



# 叶片中含极芳香物质的蜡梅属植物 遗传多样性与亲缘关系

潘心禾<sup>1</sup>, 史小娟<sup>2</sup>, 蒋燕锋<sup>1</sup>, 程龙军<sup>2</sup>, 斯金平<sup>2\*</sup>

(1. 浙江省丽水林业科学研究院 中药材研究所, 浙江 丽水 323000;

2. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地 天然药物研究开发中心, 浙江 临安 311300)

**[摘要]** 目的:揭示叶片中含极芳香物质的蜡梅属植物的遗传多样性与亲缘关系,为药材基原鉴别及与开发利用提供基础。方法:采用扩增酶切片多态性 AFLP 方法,用 POPGENE 32 软件进行 UPGMA 聚类分析。结果:选出 10 对引物扩增出 559 条带,多态性条带为 226 条,多态性条带百分比为 36.8%。观测等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数在总体水平分别为 1.992 6, 1.306 5, 0.199 2, 0.325 1。21 个居群间的遗传距离的变异范围在 0.039 2 ~ 0.289 4。结论:叶片中含极芳香物质的蜡梅属植物遗传多样性低,加强物种与种质资源保护具有重要意义;研究结果从分子水平验证了张若蕙等叶片中含极芳香物质的蜡梅属植物物种分为柳叶蜡梅、浙江蜡梅、山蜡梅、突托蜡梅的正确性。

**[关键词]** 蜡梅属; AFLP; 遗传多样性; 分类

蜡梅属 *Chimonanthus* Lindl. nom. conserv. 中柳叶蜡梅 *Ch. salicifolius* S. Y. Hu、山蜡梅 *Ch. nitens* Oliv、浙江蜡梅 *Ch. Zhejiangensis* M. C. Liu 和突托蜡梅 *Ch. grammatus* M. C. Liu 等叶片揉碎极芳香物种是浙江、安徽、江西等分布区畲汉民间应用最广泛的草药之一<sup>[1]</sup>, 广泛应用于寒湿困脾、肝胃不和、消化功能紊乱而引起的肠胃不适、腹部胀痛、泄泻等消化道疾病; 现代研究表明柳叶蜡梅具抑菌、抗炎、解热和镇痛、镇咳、祛痰等作用<sup>[2-4]</sup>, 并开发成山蜡梅叶颗粒(国药准字 Z20027113)。但由于种种原因,《中国植物志》及江西、安徽、浙江、福建、湖南、广西等分布区的植物志对其分类与分布记载不全面,甚至比较混乱<sup>[5-11]</sup>。为此,本文利用具有信息量大、快速、稳定、高效等优势 AFLP 技术,从分子水平揭示叶片中含极芳香物质的蜡梅属植物物种的遗传多样性与亲缘关系,为叶片中含极芳香物质的蜡梅属植物的物种分类及开发利用提供基础。

## 1 材料

2010 年 1 月 14 日至 2010 年 3 月 23 日先后挖掘叶片含挥发性物质的蜡梅属植物的主要分布区(安徽、福建、江西、广西、湖南及浙江等 6 省区) 21

个居群植物树桩,每个居群采集 20 株,采样植株之间间隔 15 m 以上,用 GPS 定位仪详细记录采样地经纬度和海拔高度,见表 1。供试材料分别种植于浙江省临安市浙江农林大学天然药物研究开发中心和浙江省丽水市林业科学研究院中药试验基地。

试验所用引物均由上海生物工程有限公司合成,内切酶 *EcoRI*, *MseI* 及 T4 连接酶为 NEB 产品, *Taq* 酶和 dNTPs 为 Takara 产品。

## 2 方法

**2.1 DNA 提取和检测** 每个居群随机选取 5 个植株,以幼嫩叶片为材料,采用改良 CTAB 法提取基因组 DNA,用 NanoDrop 微量分光光度计(ND-1000)测定 DNA 的纯度和浓度。

**2.2 AFLP 分析** AFLP 参照 Vos P 等<sup>[12]</sup>的方法,并进行优化。选用 *EcoR I* 和 *MseI* 限制性内切酶进行酶切连接,预扩增用 E + A/M + A 引物组合,选择性扩增采用 E + 3/M + 3 引物组合方式,64 对引物中筛选出 10 对用于选择性扩增,PCR 扩增产物采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染的方法进行检测。

**2.3 数据处理和分析** AFLP 为显性标记,选择清晰可辨的电泳带,扩增条带的有无用 1 和 0 来表示,建立 0/1 基本数据矩,用 NTsys<sup>[13]</sup> 软件进行分析,利用 POPGENE32<sup>[14]</sup> 软件计算不同居群之间遗传距离(GD)、Nei's 基因多样性指数(*H*)、Shannon 多样性指数(*I*)、居群内基因多样性(*H<sub>s</sub>*)、总居群基因多样

[稿件编号] 20101227002

[基金项目] 浙江省重大科技计划项目(2009C02005)

[通信作者] \* 斯金平, 主要从事药用植物遗传研究, Tel: 13868004019, E-mail: lssjp@163.com

表1 样品来源及主要形态特征

No.	居群具体位置	经度 E	纬度 N	海拔/m	叶表面	叶背面	叶革质/纸质	叶形状
1	安徽省休宁县齐云山东亭村	118°01'	29°49'	300~500	粗糙	有白粉	纸质	先端渐尖
2	江西省婺源县大鄣乡程村	117°35'	29°28'	500~600	粗糙	有白粉	纸质	先端渐尖
3	江西省婺源县紫阳镇杨坑村程家村	117°30'	29°10'	300~450	粗糙	有白粉	纸质	先端渐尖
4	安徽省祁门县祁红乡老胡村	117°41'	29°41'	400~550	粗糙	有白粉	纸质	先端渐尖
5	安徽省黟县西递镇霭峰自然村	117°59'	29°05'	300~500	粗糙	有白粉	纸质	先端渐尖
6	浙江省开化县音坑乡开化林场城关分场	118°24'	29°08'	300~350	粗糙	有白粉	纸质	先端渐尖
7	江西省会昌县清溪乡象洞自然村	115°37'	25°15'	470~500	光滑	无白粉	革质	先端钝尖
8	广西壮族自治区阳朔县兴坪镇	110°31'	24°54'	241~275	光滑	无白粉	革质	先端渐尖
9	湖南省新宁县八角村	110°36'	26°25'	610~700	光滑	无白粉	革质	先端渐尖
10	江西省德兴市花桥大目源	117°46'	28°55'	620~750	粗糙	微白粉	纸质	先端渐尖
11	浙江省景宁县外舍乡金钟村	119°43'	28°03'	220~280	光滑	无白粉	革质	先端钝尖
12	浙江省遂昌县焦滩塘坑村	118°59'	28°23'	450~520	光滑	无白粉	革质	先端渐尖
13	浙江省松阳县西坪水车村	119°32'	28°24'	150~220	光滑	无白粉	纸质	先端渐尖
14	福建省寿宁县南阳镇刘坪村	119°37'	27°04'	320~382	光滑	无白粉	革质	先端渐尖
15	浙江省泰顺县司前坑口大桥	119°41'	27°46'	218~260	光滑	无白粉	革质	先端钝尖
16	浙江省庆元县五大堡乡林业站边	119°10'	27°36'	200~320	光滑	无白粉	革质	先端渐尖
17	浙江省龙泉市西街街道周村	119°04'	28°06'	300~450	光滑	无白粉	革质	先端钝尖
18	浙江省青田县祯埠锦水村	120°00'	28°20'	100~180	光滑	无白粉	革质	先端钝尖
19	浙江省云和县紧水滩镇后山	119°32'	28°11'	310~420	光滑	无白粉	革质	先端钝尖
20	浙江省淳安县龙川林场叶林林区	118°41'	29°26'	240~320	粗糙	有白粉	纸质	先端渐尖
21	浙江省丽水市莲都区百果园	119°54'	28°26'	180~220	粗糙	有白粉	纸质	先端钝尖

度( $H_1$ )、遗传分化系数( $G_{st}$ )及基因流指数[ $N_m = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$ ]等,用UPGMA法进行聚类分析构建系统树状图。

### 3 结果与分析

**3.1 引物筛选与扩增结果** 从供试材料中选取4份形态差异较大的DNA材料进行引物筛选,通过对DNA进行初筛和复筛,从64对选择性扩增引物中得到多态性较明显的10个引物,共扩增出559个位点,平均每个引物扩增出55.9个位点,DNA片段大小主要分布在0.2~1.0 kb,其中206个位点具有遗传多样性,占总数的36.8%,每个引物检测到的多态位点平均为20.6个,见表2。所有材料具有相同的主扩增带,其多态性主要表现在次扩增带上,说明材料各种之间具有一定的同源性,而每个居群均有一定程度的特异性,见图1。

**3.2 叶片中含极芳香物质的蜡梅属物种的遗传多样性与遗传相似性系数** 通过AFLP检测结果计算Nei氏遗传距离,结果表明供试的21个居群之间遗传距离的变异范围在0.039 2~0.289 4,平均为0.164 3;婺源县大鄣乡程村和婺源县紫阳镇杨坑村

表2 供试材料的 AFLP 扩增

引物	序列	扩增带数	多态带数	多态率/%
EP8/MP8	E-AGG/M-CTT	76	27	35.5
EP8/MP7	E-AGG/M-CTG	60	21	35.0
EP7/MP8	E-AGC/M-CTT	49	17	34.7
EP7/MP7	E-AGC/M-CTG	56	25	44.6
EP7/MP6	E-AGC/M-CTC	70	28	40.0
EP7/MP5	E-AGC/M-CTA	48	16	33.3
EP4/MP3	E-ACT/M-CAG	42	17	40.4
EP4/MP4	E-ACT/M-CAT	57	15	26.3
EP4/MP5	E-ACT/M-CTA	48	18	37.5
EP4/MP6	E-ACT/M-CTC	53	22	41.5

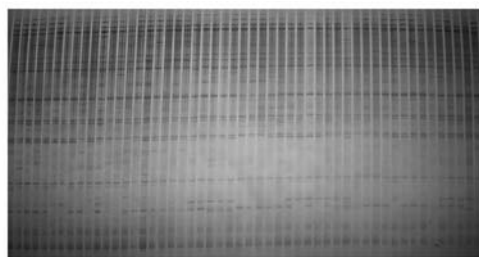


图1 引物 E-AGC/M-CTC 扩增



程家村2个居群的遗传距离最近,为0.039 2;浙江庆元和广西阳朔种源遗传距离最远,为0.289 4。叶片中含极芳香物质的蜡梅属物种总的基因遗传多样性( $H_t$ )为19.98%,居群内的遗传多样性( $H_s$ )为8.42%,见表3。居群的遗传分化系数( $G_{st}$ )为57.84%,说明57.84%的变异存在于居群间,42.16%的变异存在于居群内。

**3.3 叶片中含极芳香物质的蜡梅属物种的亲缘关系及其分类** 根据各居群间的Nei氏遗传距离矩阵,利用UPGMA法进行聚类分析见图2。

从图2可见,供试21个居群在相似系数0.77时,可划分为4个类,地理分布区域相近、形态特征相似的居群,亲缘关系相近,见图3,与张若惠等<sup>[1]</sup>提出的形态分类相吻合。第1类包括安徽休宁、祁门、黟县,江西婺源、德兴,浙江开化、淳安、莲都等居群,为柳叶蜡梅,对熊跃国5460(LBG)、聂敏祥5397(PE)、郑盘基1971(PE)、赖书坤等6256(PE)、聂敏祥5670(PE)、赖书坤424(PE)、王名金2427(PE)、赖书坤等宜00144(PE)、胡启明宜000780(PE)、李启和1401(NF)、徒水581(PE)、杨祥学650183(PE)等标本研究表明,江西修水、德兴、玉山、广丰、太和、奉新、铜鼓、集平、陈策、上苑、黎川也有分布,因此,该物种主要分布在浙江、江西、安徽三省交界的区域及江西北部,114°22'~120°2'E,25°47'~30°26'N。第2类为浙江景宁、青田、松阳、龙泉、云和、泰顺、庆元和福建宁德,为浙江蜡梅,对毛宗国10666(PE)、陈恒彬1013(PE)等标本研究表明,福建武夷山、德化也有分布,因此,该物种主要分布在浙江与福建交界的区域,118°1'~120°0'E,25°29'~28°23'N;第3类为广西阳朔和湖南新宁,查阅标本刘茂春781002(ZJFC),湖北宜昌也有分布,为山蜡梅,因此,该物种112°E以西的区域;第4类仅分布于江西安远与会昌两县交界的区域,115°27'~115°38'E,25°15'~25°20'N,为突托蜡梅。

**4 结论与讨论**

供试的21个叶片中含极芳香物质的蜡梅属物种居群相似系数变化范围为0.748 4~0.961 5,总遗传多样性( $H_t$ )为0.199 8,其遗传多样性在木本植物中属于偏低水平,而生物遗传多样性在一定程度上代表了种群对环境变化适应能力的强弱,说明叶片中含极芳香物质的蜡梅属物种对环境适应能力

表3 供试材料 AFLP 分析的相似系数

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	1.000 0																				
2	0.947 7	1.000 0																			
3	0.934 2	0.961 5	1.000 0																		
4	0.935 2	0.956 9	0.956 0	1.000 0																	
5	0.928 3	0.947 8	0.946 7	0.958 6	1.000 0																
6	0.929 6	0.951 1	0.941 0	0.950 7	0.951 8	1.000 0															
7	0.813 5	0.811 9	0.822 9	0.823 2	0.837 0	0.820 0	1.000 0														
8	0.834 6	0.847 4	0.847 4	0.853 7	0.886 0	0.857 6	0.844 0	1.000 0													
9	0.826 6	0.837 7	0.836 3	0.844 1	0.871 3	0.864 9	0.828 2	0.923 5	1.000 0												
10	0.900 3	0.922 2	0.925 4	0.912 8	0.903 2	0.903 4	0.782 1	0.797 2	0.787 2	1.000 0											
11	0.845 1	0.840 1	0.852 6	0.856 8	0.851 9	0.853 8	0.813 5	0.764 3	0.769 6	0.874 4	1.000 0										
12	0.851 2	0.875 4	0.866 7	0.861 3	0.864 7	0.862 6	0.814 5	0.801 0	0.798 4	0.903 6	0.902 2	1.000 0									
13	0.871 2	0.886 1	0.883 1	0.886 3	0.888 3	0.878 8	0.812 5	0.816 0	0.806 3	0.890 1	0.904 4	0.925 0	1.000 0								
14	0.859 2	0.875 3	0.863 2	0.865 6	0.856 6	0.875 5	0.790 3	0.773 4	0.789 1	0.870 4	0.902 8	0.890 5	0.917 9	1.000 0							
15	0.834 8	0.844 7	0.847 3	0.841 9	0.849 4	0.838 2	0.788 3	0.782 8	0.777 2	0.857 9	0.902 6	0.879 9	0.924 0	0.938 8	1.000 0						
16	0.827 6	0.837 0	0.822 9	0.827 2	0.820 9	0.837 9	0.754 9	0.748 7	0.764 9	0.854 1	0.890 6	0.875 7	0.896 9	0.938 7	0.920 8	1.000 0					
17	0.844 9	0.852 5	0.842 2	0.848 3	0.850 8	0.838 6	0.802 0	0.799 6	0.785 2	0.864 6	0.868 6	0.812 9	0.913 9	0.908 8	0.916 9	0.875 7	1.000 0				
18	0.877 5	0.896 4	0.895 0	0.895 6	0.889 7	0.895 5	0.851 1	0.808 7	0.808 3	0.908 9	0.913 0	0.937 2	0.936 2	0.914 5	0.916 7	0.882 4	0.929 5	1.000 0			
19	0.865 8	0.876 0	0.859 1	0.862 0	0.867 2	0.852 7	0.816 5	0.794 3	0.787 7	0.900 4	0.897 4	0.920 5	0.916 5	0.909 8	0.909 7	0.887 8	0.944 3	0.944 1	1.000 0		
20	0.884 6	0.889 2	0.888 2	0.892 3	0.865 7	0.887 2	0.765 6	0.793 6	0.794 6	0.943 5	0.858 8	0.894 1	0.875 9	0.866 7	0.849 2	0.853 8	0.875 5	0.911 2	0.892 6	1.000 0	
21	0.809 3	0.898 9	0.908 8	0.907 4	0.894 6	0.891 7	0.783 3	0.817 4	0.812 5	0.939 7	0.863 4	0.883 0	0.872 9	0.860 6	0.854 0	0.844 2	0.869 7	0.903 8	0.898 3	0.955 8	1.000 0

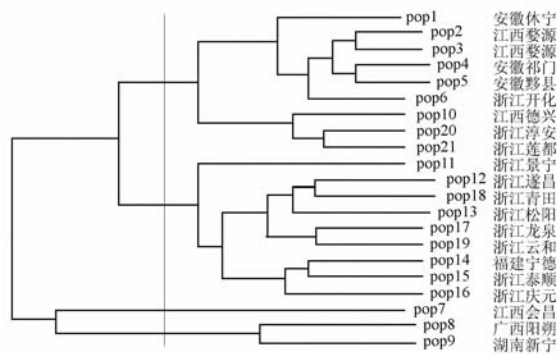


图 2 21 个居群 UPGMA 聚类图

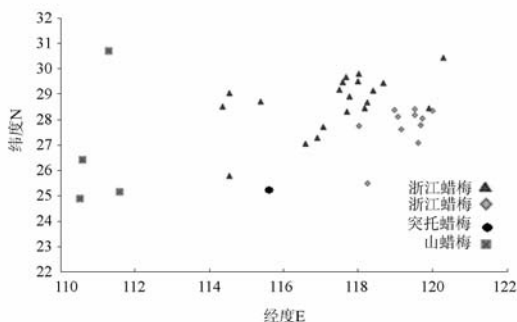


图 3 21 个居群的地理分布情况

较弱,对其采取保护措施是非常有必要的。

供试 21 个居群在相似系数 0.77 时划分为 4 个类,与张若蕙等<sup>[1]</sup>对蜡梅属含挥发性物质物种分为柳叶蜡梅、浙江蜡梅、山蜡梅、突托蜡梅的结果完全一致,并存在明显的地理分布区域。柳叶蜡梅主要分布在浙江、江西、安徽三省交界的区域及江西北部,浙江蜡梅主要分布在浙江与福建交界的区域,山蜡梅主要分布广西阳朔、湖南新宁、湖北宜昌等地,突托蜡梅仅分布于江西安远与会昌两县交界的区域;浙江、江西、安徽未见山蜡梅

分布,江西、安徽未见浙江蜡梅分布。一些学者认为浙江蜡梅和突托蜡梅应该归并为山蜡梅<sup>[15]</sup>,《江西植物志》中把柳叶蜡梅作为山蜡梅的新组合,从 AFLP 遗传多样性与亲缘关系研究结果显示上述结论不够合理。

[参考文献]

[1] 张若蕙,刘洪涛. 世界蜡梅[M]. 北京: 中国科学出版社, 1998: 84.

[2] 李萍,何明. 山蜡梅感冒茶抑菌抗炎解热作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,1996,3(1):19.

[3] 李晓宇,何明. 山蜡梅叶镇痛、镇咳、祛痰作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,1997,4(6):366.

[4] 陈鹭颖,刘锡钧. 山蜡梅对小鼠的减肥作用[J]. 海峡药学, 2002,14(5):30.

[5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第30卷. 第2分册[M]. 北京: 科学出版社,1979:5.

[6] 江西植物志编辑委员会. 江西植物志. 第2卷. [M]. 北京: 中国科学技术出版社,2004:1049.

[7] 安徽植物志协作组. 安徽植物志[M]. 北京: 中国展望出版社,1987:26.

[8] 浙江药用植物编写组. 浙江药用植物志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社,1980:383.

[9] 福建省科学技术委员会福建植物志编写组. 福建植物志. 第2卷[M]. 福州: 福建科学技术出版社,1985:88.

[10] 傅书遐. 湖北植物志[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001, 441.

[11] 中国科学院广西植物研究所. 广西植物志. 第1卷. 种子植物[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2005:412.

[12] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acids Res, 1995 (23):4407.

[13] McDermott J M, McDonald B A. Gene flow in plant pathosystems [J]. Annu Rev Phytopathol,1993,31:353

[14] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972,106, 283 .

[15] 金建平,赵敏,兰涛,等. 我国蜡梅属植物分类及种质资源的研究[J]. 北京林业大学学报,1992,14(增刊4):112.

## Genetic diversity and genetic relationships of species containing extremely aromatic compounds in leaves of *Chimonanthus*

PAN Xinhe<sup>1</sup>, SHI Xiaojuan<sup>2</sup>, JIANG Yanfeng<sup>1</sup>, CHEN Longjun<sup>1</sup>, SI Jinping<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Chinese Medicinal Materials, Lishui Institute of Forestry Sciences, Lishui 323000, China;

2. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Research and Development Center for Natural Medicine, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China)

[Abstract] **Objective:** Species containing extremely aromatic compounds in leaves of *Chimonanthus* was analyzed to evaluate its genetic diversity and genetic relationships. **Method:** AFLP molecular marker technique was used in the study, UPGMA cluster analysis was conducted with the software of POPGENE32. **Result:** Five hundred and fifty-nine bands were amplified by 10 pairs of primers screened, of which 226 bands were polymorphic, and the percentage of polymorphic bands was 36.8%. Observed number of alleles, effective number of alleles, Nei's genetic diversity index and Shannon's information index were 1.992 6, 1.306 5, 0.199 2 and 0.325 1, respectively. Genetic distances of the 21 populations were ranged from 0.039 2 to 0.289 4. **Conclusion:** Species containing extremely aromatic compounds in leaves of *Chimonanthus* with low genetic diversity play an important role in enhancing the protection of species and germplasm resources. From the molecular level, the studies demonstrated the correctness of the result by Zhang Ruohui that species containing extremely aromatic compounds in leaves of *Chimonanthus* were divided into *Ch. salicifolius*, *Ch. Zhejiangensis*, *Ch. nitens* and *Ch. grammatus*.

[Key words] *Chimonanthus*; AFLP; genetic diversity; categories

doi:10.4268/cjcm20111202

[责任编辑 吕冬梅]

### 书 讯

由高文远教授编写的《现代中药质量控制及技术》已在科学出版社出版发行,该书从中药质量控制的重要性和必要性出发,叙述了中药质量控制的发展历史、发展趋势;详细介绍了中药的来源鉴别、性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别和新技术在中药鉴别中的应用;高效液相色谱、超高压液相色谱、高效毛细管电泳、色谱-质谱联用技术等色谱技术在中药质量控制中的应用;还包括中药指纹图谱质量控制技术及生物效价、代谢组学、分子生物学等现代质量控制技术。此外,还专辟章节介绍了含不同类型活性成分中药及不同剂型中药,中药材、中药饮片和中成药,以及中药保健食品的质量控制。既可以供中药和药学相关领域的科研、教学人员使用,也可以作为中药和药学相关领域的研究生、本科生参考。

当当网、卓越网、新华书店及医学专业书店有销售。定价120元。免邮寄挂号费用,联系人:温晓萍;电话:010-64034601 64015165;地址:北京市东黄城根北街16号科学出版社(100717);联系人:温晓萍;请在汇款附言注明购书的书名、册数、联系电话、发票等。