *Bletilla striata* based on SRAP markers

HONG Jian-cong¹, GUO Yan¹, ZHAI Li-na¹, CHEN Ni-pi¹, DING Zhi-shan², JIN Bo¹

1. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China

2. College of Medical Technology, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective The genetic diversity of wild *Bletilla striata* from different sources was analyzed in order to provide the reference value for breeding, protection and development of *B. striata* germplasm in the future. **Methods** Genetic diversity of 50 wild *B. striata* samples was identified by SRAP molecular marker technique, and the genetic relationship was analyzed by UPGMA method. **Results** A total of 117 bands were amplified from 50 samples by using 15 SRAP primer combinations, with an average of 7.8 bands per primer. Among them, 106 bands were polymorphic, with a polymorphism rate of 90.60%. The clustering results showed that the genetic similarity coefficient of 50 *B. striata* samples was 0.59—0.87, which could be divided into six categories based on the genetic coefficient of 0.66. The genetic distance of two pieces of *B. striata* from No.2 Lijiang, Yunnan and No.2 Jingshan County, Hubei was not directly related to geographical distance. **Conclusion** There are abundant genetic diversity among wild *B. striata* resources, and there is no direct relationship between geographical distance and genetic distance. SRAP technology can provide theoretical basis for the protection of *B. striata* resources and variety breeding, which provides reference for the subsequent development and utilization of *B. striata*.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb) Rchb. f.; genetic diversity; sequence related amplified polymorphism; cluster analysis; molecular marker technique

白及, 也叫“白芨”, 又名箬兰、百笠等, 是多年生兰科草本植物。其花色艳丽, 多为紫花、白花和黄花, 其假鳞茎制成干燥块茎入药, 具有治疗出血、外伤以及清热等功能^[1], 是一种观赏和药用价值集于一体的植物。此外, 白及块茎含大量的白及

胶质, 具有抗衰老、抗氧化等功能, 现已普遍用于化妆品的生产中^[2]。

我国白及资源分为白及 *Bletilla striata* (Thunb) Rchb. f.、小白及 *B. formosana* Schltr.、黄花白及 *B. ochracea* Schltr 和华白及 *B. sinensis* Schltr. 主要分布

收稿日期: 2018-11-13

基金项目: 国家中医药管理局中药饮片质量保障体系研究 (201507002)

作者简介: 洪建聪 (1996—), 男, 本科生。Tel: 15868810129 E-mail: 1014340784@qq.com

*通信作者 金波 (1974—), 女, 副教授, 从事分子遗传学研究。Tel: (0571)86613666 E-mail: jinbo@zcmu.edu.cn

于长江流域以及岭南地区^[3]。虽然我国有丰富的白及品种，但是目前我国白及种质资源极度缺乏^[4]。白及能产生大量的种子，但种子发育不全，无胚乳^[5]，在野生条件下难以发芽生长。随着白及市场继续扩大以及受传统观念等影响，野生白及被无限度挖掘，生态环境遭到巨大破坏，白及的需求量却有增无减^[6]。因此，开展白及保护以及种质资源分析刻不容缓，要选育出良种白及，并以人工栽培方式解决白及资源匮乏问题，检测白及遗传多样性成为关键^[7]。

自然界中，DNA 是导致生物遗传多样性的根本因素，因此以分子标记手段来分析生物遗传多样性更有准确性。序列相关多态性扩增(sequence related amplified polymorphism, SRAP)是一种新型分子标记技术^[8]，它的作用点为外显子区域，与以往 SSR、

RAPD 等分子标记相比，具有操作简便、成本低、利于克隆等优点，割胶回收用于测序也十分快捷^[9]，并已成功被应用于铁皮石斛^[10]等多种药用植物的遗传多样性检测、种质资源分析、遗传图谱构建等研究领域^[11-12]。

本研究采用 SRAP 分子标记技术对 50 份采自全国不同地区的野生白及进行遗传多样性分析，以期在 DNA 水平揭示野生白及的亲缘关系，为后期白及品种的选育、保护、开发、DNA 指纹图谱构建奠定基础。

1 材料

采集的野生白及共 50 份，分别采自浙江、四川、陕西等省份，经浙江中医药大学丁志山教授鉴定，信息见表 1。

表 1 白及来源及花色

Table 1 Sources and flower color of *B. striata*

编号	来源地	种名	花色	编号	来源地	种名	花色
1	安徽黄山市	<i>B. striata</i>	紫花	26	陕西安康市 1 号	<i>B. striata</i>	紫花
2	安徽宣城市 1 号	<i>B. striata</i>	紫花	27	陕西安康市 2 号	<i>B. striata</i>	紫花
3	安徽宣城市 2 号	<i>B. striata</i>	紫花	28	陕西商洛市	<i>B. striata</i>	紫花
4	安徽六安金寨县	<i>B. striata</i>	紫花	29	湖南张家界	<i>B. striata</i>	紫花
5	安徽铜陵市	<i>B. striata</i>	紫花	30	江西宜春市	<i>B. striata</i>	紫花
6	安徽大别山	<i>B. striata</i>	紫花	31	江西萍乡市	<i>B. striata</i>	紫花
7	云南文山市	<i>B. striata</i>	紫花	32	浙江台州市	<i>B. striata</i>	紫花
8	云南丽江市 1 号	<i>B. striata</i>	紫花	33	浙江丽水缙云县	<i>B. striata</i>	紫花
9	云南丽江市 2 号	<i>B. striata</i>	紫花	34	浙江龙泉市 1 号	<i>B. striata</i>	紫花
10	云南红河建水县	<i>B. striata</i>	紫花	35	浙江龙泉市 2 号	<i>B. striata</i>	紫花
11	湖北黄冈市 1 号	<i>B. striata</i>	紫花	36	浙江淳安威坪镇	<i>B. striata</i>	紫花
12	湖北黄冈市 2 号	<i>B. ochracea</i>	黄花	37	浙江金华磐安县	<i>B. striata</i>	紫花
13	湖北黄冈蕲春县	<i>B. striata</i>	紫花	38	河南卢氏县	<i>B. striata</i>	紫花
14	湖北京山县 1 号	<i>B. striata</i>	紫花	39	河南南阳西峡县	<i>B. striata</i>	紫花
15	湖北京山县 2 号	<i>B. striata</i>	白花	40	广西桂林	<i>B. striata</i>	紫花
16	湖北武穴梅川镇	<i>B. striata</i>	紫花	41	广西河池南丹县	<i>B. striata</i>	紫花
17	湖北宜昌牛庄乡	<i>B. striata</i>	紫花	42	广西钦州市	<i>B. striata</i>	紫花
18	湖北保康县 1 号	<i>B. striata</i>	紫花	43	四川广元市	<i>B. sinensis</i>	白花
19	湖北保康县 2 号	<i>B. sinensis</i>	百花	44	四川巴中大巴山	<i>B. striata</i>	紫花
20	湖北十堰市	<i>B. sinensis</i>	百花	45	四川宜宾屏山县	<i>B. striata</i>	紫花
21	湖北随州市	<i>B. sinensis</i>	白花	46	四川宜宾江安县	<i>B. striata</i>	紫花
22	陕西汉中市 1 号	<i>B. sinensis</i>	白花	47	贵州遵义正安县	<i>B. striata</i>	紫花
23	陕西汉中市 2 号	<i>B. striata</i>	紫花	48	贵州赤水旺隆镇	<i>B. striata</i>	紫花
24	陕西汉中市 3 号	<i>B. striata</i>	紫花	49	贵州六盘水市	<i>B. striata</i>	紫花
25	陕西汉中市 4 号	<i>B. striata</i>	紫花	50	重庆市綦江区	<i>B. striata</i>	紫花

2 方法

2.1 DNA 的提取及检测

用改进的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取健康白及嫩叶的 DNA^[13-14], 并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 选择条带清晰、无降解、无拖尾的样品。筛选完毕后, 使用紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 用双蒸水定浓度至 50 ng/ μ L, -20°C 储存备用。

2.2 SRAP-PCR 引物筛选

以 43 号样品 DNA 为模板, 选出多态性丰富、重复性好且条带清晰的引物组合。

2.3 SRAP-PCR 扩增反应体系

SRAP 通用引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 根据要求稀释至 10 μ mol/L 于 -20°C 冰箱保存备用, PCR 反应相关试剂购于大连宝生物公司。在文献报道^[15]的基础上, 对 SRAP 的 PCR 扩增体系进行了改进, 白及 SRAP-PCR 反应体系总体积为 20 μ L, 其中含 10 \times Buffer 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L, 10 μ mol/L SRAP 引物 1 μ L, DNA 1 μ L, 加入

双蒸水使 PCR 反应所需调节至 20 μ L。PCR 扩增程序: 94°C 预变性 5 min; 第 1 个循环 (5 次): 94°C 变性 1 min, 35°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min; 第 2 个循环 (35 次): 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min; 最终 4°C 下进行保存。SRAP-PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶分离, 经 EB 染色后紫外灯下照相, 获得结果。

2.4 数据分析

每一个样品结果标记为“1”和“0”, 其中“1”表示带赋值, “0”表示无赋值, 然后生成二进制矩阵。使用生物形态软件 (NTSYS-PC v.2.1) 进行聚类分析, 计算各物种间的遗传距离, 按非加权配对算术平均法 (UPGMA) 法与 SAHN 模块得到最终的亲缘关系树形图。

3 结果与分析

3.1 DNA 的提取结果

本研究采集健康白及新叶后, 使用改良的 CTAB 法得到样品 DNA, 结果如图 1 所示, 得到的基因组 DNA 条带清晰, 无明显拖带现象, DNA 没有污染或降解, 能满足后续 PCR 扩增反应。

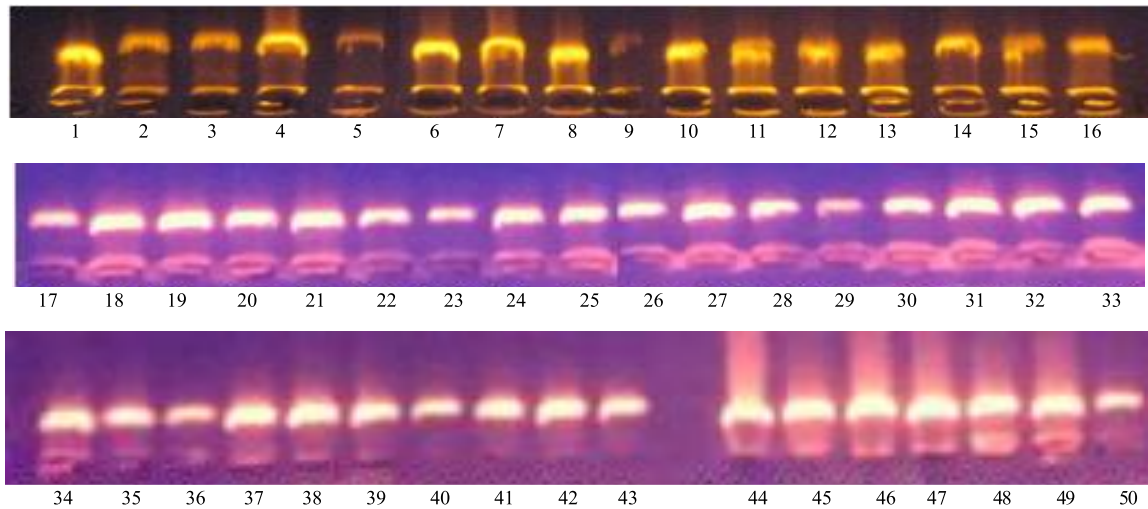


图 1 白及样品基因组 DNA 电泳结果

Fig. 1 Genomic DNA electrophoresis results of *B. striata* samples

3.2 SRAP-PCR 引物筛选及扩增

以 43 号样品 DNA 为模板进行 SRAP 引物组合的筛选 (引物序列见表 2), 从 55 对随机引物组合中筛选出 15 对扩增条带清晰、重复性好和多态性高的 SRAP 引物组合。55 对引物中的 22 对随机引物组合扩增结果如图 2 所示, 最后选用了组合 (me6-em22) 用于后续研究。

筛选获得引物组合见表 3, 用所获得的 15 对引

物组合分别对 50 份白及进行 SRAP 扩增, 共得到 117 个条带, 平均每个引物扩增出 7.8 个条带, 其中多态性条带 106 条, 多态性比率为 90.60%, 图 3 为 Me6/Em22 引物对的 25 份白及样品 SRAP-PCR 结果示例。其中 Me1/Em1、Me2/Em8、Me2/Em12、Me43/Em1 引物组合获得的条带 100% 为多态性条带, 而 Me6/Em22 引物组合扩增获得的条带最多, 具有 14 条, 多态性比率为 92.86%。

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 Primer sequence of SRAP

编号	上游序列 (5'→3')	编号	下游序列 (5'→3')
Me1	TGAGTCCAAACCCGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTTG	Em8	GACTGCGTACGAATTAGC
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em12	GACTGCGTACGAATTAAG
Me11	TGAGTCCAAACCGAACA	Em22	GACTGCGTACGAATTATG
Me16	TGAGTCCAAACCGGAGT	Em37	GACTGCGTACGAATTGAG
Me23	TGAGTCCAAACCGGCTA	Em47	GACTGCGTACGAATTGTC
Me33	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em50	GACTGCGTACGAATTTAG
Me43	GCTCCGGTTTGGACTCA		



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

1~22-随机引物组合

1—22-random primer combination

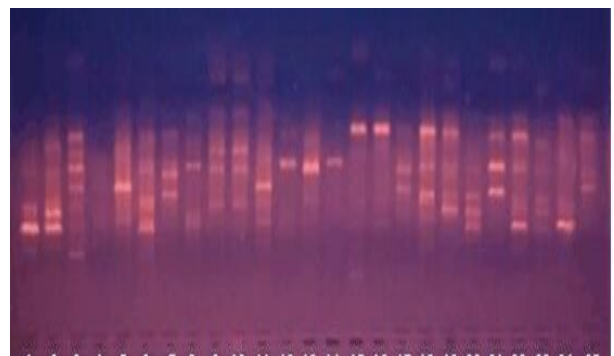
图 2 引物筛选电泳结果

Fig. 2 Result of primer screening

表 3 筛选出的 15 对 SRAP 引物组合扩增结果

Table 3 Amplified results of 15 SRAP primer combinations

引物组合	总带数	多态条数	多态位点百分率/%
Me1/Em1	8	8	100.00
Me1/Em8	7	6	85.71
Me2/Em4	6	5	83.33
Me2/Em6	6	5	83.33
Me2/Em8	6	6	100.00
Me2/Em12	10	10	100.00
Me6/Em12	8	7	87.50
Me6/Em22	14	13	92.86
Me10/Em22	7	6	85.71
Me11/Em22	8	7	87.50
Me16/Em37	6	5	83.33
Me23/Em47	7	6	85.71
Me43/Em1	7	7	100.00
Me43/Em4	7	6	85.71
Me43/Em6	10	9	90.00
总数	117	106	90.60
平均值	7.8	7.1	90.60



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

图 3 Me6-Em22 引物对 25 种白及的 SRAP-PCR 结果

Fig. 3 Result of SRAP-PCR at Me6-Em22 Primer with 25 *B. striata*

3.3 白及遗传距离聚类分析

用 NTsys-2.1 软件对 15 对引物的扩增结果进行聚类, 获得聚类树状图, 结果见图 4。聚类结果表明: 50 份野生白及间的遗传距离在 0.59~0.87。以遗传系数 0.66 为基准, 50 份白及样品可以分成 6 大类: 其中 24 号来自陕西汉中市 3 号的紫花白及独为第 1 类, 与其他供试样品遗传距离最远; 37 号浙江金华磐安县紫花白及与其他样品的白及遗传距离较远, 为第 2 类; 第 3 类由 4、8、21、29、48 号组成; 第 4 类由 23、34、38、28、35、43 号组成; 第 5 类由 3、26、40 号组成; 其他 34 份白及为第 6 类。其中第 6 类又可分为 2 小类, 第一小类包括 22 份样品, 分别为 5、17、13、41、44、6、14、20、50、19、45、9、15、49、27、39、10、30、36、42、46、33 号, 其中 9 号云南丽江市 2 号和 15 号湖北京山县 2 号的 2 份白及遗传距离最近, 达 0.87; 剩余 12 份归为第 2 小类。

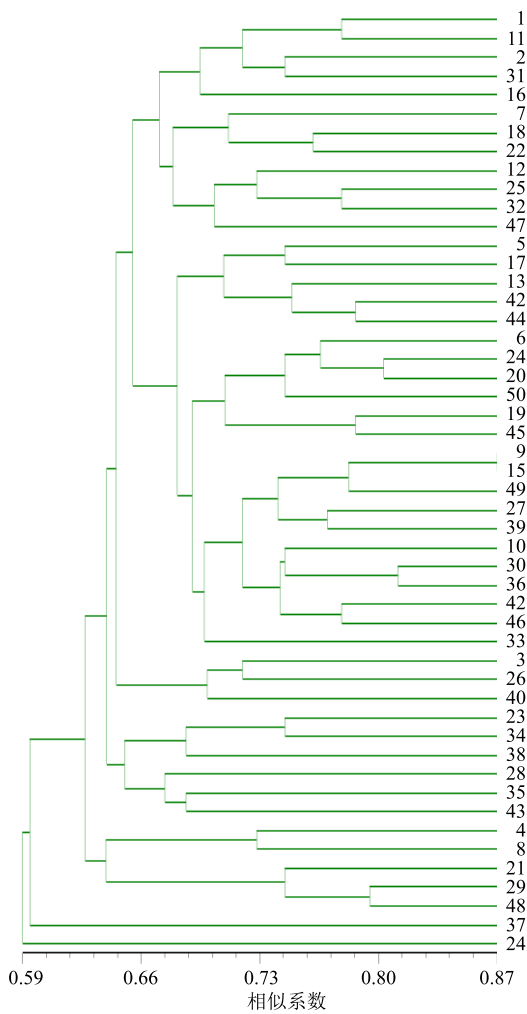


图 4 50 份白及的 SRAP 聚类结果

Fig. 4 Results of clustering of the 50 *B. striata* with SRAP

4 讨论

白及是国家二级保护植物，也是珍贵的药物资源，因其野生资源匮乏，已被列作国家珍稀濒危保护植物^[16]。白及种子不易萌发，主要以假鳞茎的块茎进行繁殖，且相邻的假鳞茎呈串联状^[17]，所以在白及采集时需留存余种，无限制采掘会严重危害白及的可再生利用。随着人类社会的进步与发展，白及生产中出现问题也十分严重，如品种的退化、遗传多样性降低、药材污染、有毒有害物质超标等，白及资源的保护迫在眉睫，保护白及遗传多样性是目前急需开展的工作。

全世界兰科植物种类占地球高等植物的一成左右，且有研究表明，地理分布水平与遗传多样性高低呈现一定相关性^[18]。白及属植物是兰科的一种，且在我国分布广泛，所以在遗传多样性水平上应具有较高水平。本研究利用 SRAP 分子标记对来

自全国 50 份野生白及的遗传距离进行分析，结果显示，15 对 SRAP 引物得到的多态性条带为 90.60%，表明本实验采集的白及具有丰富的遗传多样性水平，也从 DNA 水平上验证了白及居群丰富的遗传变异能力，说明白及具有较强的进化潜能，为后续白及属植物资源的保护、利用和评价奠定了良好基础。

从聚类分析中可以看出，24 号来自陕西汉中市 3 号的紫花白及的品种较为独特，与其他白及样品的遗传距离较远，进一步分析发现，该白及采自某家庭小花园的角落，与其他种植的家养植物距离较近。有研究表明，不同地理环境会造成不同种源的物候期、形态特征以及经济性状产生差异^[19]，基于此怀疑 24 号白及生长过程中，可能由于与其他植物长期生长在一起，受到了异花授粉的影响，出现种间杂交，使之遗传性状发生改变，这才与其他的白及有了明显的差异，遗传距离也较远。在相似性矩阵中，发现供试 50 份白及样品聚类结果中，采集自地理位置较近的 23 号陕西汉中市 2 号白及和 24 号陕西汉中市 3 号白及遗传距离较远；而地理位置较远的 9 号云南丽江市 2 号和 15 号湖北京山县 2 号的 2 份白及遗传距离却达到最近，为 0.87；而且 18 号湖北保康县 1 号紫花白及和 22 号陕西汉中市 1 号白花白及的遗传距离与其他样品相比也较近。说明白及的遗传差异与地理分布和形态的差异并无直接相关性，这也可能是由于地区间引种交流所致，野生白及多为和其他植物生长较近，而导致同一种属的白及因为外界环境的变化而产生遗传性状差异，具体原因还有待进一步深入研究。根据聚类图，以不同遗传系数为基准进一步分析，可以发现，除去只采集一种样品的省份外，每个省份的样品均可聚类多种类别，其中以安徽、陕西、湖北的类别最多，所以推测这些省份未设置适当的隔离措施，导致种间交流剧烈。

白及的种质分析从外形上难以确切的分类，且由于不同来源的白及因为环境和自身的变化发生了微小的变异，因此分析标记在区分白及的多样性遗传和种类鉴别中扮演重大的角色。SRAP 作用于相对保守的外显子与变异大的内含子、启动子与间隔区，因此，多数 SRAP 标记在基因组中是均匀分布的^[20-21]；在聚类分析的结果中可以推测出白及的多态性中外显子受到的变化较大，所以在人工栽培的时候，种间需要适当的隔离措施，来保存其优良

种质,使其能够稳定地遗传下去。另外在文献中发
现性状互补的种质也可通过杂交进行品种改良^[22]。

利用 SRAP 标记技术对野生白及进行遗传多样
性分析,结合白及块茎性状、药效成分的分析,可
对市场中的常见的优良品种可以进行指导培育,也
为研究白及遗传指纹图谱、杂交育种的亲本选择、
品种鉴定、新品种保护、品种分类等奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘芳. 浅谈中药白及的药理作用 [J]. 医学信息, 2014(4): 371.
- [2] 刘光斌, 黄忠, 黄长干, 等. 天然植物白及胶的功能及在化妆品中的应用 [J]. 日用化学品科学, 2005, 28(8): 22-24.
- [3] 周涛, 江维克, 魏升华, 等. 野生白及的资源调查和利用现状分析 [A] // 中华中医药学会第九届中药鉴定学术会议论文集——祝贺中华中医药学会中药鉴定分会成立二十周年 [C]. 中华中医药学会中药鉴定分会, 2008.
- [4] 李伟平, 何良艳, 丁志山. 白及的应用及资源现状 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 158-160.
- [5] 余磊磊, 周京龙, 高中南, 等. 野生白及再生体系的建立及抗性筛选 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 43-46.
- [6] 胡峻. 白及的资源学研究 [A] // 中国商品学会. 第四届中国中药商品学术大会暨中药鉴定学科教学改革与教材建设研讨会论文集 [C]. 中国商品学会: 中国商品学会, 2015.
- [7] 黎君, 杨恒, 周天华. 白及 SSR 引物筛选及群体遗传多样性研究 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(7): 1343-1350.
- [8] 梁小玉, 季杨, 白史且, 等. 基于 SRAP 分子标记构建的菊苣遗传连锁图谱 [J]. 草业学报, 2015, 24(5): 153-158.
- [9] 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(7): 455-461.
- [10] 李怀志, 刘士辉, 沈若刚, 等. 铁皮石斛种质资源遗传多样性的 SRAP 分析及指纹图谱构建 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(14): 126-128.
- [11] 孙宇龙, 侯北伟, 耿丽霞, 等. 基于 SRAP 标记的白及遗传多样性和遗传结构评价 [J]. 药学学报, 2016, 51(1): 147-152.
- [12] 朱英, 刘永翔, 黄永会, 等. 白及属种质资源的 SRAP 标记分析 [J]. 贵州农业科学, 2012, 40(9): 10-13.
- [13] 仲艳. 枇杷 (*Eriobotrya Lindl*) 核基因组 DNA 提取方法的改良及其 SSR 初步分析 [D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [14] 寇小霞, 代培红, 罗淑萍, 等. 大赖草基因组 DNA 提取方法比较分析 [J]. 湖北农业科学, 2015, 54(17): 4324-4327.
- [15] 蒋瑞彬, 徐旭栋, 蓝小明, 等. 野生白及 SRAP-PCR 反应体系的优化 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 353-355.
- [16] 和志娇, 吕丽芬, 杨丽云, 等. 白及种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西南农业学报, 2008, 21(4): 1081-1085.
- [17] 曹琦, 王学平. 药用白及的生物学特性及其保护 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(18): 175-176.
- [18] 石晶. 白及属植物资源与利用 [D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [19] 徐中志, 谭敬菊, 陈翠, 等. 不同白及种源分析评价与利用研究 [J]. 江西农业学报, 2011, 23(1): 90-92.
- [20] Zhang Y X, Sun J, Zhang X R, et al. Analysis on genetic diversity and genetic basis of the main sesame cultivars released in China [J]. *Agri Sci China*, 2011, 10(4): 509-518.
- [21] 周洁, 王忠华. DNA 分子标记技术在药用植物上的应用 [J]. 科技创新导报, 2011, 20(4): 41-43.
- [22] 张妙彬, 潘丽晶, 范干群, 等. 富含多糖的转基因石斛基因组 DNA 提取方法 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 209-214.