

白及种质资源及其近缘种的 SSR 指纹图谱研究

周天华^{1,2}, 黎 君¹, 丁家玺¹, 杨 恒¹, 陈世丽¹

(1 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001; 2 陕南秦巴山区资源生物综合开发协同创新中心, 陕西汉中 723001)

摘 要: 白及(*Bletilla striata* Rchb.) 为中国珍稀濒危药用植物, 野生资源枯竭, 混伪种繁多。该研究基于 SSR 标记技术对 16 个地区 48 份白及(*Bletilla striata* Rchb.) 样品和 4 份黄花白及(*Bletilla ochracea* Schltr.)、4 份小白及(*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.)、4 份华白及(*Bletilla sinensis* (Rolfe) Schltr.) 样品进行遗传多样性分析, 构建白及种质资源的 SSR 指纹图谱, 并对 60 份白及样品进行种质资源鉴定, 分析白及属种内及其种间的遗传分化特征。结果表明: (1) 20 对白及 SSR 引物均能在 4 个白及属植物中成功扩增, 条带清晰且多态性丰富, 每对引物的复等位基因数(N_a) 在 4~9 之间, 等位基因数(N_a) 总和为 127, 平均为 6.35。(2) 筛选出基因型丰富、多态性信息含量(PIC) 高的 7 对白及 SSR 引物(BJSSR01、BJSSR14、BJSSR15、BJSSR16、BJSSR18、BJSSR19、BJSSR22) 构建的白及 SSR 指纹图谱能将白及属各种质资源清楚分开。(3) 白及属在种间水平平均有较高的遗传多样性($N_a = 6.35$, $I = 1.429$, $h = 0.706$), 物种间遗传分化强烈($G_{st} = 0.44$), 物种间的基因流较弱($N_m = 0.475$)。 (4) UPGMA 聚类分析表明, 60 份供试样品明显聚为 4 大支, 同一物种的个体首先聚在一起, 这与形态学分类基本一致; 不同来源地的样品种内和种间的亲缘关系有明显差异, 地理距离较近的白及样品具有较近的遗传关系。

关键词: 白及属; SSR 指纹图谱; 种质资源

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

SSR Fingerprinting of *Bletilla striata* Rchb. f. Germplasm and Its Relatives or Congeners

ZHOU Tianhua^{1,2}, LI Jun¹, DING Jiayi¹, YANG Heng¹, CHEN Shili¹

(1 College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China; 2 Qinling-Bashan Mountains Bioresources Comprehensive Development Collaborative Innovation Center, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

Abstract: *Bletilla striata* Rchb. is an endangered plant with important medicinal values. It has many adulterants, while its wild resources was exhausted. In this study, 48 individuals of *B. striata* sampled from 16 populations, and 4 individuals from its each 3 relatives, including *B. ochracea*, *B. formosana* and *B. sinensis*, were analyzed with SSR markers aiming to reveal their genetic diversity and relationship, to construct their SSR fingerprinting. The results showed that: (1) 20 pairs of primer performed high polymorphism, the alleles ranged from 4 to 9 with summary 127 and average of 6.35 per primer, all of 20 prim-

收稿日期: 2017-01-18; **修改稿收到日期:** 2017-03-20

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划(2015JM3115); 陕西省科技厅项目(2015KTTSSF01-02); 秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心 2016 年度自然科学基金(QBXT-Z(P)-15-10); 陕西理工学院 2015 年研究生创新基金(SLG YCX1524); 陕西理工学院 2015 年大学生创新创业训练计划项目(UIRP15067)

作者简介: 周天华(1976—), 男, 博士, 讲师, 主要从事植物资源学研究。E-mail: 444721689@qq.com

er were proved amplifiable in 4 species; (2) 7 pairs of primers, BJSSR01, BJSSR14, BJSSR15, BJSSR16, BJSSR18, BJSSR19 and BJSSR22, which performed higher polymorphism, higher polymorphism information content (*PIC*), were used to build the SSR fingerprints of *B. striata* and its adulterants. (3) The study revealed that the genetic diversity of *B. striata* was high ($N_a = 6.35$, $I = 1.4291$, $H = 0.7068$), genetic differentiation was prominent among species ($G_{st} = 0.44$), and the gene flow among species was limited ($N_m = 0.4753$). (4) 4 major groups were generated from 60 accessions tested by UPGMA clustering analyses. Samples from same species were cluster together firstly, which is matched with their morphological taxonomy. Significant differences were revealed not only among the species, but also among the germplasms from different regions. Those with shorter geographic distance performed a tighter genetic relationship. The selection and protection of the excellent varieties of *B. striata* were also discussed.

Key words: *Bletilla* Rehb. ; SSR fingerprint; germplasm

白及(*B. striata* Rehb.)为兰科白及属(*Bletilla* Rehb. f.)多年生草本植物,又名连及草、紫兰(根)等。白及属在中国分布有4个种,分别为白及、黄花白及(*B. ochracea* Schltr.)、小白及(*B. formosana* Schltr.)和华白及(*B. sinensis* Schltr.),分布区域北起江苏、河南,南至台湾,东起浙江,西至西藏东南部(察隅)^[1]。白及以干燥块茎入药为中药白及,味苦、甘、涩,性微寒,归肺、肝、胃经,具有收敛止血,消肿生肌的功能,主要用于治疗咳血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂等^[2],素有“必涩而收,入肺止血,生肌治疮,外科最善”之称。

目前中国药材市场上的白及主要来源于野生资源,随着医药行业对白及的开发利用,供需矛盾突出,其野生资源遭到过度采挖,加之白及种子细小、萌发率极低、自然繁殖困难且生长缓慢,药材白及的后续供应已成为一个严重的问题。近年来湖南、贵州、陕西等地陆续开始人工种植白及,但由于技术落后、成本高昂,严重限制了白及规模化生产种植^[3]。有研究者对湖北、湖南、云南、四川、贵州、浙江、江西以及安徽8个省份的人工种植白及进行了全面调查,结果表明调查区野生白及均存在资源锐减、濒临灭绝、人工栽培规模小、品质低等诸多问题^[4],此外有些白及品种引种后变异和退化现象明显。白及的人工栽培方法的优化以及优良品种的选育已成为解决白及资源匮乏的必然选择。

据长期野外调查和搜集文献,发现白及道地产区私挖滥采现象严重,野生资源遭受破坏,导致白及价格居高不下,药材掺伪或地区习用品作为正品白及出售的现象也普遍存在,严重影响了中药白及的质量。白及属4种植物假鳞茎均供药用且在中国分布范围较广,此两点是促使产生白及地区习用品的内在因素^[5]。小白及的干燥块茎瘦小而干枯,药效较差,黄花白及和华白及的药效也均不及白及^[6]。

此外,市场已知的白及混伪品还有山慈菇(*Iphegionia indica* L. Kunth.)^[7]、天麻(*Gastrodia elata* Bl.)^[8]、黄精(*Polygonatum sibiricum* F. Delaroch.)和玉竹(*Polygonatum odoratum* M. Druce.)^[9]等。白及混伪品的鉴定检测已成为规范白及中药市场的当务之急。

简单序列重复(SSR, Simple Sequence Repeat),又称微卫星DNA(Microsatellite DNA),是一类由1~6个碱基组成的基序串联重复而成的DNA序列^[10]。不同等位基因间的重复数存在丰富的差异,且重复序列两侧多是相对保守的单拷贝序列,可以通过设计特异引物,对基因组总DNA进行PCR扩增,扩增片段的长度多态性可用作分子标记。微卫星标记多态性丰富,重复性好,标记多呈共显性,在基因组中分散分布,现已证明微卫星DNA存在于绝大多数真核生物基因组中^[11],微卫星分子标记技术已广泛应用于遗传图谱构建、品种指纹图谱绘制、品种纯度检测及目标性状分子标记筛选等领域。关于白及属植物的鉴定,除形态学、理化性质、高效液相指纹图谱^[12-14]以外,鲜有DNA指纹图谱鉴定方面的报道。

本研究利用白及SSR引物对药用植物白及及其同属黄花白及、小白及、华白及进行SSR指纹图谱研究,并对白及及其近缘种进行遗传多样性分析,构建白及种质资源的SSR指纹图谱,为珍稀药用植物白及种间区分以及品种鉴定提供分子依据,且分析了白及属种内及其种间的遗传分化指数,为白及这种重要资源植物的保护提供理论支撑。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本研究选取16个地区48份白及(*B. striata*)、4份黄花白及(*B. ochracea*)、4份小白及(*B. for-*

mosana)、4 份华白及(*B. sinensis*)样本的新鲜叶片为试验材料,用于白及种质资源以及近缘种的鉴定和种间遗传变异分析。样品分别于 2014~2016 年采集,所有样品的凭证标本保存于陕西理工大学生物科学与工程学院植物分子生态学实验室。

1.2 方 法

1.2.1 总 DNA 的提取 采用改良 2×CTAB 法^[15]提取 60 份供试样品的基因组 DNA,使用紫外分光光度计(NanoDrop2000)检测 DNA 浓度和 A_{260}/A_{280} 吸光比值并用浓度为 0.9% 琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性,凝胶成像仪拍照观察并记录结果。

1.2.2 PCR 扩增与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 利用开发及筛选的 20 对白及引物^[16]对 60 份供试样品的 DNA 进行扩增。PCR 总反应体系为 10 μ L,包括 DNA 模板 25 ng,2×Mix(天根生物科技)5 μ L,正反引物各 25 ng,ddH₂O 至 10 μ L。PCR 反应在 PCR 扩增仪(Bio-Rad S1000TM)上按以下程序运行:首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度下 45 s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 45 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

完成 PCR 扩增 24 h 内,取 2 μ L PCR 产物在 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压 160 V 电泳 14 h,以 PUC-18(天根生物)为 DNA Marker。用 NaOH 银染方法进行染色显影。各种溶剂配方和体积为:银染液,AgNO₃ 1 g,去离子水 500 mL;显影液,NaOH 15 g,甲醛 2 mL,去离子水 500 mL。银染程序为:去离子水漂洗 30 s,银染 30 min,去离子水漂洗 30 s,在显影液中轻摇至显带。显影完成之后,用凝胶成像系统(Bio-Rad Gel DOCTM XR+)采集图像并进行数据统计分析。

1.2.3 白及属的遗传多样性分析 观测扩增产物及目标产物的杂合度,使用 Excel 2007 和 Bio-Rad Quantity 软件对电泳后的凝胶图像进行条带统计,采用人工读带的方式,记录主要带型,忽略弱杂带。应用 POPGENE Version 1.3.2^[17] 软件,计算各引物的等位基因数目(N_a),期望杂合度(H_e),观测杂合度(H_o),多态性信息含量(PIC)等。POPGENE Version 1.32 软件计算白及属 4 种植物的等位基因数(N_a)、遗传杂合度(H_e)、Nei's 遗传多样性指数(H)和基因流(N_m)等。此外,还使用 Arlequin 3.5^[18]对白及属 4 个物种进行分子方差分析(Analysis of molecular variance, AMOVA),计算其遗传分化系数(G_{st})。

1.2.4 白及 SSR 指纹图谱构建 DNA 指纹图谱

形成的重要条件是 SSR 扩增产物带型的识别和记录。依据聚丙烯酰胺凝胶上 SSR 扩增产物条带大小对每对引物生成的基因型带型进行编号,简化白及 SSR 带型记录方法,建立起 DNA 分子指纹图谱。应用 POPGENE Version 1.3.2 软件计算不同样品的遗传距离和遗传一致度,基于遗传一致度使用 NTSYS-pc 2.10e 软件计算不同材料间的遗传相似性系数,UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 引物扩增效果与材料遗传多样性

紫外分光光度计检测结果显示,提取到的白及属植物 DNA 浓度均在 40~200 ng/ μ L 之间, A_{260}/A_{280} 吸光比值均在 1.6~2.1 之间;琼脂糖凝胶电泳显示,提取到的白及属植物 DNA 长度均大于 2 000 bp,能够用于扩增及检测。20 对 SSR 引物对 60 份不同来源的材料扩增结果显示,所有样品均成功扩增出条带(114~335 bp),具有较高的稳定性和多态性。POPGENE Version 1.32 软件对 20 对白及 SSR 引物进行遗传多样性分析,得到等位基因数及观察杂合度和遗传多样性指数等群体多态性信息(表 1)。20 对 SSR 引物中检测到 4~9 个不等的等位基因数,平均等位基因数目为 6.35 个,观测等位基因数总和为 127,有效等位基因数总和 70.980 1。这些微卫星引物的 H_o 为 0.450 0~0.716 7,平均值为 0.575 0; H_e 为 0.600 1~0.803 5,平均值为 0.712 7。就单个引物位点而言,通常其 H_e 总是大于 H_o ^[19]。Shannon 信息指数范围为 1.041 0~1.762 9,平均值为 1.429 1;遗传多样性指数范围为 0.595 1~0.796 8,平均值为 0.706 8。通过分析发现白及属植物具有较高的遗传多样性。

2.2 白及属植物的遗传多样性与遗传分化

通过分析发现白及在种内水平平均有较高的遗传多样性($N_a=5.050 0$, $H_e=0.648 0$, $I=1.193 1$, $H=0.641 3$)(表 2),黄花白及、小白及和华白及的遗传多样性指数分别为 0.345 3、0.459 4 和 0.503 1,白及遗传多样性明显高于黄花白及、小白及和华白及,说明白及的遗传背景复杂,具有很高的进化潜能。分析白及属 4 种植物的遗传距离,发现黄花白及和小白及遗传距离最近(0.501 9);黄花白及和小白及遗传距离最远(2.466 0);通过 AMOVA 分析得出,白及属 4 种植物物种间的遗传分化强烈($G_{st}=0.44$),物种间的基因流较弱($N_m=0.475 3$),说明遗传变异主要存在于物种内,且物种间的基因交流程度

表 1 本研究所用的 20 对 SSR 引物及其遗传多样性

Table 1 The genetic diversity of 20 SSR primer pairs used in this study

SSR 引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'→3')		重复 单元 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature (<i>T_A</i>) / °C	产物大小 Product size/ bp	基因型数 No. of genotypes	观测等位 基因数 Observed number of alleles(<i>N_e</i>)	多态性				
	正向序列 Forward	反向序列 Reverse						观测杂合度 Observed heterozygosity (<i>H_e</i>)	期望杂合度 Expected heterozygosity (<i>H_e</i>)	信息含量 Polymorphism information content (<i>PIC</i>)	Shannon 信息指数 Shannon's information index(<i>I</i>)	遗传多样性指数 Genetic diversity(<i>H</i>)
BJSSR01	GCCACTTACAATCATCAACCA	CGTAGCTTCTTCTTCTTCTTC	(GAA) ₅	56.30	249~267	12	7	0.600 0	0.746 1	0.703 6	1.551 5	0.739 9
BJSSR02	GGGTTGGCACTGGGGCGTTGT	CACCCAGCCGATGTACTT	(ACA) ₇	63.15	154~169	10	6	0.466 7	0.729 7	0.683 5	1.463 1	0.723 6
BJSSR03	TCTAGCACGAATCTCGATG	TGGATTGGACAGGCTTAAC	(TC) ₁₁	57.15	185~193	11	6	0.633 3	0.728 9	0.676 8	1.417 0	0.722 8
BJSSR04	CTCTCTCAGTTTTAGGTGCAT	GAATCCGAACACATTTGGTAGT	(CA) ₁₂	56.30	209~217	9	6	0.683 3	0.724 5	0.670 0	1.392 6	0.718 5
BJSSR05	ACAATGCACATCCCTAGTCAT	TGATGCACCCCAGCCGATGTA	(ACA) ₈	59.30	164~182	8	7	0.550 0	0.615 1	0.555 2	1.199 5	0.610 0
BJSSR06	AAAGTCAGCAGCATCTACAGT	GAGCAGAGAATAAGAACTCT	(TCCCC) ₅	56.30	165~183	7	4	0.466 7	0.607 4	0.522 5	1.041 0	0.602 4
BJSSR07	TGTGAGAGGGATGATAAGACT	TCCCAAAACCTAAGCCCTCCGA	(AG) ₁₇	58.30	169~177	8	6	0.716 7	0.748 6	0.699 7	1.481 1	0.742 4
BJSSR09	AAAATGAGCCGATGACCTC	GCCAGTCTCTCCAAAGTTCAACCA	(TC) ₁₀	59.15	227~235	8	5	0.450 0	0.751 0	0.699 5	1.443 5	0.744 7
BJSSR11	CAGTAGTTTGGGTCCACA	CCCAACGCAATCCATCAGCT	(GAT) ₁₂	60.00	322~341	10	6	0.583 3	0.654 5	0.586 5	1.242 3	0.649 0
BJSSR13	GATTCAATGTAGCCGACCCAC	GTAGTAGCCCCATAATCTAAC	(TTG) ₆	59.30	167~182	9	7	0.616 7	0.675 6	0.616 5	1.343 9	0.670 0
BJSSR14	CAATGGGCAGTTTGTGGAGC	CCCACAGGAGGAACCTTGGTGT	(CAA) ₇	62.30	127~139	9	5	0.500 0	0.759 9	0.713 8	1.495 1	0.753 6
BJSSR15	GATCCTCATGCAGAAACCTAG	GCTTGTTCCGTCGCTATT	(TTG) ₇	58.15	187~202	13	8	0.616 7	0.803 5	0.769 5	1.753 2	0.796 8
BJSSR16	ACTTACCCGAAAACCTCACC	CACCCAGCCGATGTACTTAG	(AAC) ₁₀	59.15	221~239	11	7	0.633 3	0.774 8	0.735 1	1.656 2	0.768 3
BJSSR17	CTCCGAAATCCCAAGCCCTA	AAGCCTACGAAAGTCCAAGAT	(TC) ₁₀	59.00	132~142	11	8	0.650 0	0.732 4	0.684 4	1.555 7	0.726 2
BJSSR18	GATTCAATGTAGCCGACCCAC	CGTATTACACAGGATTACAC	(TTG) ₉	59.30	187~206	15	9	0.516 7	0.795 8	0.759 3	1.762 9	0.789 2
BJSSR19	AACAGCTTTTCCAAACCCCT	GGGAGAAACGGGAGAGATTTT	(TC) ₁₀	58.15	146~152	10	7	0.583 3	0.749 7	0.710 5	1.597 1	0.743 5
BJSSR20	CCAAGGTGAGAAATTTCAACCG	TCCGTACTACTCCAACAC	(TTG) ₉	55.15	114~126	9	5	0.516 7	0.677 5	0.626 0	1.300 2	0.671 8
BJSSR22	CTGAATCGGATGCCCTAATTT	GCTTCAATGTTGACGGTTT	(TC) ₁₇	55.15	325~335	14	9	0.650 0	0.740 9	0.695 9	1.630 3	0.734 7
BJSSR23	TGAAGAGGAGGATGACACC	GGGTGGGAAAAAACAACACT	(GAT) ₁₈	58.15	197~209	9	5	0.550 0	0.600 1	0.531 8	1.117 9	0.595 1
BJSSR24	CCTCAACAATCCCTTAACTCG	TACCCAGCCGATGTACTTAG	(AAC) ₇	59.30	229~238	7	4	0.516 7	0.638 2	0.574 4	1.138 7	0.632 9
Mean				10	6.35	0.575 0	0.712 7	0.660 7	1.429 1	0.706 8		

表 2 白及属物种间基因流及遗传分化参数

Table 2 The parameters of genetic differentiation and the estimates of gene flow among species of *Bletilla* Rchb. f.

物种 Species	平均等位 基因数 Number of alleles(N_a)	有效等 位基因 Effective number of alleles(N_e)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Excepted heterozygosity (H_e)	Shannon 信息指数 Shannon's information index(I)	遗传多样 性指数 Genetic diversity (H)	基因流 Gene flow (N_m)
白及 <i>B. striata</i>	5.050 0	2.874 1	0.567 7	0.648 0	1.193 1	0.641 3	
黄花白及 <i>B. ochracea</i>	1.800 0	1.638 6	0.537 5	0.394 6	0.495 4	0.345 3	
小白及 <i>B. formosana</i>	2.300 0	2.033 6	0.650 0	0.525 0	0.708 3	0.459 4	
华白及 <i>B. sinensis</i>	2.350 0	2.048 6	0.625 0	0.575 0	0.758 1	0.503 1	
平均水平 Average level	2.875 0	2.148 7	0.595 1	0.535 7	0.788 7	0.487 3	
种间水平 Inter-species level	6.350 0	3.549 0	0.575 0	0.712 7	1.429 1	0.706 8	0.475 3

表 3 60 份供试样品编号、来源及其扩增图谱

Table 3 Code and origin of *Bletilla* Rchb. f. accessions used in this study

样本与 编号 Species &. code	采样地 Sample location	SSR 引物 SSR Primer													
		BJSSR01		BJSSR14		BJSSR15		BJSSR16		BJSSR18		BJSSR19		BJSSR22	
白及 <i>B. striata</i>															
LG01	陕西岚皋 Langao, Shaanxi	255	258	136	136	187	190	227	227	197	197	148	148	327	329
LG02	陕西岚皋 Langao, Shaanxi	258	258	139	139	187	190	227	227	194	194	148	148	329	327
LG03	陕西岚皋 Langao, Shaanxi	258	255	139	136	190	190	230	227	194	194	148	148	329	329
ZB01	陕西镇巴 Zhenba, Shaanxi	255	255	136	139	190	190	230	227	194	197	146	148	329	329
ZB02	陕西镇巴 Zhenba, Shaanxi	255	258	139	139	190	190	227	230	197	194	148	148	327	329
ZB03	陕西镇巴 Zhenba, Shaanxi	258	255	139	139	190	187	227	230	197	194	146	148	327	329
LN01	甘肃陇南 Longnan, Gansu	258	258	136	139	187	187	227	230	197	197	148	148	327	329
LN02	甘肃陇南 Longnan, Gansu	255	258	136	139	187	187	230	227	197	194	148	146	327	329
LN03	甘肃陇南 Longnan, Gansu	255	258	136	136	187	187	230	230	194	197	146	148	327	329
HB01	湖北十堰 Shiyan, Hubei	261	258	127	130	193	196	227	230	197	194	146	146	327	327
HB02	湖北房县 Fangxian, Hubei	252	252	133	136	196	193	224	224	194	194	148	148	327	327
HB03	湖北房县 Fangxian, Hubei	252	255	136	136	190	187	227	230	194	194	148	150	327	329
CQ01	重庆涪陵 Puling, Chongqing	258	258	133	133	193	196	227	230	191	194	148	148	327	329
CQ02	重庆涪陵 Puling, Chongqing	261	258	139	136	193	190	230	227	194	194	148	150	327	329
CQ03	重庆涪陵 Puling, Chongqing	255	258	136	139	187	190	227	230	194	197	146	148	327	329
GD01	广东韶关 Shaoguan, Guangdong	267	267	136	133	196	193	233	233	200	200	148	150	331	331
GD02	广东韶关 Shaoguan, Guangdong	267	264	130	133	193	196	230	233	197	200	146	148	331	333
GD03	广东韶关 Shaoguan, Guangdong	261	258	130	133	190	190	233	230	197	200	146	148	331	331
GZ01	贵州遵义 Zunyi, Guizhou	249	252	133	133	193	193	221	221	191	191	150	148	327	327
GZ02	贵州遵义 Zunyin, Guizhou	255	255	133	133	190	193	227	230	191	191	146	146	327	327
GZ03	贵州遵义 Zunyi, Guizhou	258	258	133	133	193	193	227	227	191	191	146	146	327	327
HN01	湖南张家界 Zhangjiajie, Hu'nan	261	258	130	130	190	193	233	230	197	200	148	148	327	329
HN02	湖南张家界 Zhangjiajie, Hu'nan	261	261	133	133	193	190	230	233	197	197	146	148	327	329
HN03	湖南张家界 Zhangjiajie, Hu'nan	261	258	136	133	193	193	233	230	197	200	148	150	329	327
FJ01	福建南平 Nanping, Fujian	258	261	133	133	196	196	227	227	191	191	148	150	327	329
FJ02	福建南平 Nanping, Fujian	261	261	136	136	196	196	227	227	191	194	150	150	327	329
FJ03	福建南平 Nanping, Fujian	258	261	136	136	196	193	227	230	194	194	148	150	327	327

续表 3 Continued Table 3

样本与 编号 Species &. code	采样地 Sample location	SSR 引物 SSR Primer													
		BJSSR01		BJSSR14		BJSSR15		BJSSR16		BJSSR18		BJSSR19		BJSSR22	
ZJ01	浙江桐庐 Tonglu, Zhejiang	258	261	133	136	193	196	227	230	191	194	150	148	327	329
ZJ02	浙江桐庐 Tonglu, Zhejiang	258	258	133	136	193	196	227	230	191	194	148	150	327	329
ZJ03	浙江桐庐 Tonglu, Zhejiang	258	261	133	133	193	196	227	227	191	191	150	150	327	329
JX01	江西武宁 Wuning, Jiangxi	258	258	136	133	193	196	227	230	191	191	150	150	329	329
JX02	江西武宁 Wuning, Jiangxi	258	261	133	136	193	193	227	230	191	194	148	150	327	329
JX03	江西武宁 Wuning, Jiangxi	258	258	133	133	193	196	227	230	191	194	148	150	327	327
JS01	江苏丹阳 Danyang, Jiangsu	261	258	130	127	193	196	227	230	197	194	146	148	327	329
JS02	江苏丹阳 Danyang, Jiangsu	261	261	133	133	196	193	227	230	194	197	146	146	329	329
JS03	江苏丹阳 Danyang, Jiangsu	261	261	127	130	193	193	230	230	194	194	146	148	327	329
AH01	安徽池州 Chizhou, Anhui	258	258	136	136	196	193	230	230	194	194	148	148	327	329
AH02	安徽池州 Chizhou, Anhui	261	258	133	136	193	196	236	236	188	191	148	148	327	329
AH03	安徽池州 Chizhou, Anhui	255	258	136	136	193	193	227	227	194	194	148	148	325	327
YX01	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	258	261	133	136	193	196	230	227	191	191	150	150	329	329
YX02	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	261	261	133	133	193	193	230	227	191	191	150	148	329	329
YX03	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	261	264	136	136	196	193	230	230	191	194	148	150	327	329
GX01	广西罗城 Luocheng, Guangxi	261	258	133	133	184	184	233	233	194	197	144	144	323	325
GX02	广西罗城 Luocheng, Guangxi	258	261	130	133	181	184	233	233	194	197	142	144	329	327
GX03	广西罗城 Luocheng, Guangxi	258	261	133	133	196	193	233	233	191	194	148	148	329	329
HY01	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	264	267	133	136	193	196	233	230	197	197	146	148	329	329
HY02	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	264	267	133	133	193	193	230	230	197	200	146	148	329	331
HY03	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	255	252	136	139	196	196	227	227	188	188	148	150	327	329
黄花白及 <i>B. ochracea</i>															
HH01	陕西汉中 Hanzhong, Shaanxi	258	255	130	127	187	184	224	221	187	191	144	144	323	321
HH02	陕西安康 Ankang, Shaanxi	258	258	130	127	184	184	224	221	187	191	142	144	321	321
HH03	四川雅安 Yaan, Sichuan	258	255	130	127	184	187	224	221	187	191	144	142	321	323
HH04	四川泸州 Luzhou, Sichuan	258	258	127	127	184	184	224	221	191	191	142	144	323	323
小白及 <i>B. formosana</i>															
X01	贵州雷山 Leishan, Guizhou	255	258	130	130	184	187	221	224	187	187	142	140	325	323
X02	云南大理 Dali, Yunnan	255	255	127	127	184	187	221	224	187	187	142	140	325	325
X03	云南维西 Weixi, Yunnan	255	255	130	127	184	187	221	224	189	187	142	140	325	325
X04	云南香格里拉 Xianggelila, Yunnan	258	258	127	130	184	187	221	224	187	187	142	140	323	323
华白及 <i>B. sinensis</i>															
H01	云南楚雄 Chuxiong, Yunnan	264	264	136	136	199	202	236	239	203	206	150	152	333	335
H02	云南楚雄 Chuxiong, Yunnan	267	264	136	139	202	202	239	239	206	206	152	152	333	335
H03	云南楚雄 Chuxiong, Yunnan	264	264	136	139	199	199	236	239	203	203	150	150	335	333
H04	云南楚雄 Chuxiong, Yunnan	264	267	139	139	202	199	236	236	206	203	152	152	333	335

较低,生殖隔离明显。

2.3 白及 SSR 指纹图谱的构建与种质资源鉴定

20 对引物对 60 份不同供试材料进行遗传多样性分析,共检测出 200 个基因型,127 个有效等位变异点(表 3)。其中,引物 BJSSR22 基因型数最多为 14 个,对个体的鉴别能力较强;多态性信息含量(*PIC*)范围为 0. 522 5 ~ 0. 769 5, BJSSR01、BJSSR14、BJSSR15、BJSSR16、BJSSR18、BJSSR19

引物的多态性信息含量(*PIC*)值均超过 0.700 0,平均值为0.660 7,*PIC* 值能够反映引物对材料的区分能力。最终筛选出 7 对基因型丰富、多态性信息含量高的引物用来构建白及 SSR 指纹图谱,这 7 对引物可以区分所有供试材料,具有较高的鉴别能力,能应用于白及种质资源的鉴定。

2.4 基于 SSR 标记的聚类分析

根据 SSR 引物扩增的产物统计不同基因型数据,使用 POPGENE Version 1.32 软件计算材料间的遗传距离和遗传一致度,NTSYS-pc 2.10e 计算材料间的遗传相似性系数,基于 UPGMA 法进行聚类分析(图 1)。聚类分析显示材料间的遗传相似性系数在 0.162 5~0.926 6 之间,20 对引物能够将 60

份供试材料完全分开,60 份材料在相似性系数 0.258 0处明显聚为 3 大类,即白及、黄花白及和小白及、华白及,4 个白及属植物在遗传上有明显的差异;白及在 0.423 9 处出现较为明显地分化,地理距离近的材料进化关系较近,地理距离远的进化关系较远,而有明显地理隔离的材料也与其他个体进化关系较远;聚类结果将黄花白及和小白及聚为一类,与《中国植物志》中的形态学分类结果一致。

3 讨 论

本研究利用白及 SSR 引物对 60 份白及属野生种质资源进行扩增以及聚丙烯酰氨凝胶电泳检测,所有样品均成功扩增出具有较高的稳定性和多态性

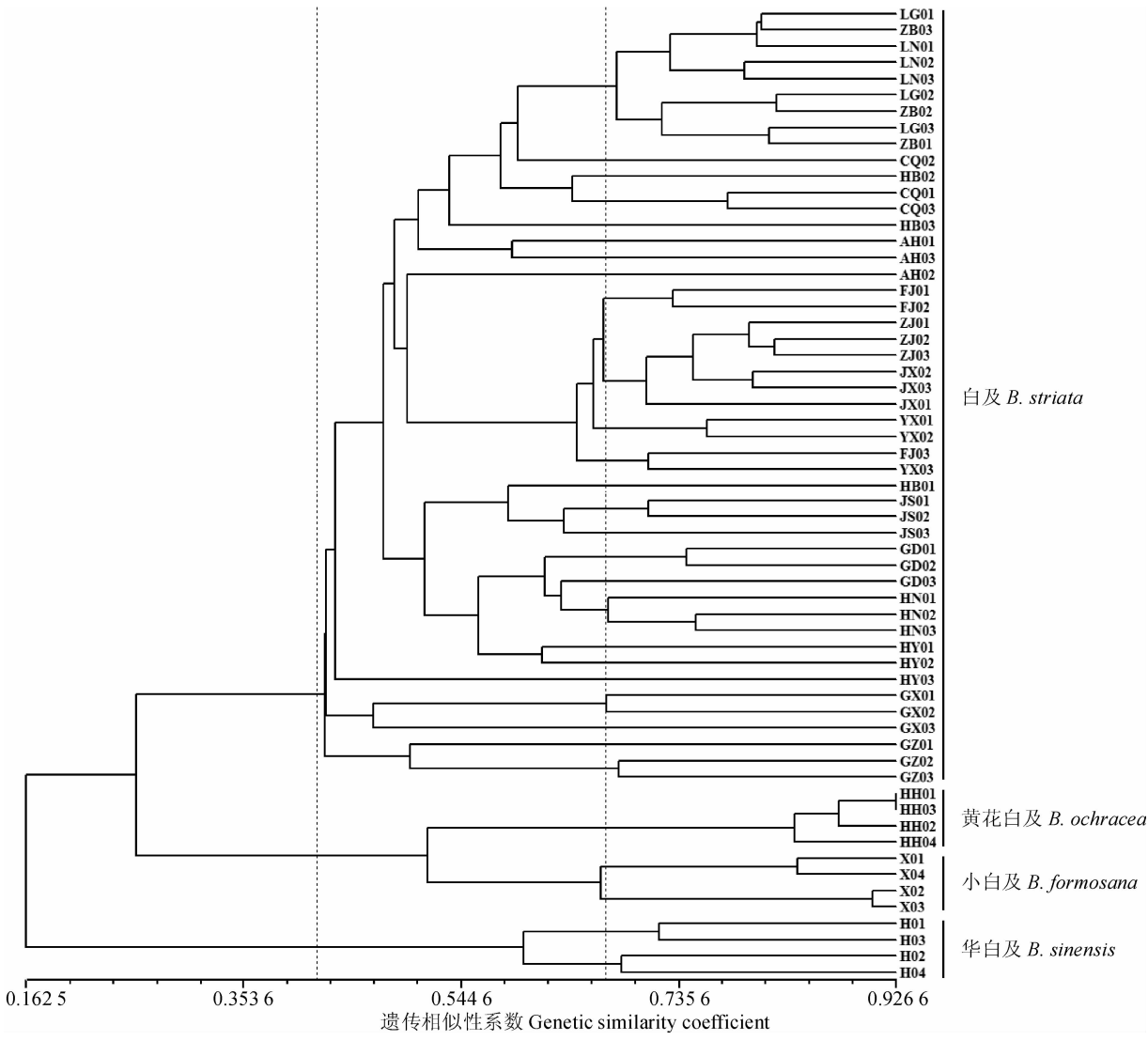


图 1 基于 SSR 标记的 60 份供试材料的 UPGMA 聚类树

Material codes are same as in Table 3

Fig. 1 UPGMA dendrogram of 60 germplasms based on SSR markers

的条带(114~335 bp),该引物可以用于白及属植物遗传多样性分析;60 份样品的遗传多样性分析结果显示,20 对引物的平均观测杂合度(H_o)为0.575 0,平均有效杂合度(H_e)为 0.712 7,遗传多样性指数(H)为 0.706 8,该属植物表现出较高的遗传多样性,具有丰富的进化潜能;分别对 4 个物种进行遗传多样性分析,发现白及遗传多样性明显高于同属的黄花白及、小白及和华白及,物种间分化指数明显($G_{st} = 0.44$)、基因流较弱($N_m = 0.475\ 3$),物种间存在较为明显的生殖隔离现象,分析原因有可能是由于生境片段化造成的。遗传多样性的丰富程度决定了物种对环境变化的适应能力,虽然白及属种质资源稀少,但丰富的遗传多样性对其生存具有重要意义,同时这也对白及优势品种的选育提供了科学依据。

微卫星标记是建立在 PCR 基础上的第二代分子标记,反映的是遗传本质上的差异,具有分布均匀、多态性高、共显性、选择中性等优点,用于品种鉴定时周期短,不受环境条件的影响,真实可靠。它能够排除环境因素给药材鉴定带来的干扰,不受样品形态和材料来源的影响,比传统的方法更准确可靠,现已广泛应用于品种鉴定、构建连锁图谱、构建物理图谱、遗传多样性、居群和进化等方面的研究^[20]。重复序列和包含 SSR 位点的侧翼序列在物种间具有保守性,所以通常一个物种的微卫星引物在同科不同属或者更近物种间具有适用性^[21]。对 60 份白及属野生种质资源进行遗传多样性分析,结果显示,20 对引物共获得 127 个等位变异点,平均每对引物 6.35 个,说明 SSR 引物变异丰富。20 对引物共检测到 127 个等位基因,平均每对引物等位基因数目为 6.35 个;共检测出了 200 个基因型,平均每对引物检测到 10 个基因型,其中 BJSSR01、BJSSR14、BJSSR15、BJSSR16、BJSSR18、BJSSR19、BJSSR22 引物的基因型丰富、多态性信息含量(PIC)高, PIC 值能够反映引物区分材料的能力。最终筛选出的这 7 对白及 SSR 引物基因型丰富、多态性信息含量高,可以区分所有供试材料,具有较高的鉴别能力,能用于全国范围白及野生种质资源的分析与评价。

相似系数平均值是用来比较不同群体遗传多样

性大小的重要指标^[22]。本研究结果显示白及属种质资源间的遗传相似性系数变化范围为 0.162 5~0.926 6,平均为 0.642 3,相似系数范围较大,资源间遗传基础较宽。20 对引物能够将 60 份供试材料完全分开,60 份材料在相似性系数 0.258 0 处明显聚为 3 大类,即白及、黄花白及和小白及、华白及,4 个白及属植物在遗传上有明显的差异;白及的遗传多样性明显高于黄花白及、小白及和华白及,白及属 4 种植物种间的遗传分化强烈,种间的基因流较弱;白及种质资源的遗传相似性系数在 0.423 9 处出现较为明显的分化,在遗传水平上的分类结果与材料来源地分类结果基本一致,地理距离近的材料进化关系较近,地理距离远的进化关系较远,而有明显地理隔离的材料也与其他个体进化关系较远,有少部分同一样源地的材料分散在其他类群中,可能与人为引种交流导致基因在不同地区渗入有很大关系;聚类结果将黄花白及和小白及聚为一类,这与何志娇^[4]、吴劲松^[10]等分别用 ISSR 和 DNA 条形码对白及属药用植物进行种质资源鉴定的结果一致,同时也符合《中国植物志》中的形态学分类结果。

白及作为重要的药用植物,在中国分布区域较广,但由于人为过度采挖造成白及野生资源急剧减少,加上白及种子萌发率低,自然状态繁殖困难,已被列入国家珍稀濒危保护植物名录。尽管近几年白及在湖南、贵州、陕西等地陆续开始大面积种植,但由于白及在人工栽培条件下繁殖速度很慢,繁殖系数极低,严重制约了白及规模化生产种植。目前国内白及主要栽培品种的选育主要通过组培苗驯化和采挖野生资源进行筛选,自育品种很少。本研究所选的 48 份白及材料均表现出较高的多态性和较大的遗传多样性,由此说明白及种质资源丰富,遗传背景复杂,今后应重点发掘这些白及种质资源中的优势基因资源,进行分子标记和遗传定位,为优势基因在新种质中的聚合奠定基础,促进白及种质资源优势品种的选育等。此外,还有必要从孢粉学、胚胎学、繁殖生物学以及引种驯化着手进行白及系统的保护生物学研究,弄清抑制白及生长发育或败育原因,解决白及繁殖、栽培的关键技术问题,从而更有效保护白及这一重要药材资源。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编写委员会. 中国植物志(第十八卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 45-50.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 103.

[3] 何志娇, 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): 1 081-1 085.

HE Z J, LÜ L F, YANG L Y, *et al.* Genetic diversity of *Bletilla* Rchb. f. germplasms by ISSR analysis[J]. *Southwest China Journal Agricultural Sciences*, 2008, **21**(4): 1 081-1 085.

[4] 石 晶, 罗毅波, 宋希强. 我国白及市场调查与分析[J]. 中国园艺文摘, 2010, (8): 48-50.

SHI J, LUO Y B, SONG X Q. Commercial investigation of *Bletilla*(Orchidaceae) in China[J]. *Chinese Horticulture Abstract*, 2010, (8): 48-50.

[5] 鞠 康, 赵鑫磊. 白及研究进展与伪品鉴别[J]. 农技服务, 2010, **27**(10): 1 335-1 377.

[6] 姚宗凡, 黄英姿, 姚晓敏. 药用植物栽培手册[M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 2001: 172.

[7] 梁 颖. 山慈菇与白及的鉴别[J]. 海峡药学, 2009, **21**(2): 64-65.

[8] 徐木根, 朱山寅. 天麻与掺伪品白及饮片的鉴别[J]. 中国药业, 2003, **12**(7): 60.

[9] 吴劲松, 张宇思, 刘 薇, 等. 白及属药用植物 DNA 条形码的确立及其应用[J]. 药科学报, 2014, **49**(10): 1 466-1 474.

WU J S, ZHANG Y S, LIU W, *et al.* DNA barcoding research and its application on medicinal plants of *Bletilla* H. G. Reichenbach[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, **49**(10): 1 466-1 474.

[10] TAUTZ D. Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**: 6 463-6 471.

[11] LITT M, LUTY J A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1989, **44**: 397-401.

[12] LIU R, TENG X J, HE J F, *et al.* Partial splenic embolization using *Bletilla striata* particles for hypersplenism in cirrhosis: a prospective study[J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 2012, **39**(2): 261-269.

[13] 翟 萌, 马逾英, 郑光雅, 等. 市售白及与三种混伪品的对比鉴别[J]. 成都中医药大学学报, 2012, **3**: 53-56.

ZHAI M, MA Y Y, ZHENG G Y, *et al.* Comparative identification between commercial and *Bletilla striata* three kinds of counterfeits[J]. *Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*, 2012, **3**: 53-56.

[14] 陈 黎, 黄良勇, 毛闪闪, 等. 鄂西北地区白及高效液相指纹图谱研究[J]. 中国医院药学杂志, 2014, **34**(2): 105-109.

CHEN L, HUANG L Y, MAO S S, *et al.* Study on the HPLC fingerprint of *Bletilla striata* from Northwest Area of Hubei Province[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2014, **34**(2): 105-109.

[15] 周天华. 中国特有属植物——马蹄香(*Saruma henryi* Oliv.) 的分子谱系地理学与遗传多样性研究[D]. 西安: 西北大学, 2010.

[16] 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): 1 343-1 350.

LI J, YANG H, ZHOU T H. Microsatellite primer screening and population genetic diversity of *Bletilla striata* (THUNB.) Rchb. f. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(7): 1 343-1 350.

[17] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, *et al.* POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis [M]. Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada, 1997: 997.

[18] EXCOFFIER L, LISCHER H E L, *et al.* Arlequin suite ver 3. 5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, **10**: 564-567.

[19] 李忠虎, 刘晓东, 王小琦, 等. 党参微卫星引物筛选及群体遗传多样性研究[J]. 中草药, 2013, **44**(2): 210-214.

LI Z H, LIU X D, WANG X Q, *et al.* Microsatellite primer screening and population genetic diversity of *Codonopsis pilosula*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, **44**(2): 210-214.

[20] 王 丽, 赵桂仿. 植物不同种属间共用微卫星引物的研究[J]. 西北植物学报, 2005, **25**(8): 1 540-1 546.

WANG L, ZHAO G F. Micro-satellite primers shared by different plant species and genera[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2005, **25**(8): 1 540-1 546.

[21] 陈怀琼, 隋 春, 魏 建, 等. 植物 SSR 引物开发策略简述[J]. 分子植物育种, 2009, **7**(4): 845-851.

CHEN H Q, SUI C, WEI J, *et al.* Summary of strategies for developing SSR Primer [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2009, **7**(4): 845-851.

[22] 张明泽, 姚玉仙, 陈世军. 黔南 60 份茶树种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(6): 1 117-1 124.

ZHANG M Z, YAO Y X, CHEN S J. Genetic diversity analysis of tea germplasm in Qiannan Prefecture by SSR markers [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2016, **36**(6): 1 117-1 124.

(编辑:宋亚珍)