



# 不同种源高良姜遗传多样性的 AFLP 分析

杨全<sup>1\*</sup>, 张春荣<sup>1</sup>, 陈虎彪<sup>2</sup>, 滕希峰<sup>1</sup>, 唐晓敏<sup>1</sup>

(1. 广东药学院 中药学院, 广东 广州 510006; 2. 香港浸会大学 中医药学院, 香港)

**[摘要]** 目的: 研究不同种源高良姜的遗传多样性, 探求各种质间的亲缘关系, 为合理利用高良姜种质资源及优良品种选育奠定理论基础。方法: 采用扩增片段长度多态性(AFLP)技术, 对8个种源地的高良姜进行遗传多态性分析, 将扩增出的条带作为原始矩阵, 用NTSYSpc-2.11F软件计算并分析高良姜种质间的相似度, 构建遗传系统进化树。结果: 通过筛选得到8对AFLP引物组合, 共扩增出1120个DNA条带, 多态性条带为1044个, 多态性位点平均为92.57%; 通过构建系统进化树, 将8个种源地的高良姜种质分为3类。结论: 高良姜种质间存在较高多态性, 遗传多样性丰富。

**[关键词]** 高良姜; 种质资源; AFLP; 遗传多样性

高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 属姜科多年生草本植物, 根茎入药, 为“十大广药”之一。性辛、热, 具有温胃散寒、消食止痛之功效<sup>[1]</sup>。风靡全世界的著名汉药驱风油、清凉油、万金油等都是高良姜的高良姜素为原料, 除药用外, 还大量用作调味料、香料、药酒及驱虫剂等<sup>[2]</sup>。高良姜分布于广东、广西、海南等地, 人工栽培主要集中在广东徐闻。目前, 对于高良姜的研究主要集中在药理<sup>[3]</sup>、化学<sup>[4]</sup>、栽培技术<sup>[5]</sup>等方面, 对于种质资源以及遗传多样性研究较少。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)是一种有效的物种遗传多样性分析的分子标记方法<sup>[6]</sup>。由于其具有快速、灵敏、稳定、所需DNA量少、多态性丰富和重复性好等特点, 已广泛应用于人参<sup>[7]</sup>、黄芩<sup>[8]</sup>、天麻<sup>[9]</sup>等植物的遗传多样性研究。本文采用AFLP技术, 研究不同种源高良姜在分子水平上的遗传变异, 为今后开展资源保存、种质鉴定奠定基础, 同时有助于开展分子标记辅助选择育种。

## 1 材料

高良姜为2008年7—9月分别在广东、广西、

海南采集的样品, 每个种源取1片新鲜叶片置装有变色硅胶的封口袋内, 迅速干燥, 备用。种源地及编号见表1。

表1 高良姜种质资源信息

来源	代码	类型	海拔/m	经度 E	纬度 N
广东徐闻曲界镇	QJ	人工	59	110°16'	20°24'
广东徐闻城南乡	CN	人工	43	110°14'	20°19'
广东徐闻龙塘镇	LTR	人工	66	110°16'	20°20'
广东徐闻龙塘镇	LTY	野生	78	110°19'	20°25'
广东遂溪黄略镇	SX	人工	27	110°21'	21°24'
广西南宁植物园	NN	野生	83	108°19'	22°51'
海南文昌铜鼓岭	WC	野生	80	110°69'	20°09'
海南万宁兴隆镇	WN	野生	34	110°11'	18°44'

## 2 方法

**2.1 总DNA提取** 采用CTAB法<sup>[10]</sup>进行基因组总DNA的提取, 用Ultrospec 2000紫外-可见分光光度计检测DNA的纯度及浓度。

**2.2 接头和引物** 从64对AFLP引物中筛选出8对带型分布均匀、多态性高且分辨力强的引物进行AFLP分析, 见表2。

**2.3 酶切与连接** 本实验参照鼎国生物技术公司AFLP试剂盒说明书进行。首先采用NEB(New England BioLabs)公司提供的2种限制性内切酶 *Pst*I 和 *Mse*I 对基因组总DNA进行双酶切, 然后用T4 DNA连接酶, 将 *Pst*I 和 *Mse*I 接头与酶切片断连接起来, 酶切连接一步完成, 酶切连接体系 20 μL: 总DNA 4 μL (50 mg · L<sup>-1</sup>), Adapter 1 μL, *Pst*I/*Mse*I 2 μL, 10 × buffer 2.5 μL, 10 mmol · L<sup>-1</sup> ATP 2.5 μL,

[稿件编号] 20100828003

[基金项目] 国家科技基础条件平台工作项目(2005DKA21000); 国家科技基础性工作专项重点项目(2007FY110600); 广东省科技计划项目(2009B060700076); 广东药学院博士启动项目; 广东药学院重点培养青年教师项目

[通信作者] \* 杨全, Tel: (020) 39352327, E-mail: yangquan7208@vip.163.com

表2 DNA接头和 AFLP 引物序列

接头和引物	核苷酸序列
<i>Pst</i> I 接头	5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3' 5'-TGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Mse</i> I 接头	5'-GACGATGAGTCTCTGAG-3' 5'-TACTCAGACTCAT-3'
<i>Pst</i> I 预扩引物	5'-GACTGCGTACATGCAG-3'
<i>Mse</i> I 预扩引物	5'-GATGAGTCTCTGAGTAAC-3'
<i>Pst</i> I 选扩引物(5 mg·L <sup>-1</sup> )	P1: 5'-GACTGCGTACATGCAGAA-3'
	P2: 5'-GACTGCGTACATGCAGAC-3'
	P3: 5'-GACTGCGTACATGCAGAG-3'
	P4: 5'-GACTGCGTACATGCAGAT-3'
	P5: 5'-GACTGCGTACATGCAGTA-3'
	P6: 5'-GACTGCGTACATGCAGTC-3'
	P7: 5'-GACTGCGTACATGCAGTG-3'
	P8: 5'-GACTGCGTACATGCAGTT-3'
<i>Mse</i> I 预扩引物(30 mg·L <sup>-1</sup> )	M1: 5'-GATGAGTCTCTGAGTAACAA-3'
	M2: 5'-GATGAGTCTCTGAGTAACAC-3'
	M3: 5'-GATGAGTCTCTGAGTAACAG-3'
	M4: 5'-GATGAGTCTCTGAGTAACAT-3'
	M5: 5'-GATGAGTCTCTGAGTAACATA-3'
	M6: 5'-GATGAGTCTCTGAGTAACCT-3'
	M7: 5'-GATGAGTCTCTGAGTAACCTG-3'
	M8: 5'-GATGAGTCTCTGAGTAACCTT-3'

**2.4 PCR 预扩增** 酶切连接产物稀释 10 倍后用于 AFLP 预扩增反应模板,预扩增反应体系 25 μL:模板 2 μL,Pre-ampmix 1 μL,dNTPs 0.5 μL,10 × PCR buffer 2.5 μL,*Taq* DNA 酶 0.5 μL,H<sub>2</sub>O 18 μL。离心数秒,按照下列条件进行 PCR:94 °C 4 min;94 °C 40 s,56 °C 30 s,72 °C 80 s,34 个循环后,72 °C 延伸 6 min。预扩增产物稀释 20 倍后用于选择性扩增的模板。

**2.5 PCR 选择性扩增** 预扩增产物稀释 20 倍后用于选择性扩增的模板。反应体系 25 μL:预扩增稀释样品 2 μL,10 × PCR buffer 2.5 μL,dNTPs 0.5 μL,*Pst* I 引物 1 μL,*Mse* I 引物 1 μL,*Taq* DNA polymerase 0.5 μL,H<sub>2</sub>O 17.5 μL。选择性扩增反应条件为:第 1 轮扩增参数 94 °C 4 min,94 °C 30 s,65 °C 30 s,72 °C 80 s,以后每轮循环温度递减 0.7 °C,扩增 13 个循环;接着按照下列参数扩增 24 个循环:94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 80 s。

**2.6 数据处理** 利用 ABI 377 测序仪进行 AFLP 多态性分析,依据 DNA 电泳分子量标准(marker)计算出各片段的大小。按片段记录带的有无,有记为 1,无记为 0。采用 GeneScan3.1 软件对图像进行处理,构建 0,1 数学矩阵;用 NTSYSp-2.11F 软件进

行数据分析。对原始矩阵用 SimQual 程序求 DICE 相似系数,并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的 UPGMA 进行聚类分析。

### 3 结果与分析

**3.1 DNA 质量检测** 高质量的基因组 DNA 是进行 AFLP 实验和数据分析成功的前提。本实验采用 CTAB 法所提取的基因组 DNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.8 ~ 2.0,电泳图条带清晰无拖尾(图 1),说明所提取的基因组 DNA 完整且质量较高,符合 AFLP 分析的要求。

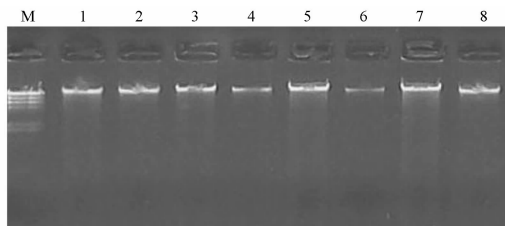


图 1 高良姜基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

**3.2 酶切连接结果检验** AFLP 实验过程要经过基因组 DNA 提取、酶切、连接、预扩增、选择性扩增等步骤。其中酶切、连接是否完全直接影响到 AFLP 实验结果的准确性,因此需要对连接结果进行检验,而预扩增电泳结果可间接反映出连接的效果。DNA 酶切片段凝胶电泳后分散呈均匀的弥散状,片段大多集中在 250 ~ 1 600 bp,说明酶切较完全,接头连接较好(图 2)。

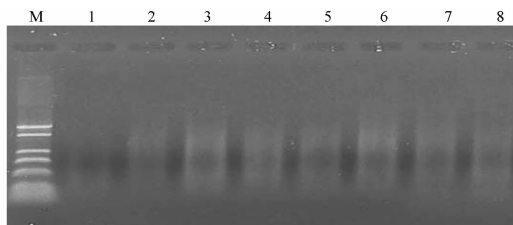


图 2 预扩增产物琼脂糖凝胶电泳

**3.3 AFLP 指纹图谱分析** 从 64 对 AFLP 核心引物组中筛选 8 对引物组合进行多态性分析(图 3)。共扩增出 1 120 个 DNA 条带(表 3),多态性条带为 1 044 个,多态性位点平均为 92.57%。引物对 P3M1 扩增的多态带最多为 163 条,不同引物对扩增出的多态带数量存在一定的差异,引物对 P3M5 高

达 99.47%。可以看出 AFLP 技术检测高良姜种内的遗传多样性的效率很高,多态性丰富。

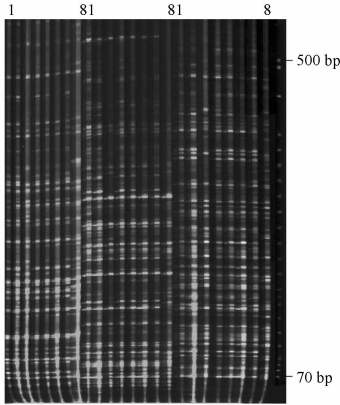


图3 引物组 P3M2, P3M3, P3M5(左→右)扩增

表3 不同引物对的多态性分析

序号	引物编号	末端碱基组合	扩增位点	多态位点	多态性位点/%
1	P3M1	GAG/CAA	165	163	98.79
2	P3M2	GAG/CAC	137	132	96.35
3	P3M3	GAG/CAG	121	107	88.43
4	P3M5	GAG/CTA	188	187	99.47
5	P4M1	GAT/CAA	129	115	89.15
6	P4M2	GAT/CAC	146	133	91.10
7	P4M3	GAT/CAG	112	104	92.86
8	P4M5	GAT/CTA	122	103	84.43

**3.4 相似性及聚类分析** 将8对引物组合在1120个位点上扩增出的条带作为原始矩阵,用NTSYSpc-2.11F软件计算并分析了8个种源高良姜种质间的相似度,获得了聚类图(图4),不同种源高良姜的遗传相似系数在0.49~0.67,表明各个种源间具有一定的遗传差异。从聚类分析图可以看出,AFLP将不同种源高良姜种质分为3类,即第1类包括广东遂溪黄略镇、广西南宁种质;第2类包括广东徐闻曲界镇、徐闻城南乡、徐闻龙塘镇野生及人工种质;第3类包括海南文昌及万宁种质。其中,徐闻曲界镇和徐闻城南乡种质的相似系数最大,为0.65,其亲缘关系较近。相似性系数最小的是海南文昌和海南万宁种质,为0.54,其亲缘关系最远。

#### 4 讨论

本研究利用AFLP方法分析了8份高良姜种质的遗传差异,多态性位点达到1044个,多态性位点

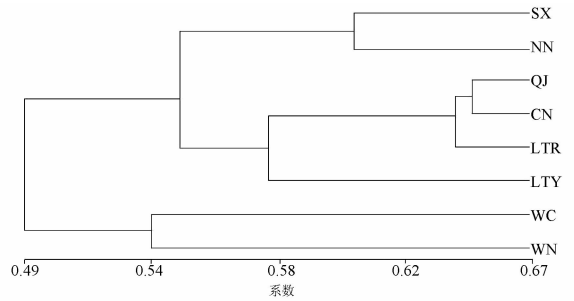


图4 不同种源高良姜种质聚类分析

比率达到92.57%。从DNA分子水平上来说,遗传多样性越高,表明其遗传背景越复杂,该物种存在的历史越久远。92.57%的多态性,说明高良姜在其遗传进化过程中,基因组DNA发生了丰富的变异。同时,也揭示了高良姜种质资源极其丰富的遗传多样性。一个物种的进化潜力和抵御逆境的能力取决于种内遗传变异的大小,遗传多样性越丰富,对环境变化的适应能力越强,其自然分布范围越广<sup>[9]</sup>。

高良姜为常用大宗药材,广东徐闻为高良姜的道地产区,具有悠久的栽培历史,当地药农积累了丰富的栽培高良姜的经验。2008年7月和2010年7月,课题组曾对徐闻县栽培高良姜面积较大的曲界镇、南山镇、龙塘镇进行实地调查,有90%的农户栽培过高良姜,栽培面积小的有2~3 km<sup>2</sup>,较多的有20 km<sup>2</sup>左右,高良姜种苗最初是采集野生高良姜,进行人工驯化,成功后就采用根茎繁殖,互相引种,久而久之,当地栽培面积越来越大。据统计,在高良姜栽培面积最大时,曾达到6000多 km<sup>2</sup>,徐闻产高良姜药材占国内高良姜药材市场90%以上,除此之外,部分药材出口至东南亚,作为食品或者化妆品的原料。从本实验的AFLP的聚类结果可以看出,徐闻曲界镇和徐闻城南乡种质首先聚集为一类,之后同龙塘镇人工的种质聚在一起,最后再和龙塘镇野生种质聚为一类群,和海南文昌、万宁种质类群,以及遂溪、广西、南宁类群相似系数较小,遗传差异较大,这也验证了前述关于高良姜栽培历史的调查结果:徐闻栽培高良姜的(种质)种苗,均来自于当地,海南、广西种质(种苗)没有被引种至徐闻种植。海南文昌、万宁及广西等地的种质遗传多样性很丰富,说明野生高良姜在其遗传进化过程中基因组DNA发生了丰富的遗传变异,应该有优异的变异类型,因此,在进行品种选育时,可以考虑在广西、海南、广东



三地大规模采集种质,进行优良品种选育。

综上所述,本研究利用 AFLP 分子标记技术对高良姜种质资源进行遗传多样性分析,从分子水平揭示出了高良姜种质的遗传基础,为高良姜种质资源的收集保存、分类鉴定与品种选育等提供科学的理论依据,对有效利用高良姜种质资源、促进高良姜 GAP 基地的建设具有重要意义。

#### [参考文献]

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005:202.  
[2] 胡佳惠. 高良姜的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2544.  
[3] 吕玮, 蒋伶活. 高良姜的化学成分及药理作用[J]. 中国药业, 2006, 15(3): 19.  
[4] 冯丽娜, 邓亦峰, 梁念慈. 高良姜中芳香类化合物的分离及其活性研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2732.

[5] 徐鸿华, 丁平, 贺红, 等. 岭南药材执行中药材生产质量管理规范(GAP)的关键技术探讨[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(5): 419.  
[6] Voss P, Hogers R, Bleeter M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407.  
[7] 马小军, 汪小全, 肖培根. 人参农家类型的 AFLP 指纹研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(12): 707.  
[8] 杨全, 罗烈伟, 罗贵超, 等. 黄芩群体不同形态变异类型遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(2): 103.  
[9] 程纪伦, 范爱辉, 苟占平, 等. 贵州野生天麻遗传多样性的 AFLP 指纹分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2866.  
[10] Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 1085.

## AFLP analysis of genetic diversity of *Alpinia officinarum*

YANG Quan<sup>1\*</sup>, ZHANG Chunrong<sup>1</sup>, CHEN Hubiao<sup>2</sup>, TENG Xifeng<sup>1</sup>, TANG Xiaomin<sup>1</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;  
2. School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the genetic diversity and relationship of different *Alpinia officinarum* germplasm. **Method:** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers were developed to analyze genetic polymorphism in *A. officinarum* from eight resources. The amplified fragments were used as primary matrix with NTSYSpc-2.11F software to analyze the similarity between the *A. officinarum* germplasm and to construct the genetic phylogenetic tree. **Result:** A total of 1 120 fragments were genotyped using AFLP with eight prime combinations. Analysis identified 1 044 polymorphic fragments, accounting for 92.57% of the total detected variation. Genetic phylogenetic tree analysis indicates that three categories can be divided among the eight resources of *A. officinarum*. **Conclusion:** Significant polymorphism and genetic diversity can be observed among *A. officinarum* germplasm resources.

[Key words] *Alpinia officinarum*; germplasm resources; amplified fragment length polymorphism (AFLP); genetic diversity

doi:10.4268/cjcm20110322

[责任编辑 吕冬梅]