

基于 AFLP 分子标记的广藿香遗传多样性分析

刘晓莹, 李嘉惠, 杨钰婷, 严寒静, 张宏意, 何梦玲*

(广东药科大学 中药学院, 国家中医药管理局 岭南药材生产与开发重点实验室, 中药材国家现代农业产业技术体系广州综合试验站 (CARS-21-16), 广州 510006)

[摘要] 目的:采用扩增片段长度多态性(AFLP)分子标记方法研究广藿香的种质遗传多样性。方法:采用12对引物对14个品种共212个样本进行AFLP分析;利用POPGENE 32, Arlequinver 3.5, MEGA7, NTSYSpc 2.10e等生物学分析软件进行多态性参数计算、主坐标分析以及聚类分析。结果:12对引物共扩增出2 238个位点,其中多态性位点有2 226个,多态位点百分率为99.38%;在种群间,有效等位基因数(N_e)为1.365 6±0.066 3, Nei's基因多样性指数(H)为0.220 7±0.036 4, Shannon多态性信息指数(I)为0.343 7±0.050 2;在种群内, N_e 为1.118 5±0.038 7, H 为0.071 3±0.023 0, I 为0.109 4±0.035 0;分子方差学分析(AMOVA)表明广藿香的总变异有71.57%来源于种群间,28.43%来源于种群内;聚类分析可将14个种群分为4大类。结论:AFLP分子标记结果显示,广藿香种间具有比较丰富的遗传多样性,种内遗传多样性相对较小,种间遗传分化显著,可为广藿香后续优良种质筛选等研究提供参考依据。

[关键词] 广藿香; 扩增片段长度多态性; 种质资源; 遗传多样性

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0152-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202312

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201022.1032.003.html>

[网络出版日期] 2020-10-22 11:04

Genetic Diversity Analysis of *Pogostemon cablin* Based on AFLP Markers

LIU Xiao-ying, LI Jia-hui, YANG Yu-ting, YAN Han-jing, ZHANG Hong-yi, HE Meng-ling*

(School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of State Administration of TCM for Production & Development of Cantonese Medicinal Materials, Comprehensive Experimental Station of Guangzhou, Chinese Materia Medica, China Agriculture Research System (CARS-21-16), Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to study the genetic diversity of *Pogostemon cablin* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Method:** The 12 pairs of primers were used for AFLP analysis of 212 samples from 14 varieties, and biological analysis software such as POPGENE 32, Arlequinver 3.5, MEGA 7 and NTSYSpc 2.10e were used for polymorphism parameter calculation, principal coordinate analysis and cluster analysis. **Result:** A total of 2 238 loci were amplified by 12 pairs of primers. 2 226 of them were polymorphic loci, accounting for 99.38%. At the inter-population level, the values of effective alleles (N_e), Nei's gene diversity index (H), Shannon polymorphic information index (I) were 1.365 6±0.066 3, 0.220 7±0.036 4, and 0.343 7±0.050 2, respectively; and 1.118 5±0.038 7, 0.071 3±0.023 0, 0.109 4±0.035 0, respectively at the intra-population level. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 71.57% of the total variation of *P. cablin* was of inter-population nature, and 28.43% was of intra-population nature. The 14 populations could

[收稿日期] 20200404(020)

[基金项目] 广东省科技项目(2015A030302084, 2017A030303082, 2017A030303081);国家自然科学基金项目(81773829);广东省重点领域研发计划项目(2020B020221002);广东省中管局项目(20163010)

[第一作者] 刘晓莹,在读硕士,从事药品食品分析与质量控制研究工作, E-mail:1552436667@qq.com

[通信作者] *何梦玲,博士,副教授,从事中药资源开发与品质评价研究工作, E-mail:hmlfd@126.com

be divided into four groups by cluster analysis. **Conclusion:** The results of AFLP molecular markers showed that abundant genetic diversity was present at inter-population level of *P. cablin*, however, relatively low at intra-population level; the genetic differentiation at the inter-population level was significant, which could provide a reference for the subsequent study of good germplasm selection of *P. cablin*.

[Key words] *Pogostemon cablin*; amplified fragment length polymorphism; germplasm resources; genetic diversity

广藿香为唇形科植物广藿香的干燥地上部分,味辛,微温,归脾、胃、肺经;具有芳香化浊,和中止呕,发表解暑的功效;用于湿浊中阻,脘痞呕吐,暑湿表证,湿温初起,发热倦怠,胸闷不舒,寒湿闭暑,腹痛吐泻,鼻渊头痛;被广泛应用于藿香正气口服液、藿香正气水、藿香正气软胶囊、霍胆丸等多种中药制剂中^[1]。研究发现,广藿香具有保护胃肠道、抗病原微生物、抗炎、镇痛、解热、抗氧化、抗肿瘤和调节免疫系统等药理作用^[2]。

广藿香原产于东南亚一带,后引种到中国,在广东、广西、海南均有栽培^[3]。广藿香按照产地不同可划分为石牌藿香(牌香),海南藿香(南香或琼香),高要藿香(肇香),湛江藿香(湛香)^[4],亦有学者根据挥发油成分的明显差异分为广藿香醇型(广藿香醇含量较高者,又称“琼香类”,产地广东吴川、遂溪、海南万宁、雷州)和广藿香酮型(广藿香酮含量较高者,又称“牌香类”,产地广东广州和肇庆高要)两种化学型^[5]。由于原产地与我国的气候环境差异,广藿香较少开花结果,繁殖方法多为扦插和组织培养,种质出现严重退化;又因城市化和经济效益低等原因,“牌香”和“肇香”也濒临灭绝。通过咨询农户及基地人员了解到,部分产地是一直留存本地品种,继续用于下一年的种植;但也有种植户表示种苗有出售到其他产地,因此,不同产地之间存在相互引种的情况,进而导致种质混乱。因此,对广藿香种质资源进行研究整理具有重要意义,以便为广藿香的有效保护及开发利用提供参考。

遗传多样性分析对于培育具有优良性状的新品种和改良品种具有重要意义。基于DNA分子标记不受环境因素的影响,可以在植物的任何发育阶段从任何部位分离出来,可以用来评估物种间的遗传多样性以及遗传结构等,并为育种计划开发分子标记。扩增片段长度多态性(AFLP)是由荷兰科学家Zabeau和Vos创建的一种以限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)技术及聚合酶链式反应(PCR)技术为基础的分子标记技术^[6],该分子标记方法将RFLP的可靠性和随机扩增多态性DNA标记

(RAPD)的简便性结合起来,具有标记多态性强、方法简便、信息量大及应用广泛等优点,已经被广泛应用于物种鉴别、遗传多样性分析、种质资源保护及评价等研究^[7-12]。LI等^[8]鉴定出了17个雄性特异性AFLP标记,这些AFLP标记可以作为是一种新的分子探针,有效地鉴定蕁草的遗传性别。杜春华等^[9]采用AFLP分子标记技术对濒危药用植物短柄乌头进行遗传多样性研究,结果显示,短柄乌头的种群间遗传多样性丰富,而种群内的多样性偏低,种群间具有显著的遗传分化,该研究结果可对其保护提供依据。

本研究采用本课题组先前优化的AFLP反应体系对14个广藿香种群共212个样本进行遗传多样性分析,了解其遗传变异及遗传结构,以期为今后广藿香的优良种质筛选以及分子辅助育种提供有效依据。

1 材料

本研究所用的实验材料为14个不同种群的广藿香叶片,经广东药科大学何梦玲副教授鉴定为广藿香*Pogostemon cablin*,样品信息见表1。从广藿香植株上采摘生长良好、无病虫害的叶片,加入硅胶干燥并放入-20℃冰箱中保存备用。

T100™ Thermal Cycler型PCR仪(美国Bio-Rad公司),DYCP-31DN型电泳仪(北京六一生物科技有限公司),DL-600C型电泳仪电源(北京东林昌盛生物科技有限公司),3K15型台式高速冷冻离心机(美国Sigma公司),MJ-54A型高压蒸汽灭菌锅(施都凯仪器设备有限公司),K5500Plus型超微量紫外分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司),Tocan-4100型全自动凝胶成像系统(上海领成生物科技有限公司)。

EcoR I(批号10043416),Mse I(批号10031770),T4连接酶(批号10041522),购于NEB公司;PCR用的PreMix(批号A1A0281)购于TaKaRa公司;引物由天一辉远基因科技有限公司合成,选择性扩增引物Mse I+3'的5'端添加FAM荧光标记,见表2。

表1 广藿香样品信息(按经度排序)

Table 1 Information of *Pogostemon cablin* samples(longitude sorting)

样品名称	采集地点	纬度	经度	数量/个	采集时间
FG	法国巴黎	48.84°N	2.36°E	3	2019-08
JX	广西省靖西市渠洋镇	23.30°N	106.32°E	20	2019-05
BS	海南省白沙县珠碧江农场一队	19.39°N	109.30°E	18	2016-11
LZ	广东省湛江市雷州市英利镇	20.53°N	110.06°E	20	2019-09
GZ	广东省茂名市高州市木广垌	22.14°N	110.82°E	20	2019-09
MT	广东省阳江市阳春市芒头地	21.97°N	111.49°E	21	2019-10
DQ	广东省肇庆德庆县武垄镇罗冲村	23.29°N	112.23°E	17	2016-11
LT	广东省肇庆高要区莲塘镇牛暗坪村	22.95°N	112.47°E	10	2018-12
LB	广东省肇庆高要区禄步镇上升村	22.92°N	112.48°E	18	2016-11
GN	广东省肇庆广宁县宾亨镇君崑村	23.39°N	112.78°E	20	2016-11
SH	广东省肇庆四会县迳口镇新围村	23.50°N	112.78°E	20	2019-08
LD	广东省广州市天河区龙洞	23.20°N	113.37°E	10	2018-12
SP	广东省广州市天河区上社社区	23.21°N	113.37°E	9	2017-01
YN	广东药科大学(大学城校区)药圃	23.06°N	113.41°E	6	2019-08

表2 用于广藿香 AFLP 分析的限制性内切酶接头与引物序列

Table 2 Adapters and primers sequences used in AFLP analysis of *Pogostemon cablin*

引物名称	EcoRI		MseI	
	编码	引物序列(5'-3')	编码	引物序列(5'-3')
接头	E-ad1	CTCGTAGACTGCGTACC	M-ad1	GACGATGAGTCCTGAG
	E-ad2	AATTGGTACGCACTCTAC	M-ad2	TACTCAGGACTCAT
预扩增引物	E-A	GACTGCGTACCAATTCA	M-C	GATGAGTCCTGAGTAAC
选择性扩增引物	E-ATC	GACTGCGTACCAATTCATC	M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAAGTG
	E-ATG	GACTGCGTACCAATTCATG	M-CCA	GATGAGTCCTGAGTAACCA
	E-ACC	GACTGCGTACCAATTCACC	M-CCG	GATGAGTCCTGAGTAACCG
	E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG	M-CGA	GATGAGTCCTGAGTAACGA
	E-AGT	GACTGCGTACCAATTCAGT	M-CGC	GATGAGTCCTGAGTAACGC
	E-AGC	GACTGCGTACCAATTCAGC	M-CGG	GATGAGTCCTGAGTAACGG
	E-AGG	GACTGCGTACCAATTCAGG		

2 方法

2.1 基因组DNA的提取与检测 本研究使用植物基因组DNA提取试剂盒提取广藿香基因组DNA,然后用微量紫外分光光度计测定其浓度和纯度,再用1%的琼脂糖凝胶检测DNA的完整性。最后将其稀释至50 mg·L⁻¹,置于-20℃保存备用。

2.2 酶切 用限制性核酸内切酶EcoR I和Mse I对广藿香基因组DNA进行双酶切,反应体系总体积为20 μL,其中EcoR I(20 U·μL⁻¹)0.5 μL,Mse I(10 U·μL⁻¹)0.5 μL,10×Buffer 2 μL,模板DNA(质量浓度100 mg·L⁻¹)300 ng,其余用ddH₂O补足。酶切反应在37℃下反应3 h。酶切结束后,65℃灭活

20 min,4℃保存。酶切产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3 连接 连接反应的总体积为20 μL,包括酶切产物10 μL,EcoR I接头(5 mmol·L⁻¹)1 μL,Mse I接头(50 mmol·L⁻¹)1 μL,T4连接酶1 μL,10×Buffer 2 μL,其余用ddH₂O补足。在16℃下反应12 h,连接完成后,65℃灭活10 min,4℃保存。

2.4 预扩增 取稀释3倍的连接产物5 μL,加入20 μL体系中进行反应。预扩增反应体系包括2×的PreMix 10 μL,EcoR I primer(10 μmol·L⁻¹)1 μL,Mse I primer(10 μmol·L⁻¹)1 μL,连接产物5 μL,ddH₂O 3 μL。预扩增程序为95℃预变性3 min;

95 °C变性 30 s, 50 °C退火 30 s, 72 °C延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C延伸 5 min。反应结束后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测预扩增产物。

2.5 选择性扩增 取稀释 20 倍的预扩产物 5 μL, 加入 20 μL 体系中进行反应。选择性扩增体系与预扩增体系一致, 扩增程序为 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 65 °C (每个循环下降 0.7 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 12 个循环; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 23 个循环; 72 °C 延伸 5 min。扩增结束后, 用毛细管电泳法检测反应产物。

2.6 数据处理 采用 GeneMarker 读取毛细管电泳结果, 构建 0/1 矩阵; 使用 POPGENE 32 计算遗传多样性参数, 如多态位点百分率 (*PPL*), 有效等位基因数 (*Ne*), Nei's 基因多样性指数 (*H*), Shannon 多态性信息指数 (*I*) 等; 使用 SPSS 17.0 对种群间遗传距离与地理距离的相关性分析; 使用 NTSYSpc 2.10e 进行主坐标分析; 使用 MEGA 7 对种间遗传距离进行非加权配对算数平均法 (UPGMA) 聚类分析; 使用 Arlequinver 3.5 进行分子方差学分析 (AMOVA)。

3 结果与分析

3.1 广藿香遗传多样性水平 本研究采用 12 对引物对 14 个广藿香种群共 212 个样品进行 AFLP 分析, 共得到 2 238 个位点, 见表 3。其中有 2 226 个多态位点, 平均 *PPL* 为 99.38%。不同引物之间的扩增效果有所不同, 其中 E-ACG/M-CTG 引物对扩增出来的位点最少 (106 个), E-ACC/M-CGA 引物对扩增出的位点最多 (267 个), 而 E-AGT/M-CCA 引物对的 *PPL* 最低 (97.78%); E-AGC/M-CGC, E-ATC/M-CGG, E-ACC/M-CGG 和 E-AGT/M-CGG 引物对 *PPL* 最高 (100%)。结果显示, 所选的 12 对引物在广藿香样品间体现出较高的遗传多样性水平。

本研究所用 212 份广藿香样品的平均 *Ne* 为 1.365 6±0.066 3, 平均 *H* 为 0.220 7±0.036 4, 平均 *I* 为 0.343 7±0.050 2, 表明广藿香物种种群间具有比较丰富的遗传多样性, 见表 4。而在广藿香种群内, 平均 *Ne* 为 1.118 5±0.038 7, 平均 *H* 为 0.071 3±0.023 0, 平均 *I* 为 0.109 4±0.035 0, 可见广藿香种群内的遗传多样性较低, 见表 5。其中, SP 的 *Ne* (1.168 7), *H* (0.098 7), *I* (0.148 2) 均最高, 表明 SP 种群的种内遗传多样性相对最高, 而 FG 的 *Ne* (1.047 7), *H* (0.027 7), *I* (0.040 9) 均最低, 说明 FG 种群的种内遗传多样性相对最低。综合以上分析结果可以看出, 广藿香的种间遗传多样性高于其种内遗传多样性。

表 3 AFLP 选择性扩增引物产生的位点多态性

Table 3 Polymorphism of AFLP bands obtained by selective amplification based on primer combinations

引物组合	总位点/个	多态性位点/个	多态位点百分率/%
E-ACG/M-CTG	106	104	98.11
E-AGT/M-CCA	135	132	97.78
E-AGC/M-CCG	174	173	99.43
E-ACC/M-CGA	267	267	100.00
E-AGT/M-CGA	151	150	99.34
E-AGC/M-CGA	192	191	99.48
E-AGG/M-CGA	251	250	99.60
E-ATG/M-CGC	249	246	98.80
E-AGC/M-CGC	221	221	100.00
E-ATC/M-CGG	211	211	100.00
E-ACC/M-CGG	119	119	100.00
E-AGT/M-CGG	162	162	100.00

表 4 基于不同引物组合的广藿香遗传多样性水平

Table 4 Genetic diversity level of *Pogostemon cablin* based on different primer combinations

引物组合	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
E-ACG/M-CTG	1.285 4	0.178 8	0.288 1
E-AGT/M-CCA	1.261 5	0.160 8	0.257 1
E-AGC/M-CCG	1.278 2	0.173 1	0.281 5
E-ACC/M-CGA	1.449 7	0.268 4	0.409 8
E-AGT/M-CGA	1.315 4	0.197 4	0.312 4
E-AGC/M-CGA	1.348 5	0.207 9	0.323 7
E-AGG/M-CGA	1.417 4	0.250 9	0.386 3
E-ATG/M-CGC	1.419 7	0.251 5	0.385 9
E-AGC/M-CGC	1.361 5	0.219 8	0.344 2
E-ATC/M-CGG	1.411 4	0.247 5	0.381 4
E-ACC/M-CGG	1.413 6	0.240 3	0.365 7
E-AGT/M-CGG	1.425 1	0.252 3	0.388 8

3.2 广藿香种群遗传结构 POPGEN 32 分析显示, 14 个广藿香种群的总基因多样性指数 (*Ht*) 为 0.232 2±0.038 3, 种内基因多样性指数 (*Hs*) 为 0.068 8±0.013 8, 种间基因多样性指数 (*Gst*) 为 0.698 9±0.062 3, 基因流 (*Nm*) 为 0.220 8±0.066 7, *Nm* 较小。从广藿香种群的 AMOVA 分析结果可以看到, 广藿香种群间的基因分化系数 (*Fst*) 为 0.715 7, 也就是说广藿香的总变异有 71.57% 来源于种群间, 28.43% 来源于种群内, 即种群间的遗传分化远大于种群内的遗传分化。见表 6。

表5 14个广藿香种群内遗传多样性水平

Table 5 Genetic diversity of 14 *Pogostemon cablin* populations

种群名称	N_e	H	I	$PPL/\%$
FG	1.047 7	0.027 7	0.040 9	7.21
JX	1.147 7	0.089 3	0.137 5	30.96
BS	1.075 1	0.046 6	0.073 6	18.95
LZ	1.132 9	0.079 9	0.123 1	28.53
GZ	1.124 5	0.076 1	0.118 2	28.43
MT	1.154 3	0.093 9	0.145 0	33.05
DQ	1.118 1	0.071 7	0.111 2	26.23
LT	1.124 4	0.074 7	0.115 0	25.09
LB	1.135 5	0.081 3	0.124 8	28.22
GN	1.132 4	0.079 6	0.122 1	27.42
SH	1.083 3	0.050 6	0.078 2	18.13
LD	1.160 5	0.095 0	0.144 1	29.47
SP	1.168 7	0.098 7	0.148 2	29.04
YN	1.054 1	0.032 7	0.050 4	10.63

表6 广藿香14个种群的AMOVA分子方差学分析

Table 6 AMOVA molecular variance of 14 populations of *Pogostemon cablin*

变异来源	自由度	平方和	变异组份	百分率/%
种群间	13	42 047.341	210.560 27	71.57
种群内	211	16 562.093	83.646 93	28.43

广藿香14个种群的遗传一致性在0.634 1~0.990 1,均值为0.807 0;遗传距离在0.010 0~0.458 3,均值为0.225 6,见表7。其中GN种群和LB种群的遗传一致性最大(0.990 1),遗传距离最小(0.010),表明两者亲缘关系较近;FG种群和JX种群的遗传一致性最小(0.634 1),遗传距离最大(0.458 3),表明两者亲缘关系较远。使用SPSS 17.0对广藿香种群间遗传距离与地理距离进行相关性分析,其中 $P=0.032(P<0.05)$,说明结果具有统计学意义,相关系数 $r=0.225$,说明两者相关性较低。见图1。

表7 14个广藿香种群的遗传一致性和Nei's的无偏差遗传距离

Table 7 Genetic identity and genetic distance between 14 populations of *Pogostemon cablin*

种群	BS	FG	SH	YN	DQ	GN	GZ	LB	LZ	JX	LD	LT	MT	SP
BS		0.877 3	0.979 7	0.973 0	0.841 5	0.844 9	0.834 0	0.843 1	0.840 4	0.696 7	0.712 2	0.712 1	0.702 9	0.694 2
FG	0.131 8		0.874 1	0.864 1	0.777 8	0.784 8	0.771 5	0.780 2	0.777 0	0.634 1	0.651 1	0.651 5	0.639 4	0.637 3
SH	0.020 5	0.135 2		0.983 9	0.842 6	0.844 8	0.834 0	0.843 1	0.839 6	0.704 9	0.720 5	0.720 9	0.711 3	0.703 2
YN	0.027 4	0.147 1	0.016 3		0.828 2	0.830 7	0.819 4	0.829 0	0.825 7	0.696 3	0.712 5	0.713 4	0.702 7	0.695 2
DQ	0.173 6	0.253 8	0.172 2	0.189 4		0.985 3	0.986 7	0.987 3	0.986 3	0.725 6	0.745 0	0.745 3	0.735 7	0.725 1
GN	0.169 1	0.244 5	0.169 3	0.186 2	0.014 9		0.984 9	0.990 1	0.985 9	0.721 4	0.740 9	0.741 2	0.730 3	0.718 7
GZ	0.182 0	0.260 8	0.182 0	0.199 7	0.013 4	0.015 2		0.987 4	0.989 4	0.718 1	0.733 3	0.735 5	0.725 7	0.714 7
LB	0.171 2	0.249 7	0.171 1	0.188 0	0.012 8	0.010 0	0.012 7		0.988 0	0.721 5	0.737 9	0.740 2	0.730 4	0.719 3
LZ	0.174 4	0.253 9	0.175 4	0.192 2	0.013 8	0.014 2	0.010 7	0.012 1		0.717 7	0.737 6	0.738 0	0.727 6	0.718 0
JX	0.363 6	0.458 3	0.352 0	0.364 4	0.326 2	0.332 8	0.336 9	0.331 9	0.337 4		0.941 0	0.931 6	0.976 9	0.956 7
LD	0.341 7	0.433 4	0.330 5	0.341 8	0.297 5	0.303 7	0.313 5	0.307 0	0.307 6	0.061 0		0.972 1	0.953 5	0.949 1
LT	0.342 0	0.432 8	0.330 2	0.340 9	0.296 4	0.302 8	0.309 8	0.303 4	0.306 8	0.070 9	0.028 4		0.943 6	0.935 9
MT	0.355 2	0.451 0	0.343 6	0.355 7	0.312 3	0.320 1	0.325 7	0.319 3	0.323 4	0.023 4	0.047 7	0.058 2		0.966 6
SP	0.367 9	0.455 3	0.355 4	0.366 7	0.327 4	0.336 6	0.341 6	0.334 9	0.337 2	0.044 3	0.052 4	0.066 4	0.034 1	

注:右上方为遗传一致度,左下方为遗传距离。

3.3 广藿香种群间的遗传关系 用MEGA7对广藿香种群间的遗传距离进行UPGMA聚类分析,结果显示在遗传距离为0.05处,可将14个种群分为4大类,其中MT,JX,SP,LT,LD聚为第I类,YN,SH,BS聚为第II类,FG单独聚为第III类,剩余的DQ,LZ,GZ,LB,GN 5个种群聚为第IV类,见图2。主坐标分析结果显示,14个广藿香种群212个样品分成了4大类,与聚类结果一致。见图3。

4 讨论与结论

4.1 广藿香遗传多样性水平 本研究采用12对AFLP引物对212个广藿香样本进行分析,共扩增出2 238个位点,其中多态性位点有2 226个, PPL 为99.38%,表明所选引物能体现出广藿香种群具有较高的遗传多样性。广藿香种群间 N_e, H, I 分别1.365 6±0.066 3, 0.220 7±0.036 4, 0.343 7±0.050 2,种群内 N_e, H, I 分别1.118 5±0.038 7, 0.071 3±

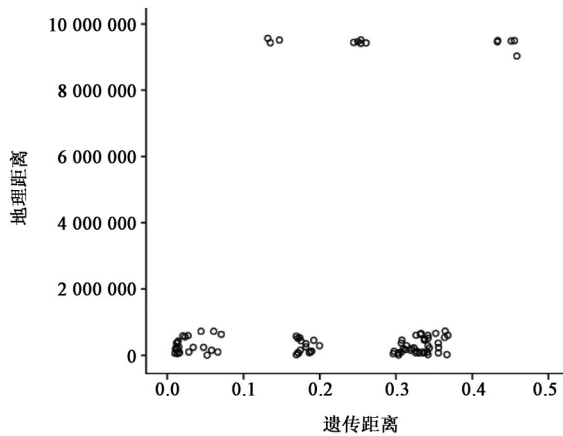


图1 广藿香种群间遗传距离与地理距离的相关性分析
Fig. 1 Correlation between genetic distance and geographical distance

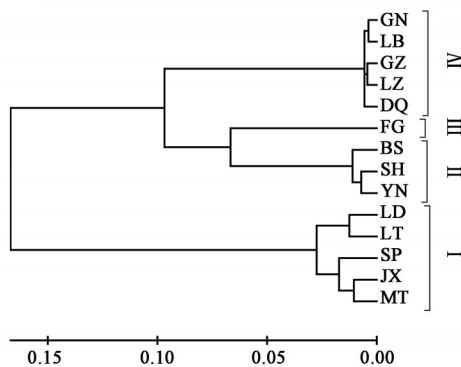
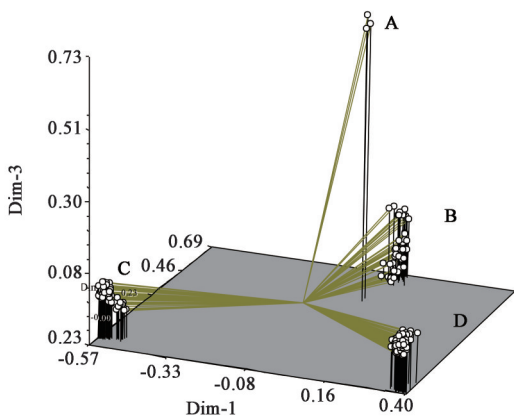


图2 基于AFLP分析的14个种群的UPGMA聚类分析
Fig. 2 UPGMA cluster analysis of 14 populations based on AFLP analysis



A: FG; B: YN, SH 和 BS; C: MT, JX, SP, LT 和 LD; D: DQ, LZ, GZ, LB 和 GN

图3 基于AFLP分析的212个广藿香样品的主坐标分析
Fig. 3 Principal coordinate analysis of 212 *Pogostemon cablin* samples based on AFLP analysis

0.023 0, 0.109 4±0.035 0。文献报道了662种植物的遗传多样性, 得出PPL为51.30%, H为0.150, 表明广藿香种群间具有比较丰富的遗传多样性, 而种群内的遗传多样性较低^[13]。这可能与广藿香的繁殖

方法有关, 采用扦插或组织培养的方法进行无性繁殖, 会使得广藿香种内遗传多样性不断降低。

4.2 广藿香种群遗传结构 WRIGHT^[14]针对同工酶方法提出遗传分化指数(*Gst*)介于0~0.005, 说明遗传分化很弱, 可以不考虑群体间的遗传分化; 其中0.05~0.15说明是群体间存在中等程度的遗传分化, 0.15~0.25是群体间遗传分化较大, >0.25表明群体间遗传分化很大。本研究所得广藿香*Gst*为0.698 9±0.062 3, 表明广藿香群体间的遗传分化很大。从AMOVA分析结果可以看到, 广藿香的总变异有71.57%来源于种群间, 28.43%来源于种群内, 即种群间的遗传分化远大于种群内的遗传分化。这一结果与文献报道的研究结果有所不同, 基于RAPD, ISSR和SRAP 3种分子标记分析广藿香的遗传分化情况, 结果显示种群内的遗传变异占总变异的61.75%, 而种群间的遗传变异占总变异的38.25%, 种内遗传分化比种间遗传分化大^[15]。近年来, 组织培养技术在广藿香的繁殖中应用较多, 这大大降低了广藿香种内的遗传分化程度。另外, 不同分子标记方法所反映出来的基因组信息有所不同, 因此本研究所用的AFLP分子标记方法与其他分子标记方法的研究结果存在一定差异。

根据*Nm*的大小可划分为高(≥1.0), 中(0.250~0.990), 低(0.0~0.249) 3个等级水平^[16], *Nm*与种群间的遗传分化呈负相关, 即大的*Nm*可以阻止种群间的遗传分化。本研究由POPGENE 32分析得到的广藿香种群间的基因流为0.220 8±0.066 7, <0.250, 表明广藿香种群间遗传交流较低, 遗传分化比较大。广藿香种群间遗传距离与地理距离相关性分析结果表明, 两者没有显著的相关性, 也就是说地理距离在广藿香的遗传分化中的作用不明显。

4.3 广藿香种群间的遗传关系 主坐标分析与聚类分析结果显示, 12个产地的广藿香可以聚成四大类。其中MT, JX, SP, LT, LD聚为第I类, 经咨询了解到在广西靖西市所采集的广藿香样品为阳春品种, 即阳春、广州、肇庆高要的样品遗传距离较小, 聚到了一类。罗集鹏等^[5]通过研究广藿香挥发油成分, 将含广藿香酮相对较高的广州和肇庆高要广藿香划分为酮型广藿香, 将含广藿香醇相对较高的广东湛江地区及海南省广藿香划分为醇型广藿香; 各产地在两种化学型上的划分与本研究基于AFLP分子标记的聚类基本一致。另外, 胡珊等^[17]采用ISSR分子标记方法对阳春三角镇、阳春潭水镇、湛江遂溪以及肇庆高要的广藿香进行遗传多样性分析, 结

果显示阳春的广藿香与肇庆高要的广藿香亲缘关系较近,与湛江的亲缘关系较远;与本研究结果相一致。YN,SH,BS聚为第Ⅱ类,YN为栽种于广东药科大学药圃的印尼品种广藿香,与海南的样品BS聚到一类,在地理环境的角度上看比较合理,这两个产区都属于热带地区,而肇庆四会的样品SH也聚到了一起,可能是产区间相互引种所导致。FG单独聚为第Ⅲ类,法国的样品FG在经纬度上与其他产区的相差较大,因此基因组DNA可能也会存在差异。其余的DQ,LZ,GZ,LB,GN 5个居群聚为第Ⅳ类,即肇庆德庆、肇庆禄步、肇庆广宁、湛江雷州、茂名高州这5个产地的广藿香遗传距离较近,聚到了一类。胡贞贞等^[18]表示,肇庆市各产地所产广藿香中,仅高要莲塘镇为形态特征典型的肇香,其广藿香酮与百秋李醇的配比符合前人对肇香的评价;而其他乡镇所产的广藿香无论从形态还是化学成分均与湛香相符,归为湛香。这一理论正好与本研究聚类分析所得第Ⅳ类相呼应。

本研究的不足之处在于种群间的样本因素没有控制好,其中法国和印尼这两个种群的样品量过少,可能未能将这两个种群的真实遗传信息完全体现出来。

综上所述,本研究采用AFLP分子标记方法揭示了广藿香种间、种内的遗传多样性及其遗传结构,阐明了广藿香各种群间的遗传关系,可为广藿香的优良种质筛选以及分子辅助育种提供有力的参考依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:45.
[2] 徐雯,吴艳清,丁浩然,等. 广藿香的药理作用及机制研究进展[J]. 上海中医药杂志,2017,51(10):103-106.
[3] 吴卓娜,吴卫刚,张彤,等. 不同产地广藿香化学成分及药理作用研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2019,21(6):1227-1231.
[4] 贾旭玲,徐三,施芬. 广藿香的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(11):2442-2444.

[5] 罗集鹏,刘玉萍,冯毅凡,等. 广藿香的两个化学型及产地与采收期对其挥发油成分的影响[J]. 药学学报,2003,38(4):307-310.
[6] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M. AFLP: a new technique for DNA finger printing [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(5):4407-4414.
[7] 黄映萍. DNA分子标记研究进展[J]. 中山大学研究生学刊:自然科学医学版,2010,31(2):27-36.
[8] LI S F, WANG L J, DENG C L, et al. Identification of male-specific AFLP and SCAR markers in the dioecious plant, *Humulus scandens* [J]. Mol Cell Probe, 2017, 34:68-70.
[9] 杜春华,普春霞,刘小莉,等. 短柄乌头遗传多样性的AFLP分析[J]. 中草药,2018,49(2):439-443.
[10] GAUDEUL M, DELAHAYE T, MULLER S. AFLP markers show low levels of clonal propagation and high genotypic diversity in the rare, southernmost populations of *Linnaea borealis* L. (Caprifoliaceae) in the Western Alps [J]. Genetica, 2019, 147(1):79-90.
[11] 叶晓霞,王小敏,陈善兰,等. 中药地枫皮及其伪品假地枫皮的DNA条形码鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(15):185-190.
[12] 蒲天珍,张秀桥,周佩娜,等. 大叶蛇葡萄类纤维素合成酶基因的克隆及其序列分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(20):147-152.
[13] KEARSEY M J. Plant population genetics, breeding and genetic resources [J]. Genet Res, 1991, 58(2):180-181.
[14] WRIGHT S. Evolution in Mendelian populations [J]. Genetic, 1931, 16(2):97-159.
[15] 吴友根. 广藿香种质资源分子标记、栽培生理及其品质评价[D]. 南京:南京农业大学,2009.
[16] ROHLF F J. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, Setauket, New York.
[17] 胡珊,陈洪毅,邹龙怡,等. DNA条形码及ISSR技术对广藿香种质资源的分析[J]. 现代中药研究与实践,2019,33(1):8-11.
[18] 胡贞贞,黄伟展,卢昌华,等. 不同产地广藿香非靶向代谢组学研究[J]. 中药材,2019,42(2):271-278.

[责任编辑 顾雪竹]