

• 药材与资源 •

香鳞毛蕨种质资源遗传多样性的 AFLP 分析

黄庆阳¹, 樊锐锋², 常 缨¹

(1. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 利用 AFLP 技术分析香鳞毛蕨种质资源多样性。方法 对 46 个香鳞毛蕨个体进行 AFLP 分析, 利用 NTSYS-PC 2.10、PopGene32 软件分析各居群的遗传多样性。结果 香鳞毛蕨居群多态位点百分率 (PPB) 为 76.67%; 观测等位基因数 (N_a) 为 1.766 7, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.504 6, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.292 1, Shannon 信息指数 (I) 为 0.431 6; 遗传分化指数 (G_{st}) 为 0.412 5。结论 香鳞毛蕨遗传多样性较高。群体内的基因多样性 (H_s) 为 0.170 5, 群体间的基因多样性 (D_{st}) 为 0.119 8, 且由于生境特殊性, 对香鳞毛蕨资源应采取就地保护策略。

关键词: 香鳞毛蕨; 遗传多样性; AFLP

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-0971-04

AFLP Analysis on genetic diversity of germplasm resource in *Dryopteris fragrans*HUANG Qing-yang¹, FAN Ruifeng², CHANG Ying¹

(1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Pharmaceutical College, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective To determine the genetic diversity of germplasm resource in *Dryopteris fragrans* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. **Methods** Forty-six samples from six populations of *D. fragrans* were analyzed by AFLP DNA markers, and the genetic diversity was evaluated by NTSYS-PC 2.10 and PopGen32. **Results** The percentage of polymorphic bands (PPB) reached to 76.67%, observed number of alleles (N_a) was 1.766 7, effective number of alleles (N_e) was 1.504 6, Nei's gene diversity index (H) was 0.292 1, Shannon information index (I) was 0.431 6, and genetic differentiation index (G_{st}) was 0.412 5. **Conclusion** Genetic diversity is high, gene diversity in populations (H_s) is 0.170 5, and gene diversity among populations (D_{st}) is 0.119 8. Because of environmental specificity, its resource on the spot should be protected.

Key words: *Dryopteris fragrans* (L.) Schott; genetic diversity; amplified fragment length polymorphism (AFLP)

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott 是以黑龙江省为分布中心的一种珍稀药用蕨类植物, 主要分布于五大连池、大兴安岭等高寒地区。其生境极其特殊, 生长于火山喷发后形成的滑石坡、火山岩浆缝中。近年来, 研究发现香鳞毛蕨对皮肤病、类风湿性关节炎具有很好的疗效^[1-3], 在民间, 香鳞毛蕨的药用价值也受到了广泛的关注, 但其药材来源靠野生采挖, 使得有限药材资源逐渐减少。由于人为的盲目采收以及对熔岩环境的破坏, 使香鳞毛蕨的野生资源正遭到严重的破坏。AFLP 技术 (amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度

多态性) 已被广泛用于种质资源多样性分析、品种鉴定、图谱构建等研究^[4]。尤其在濒危植物的保护研究中具有十分明显的优势。本研究应用 AFLP 技术分析黑龙江省内具有代表性的 6 个香鳞毛蕨居群的遗传多样性水平遗传结构及各地方居群亲缘关系和 DNA 分子水平的特征指纹带, 为香鳞毛蕨种质资源的现状评估、保护策略制定、种质的鉴定提供较全面、可靠的遗传学资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 采集黑龙江省内 6 个具有代表性居群的 46 个个体, 重点采集五大连池居群。为避免取

到同一母株的后代克隆, 本研究中同一地区中不同个体之间的平均距离至少在 10 m 以上, 采取植株幼嫩叶片(一般为叶先端部位), 硅胶干燥, - 20 ℃保存待用。样品采集时间为 2007 年 6 月至 2007 年 9 月。

表 1 黑龙江省研究样地的自然状况

Table 1 Natural condition of sample plot in Heilongjiang Province

居群编号	采样地点	海拔/ m	地理位置	岩石裸露率/ %	生物环境状况	个体数	个体编号
Pop 1	大兴安岭呼中区林业局	460~ 480	N52°02' E123°34'	75~ 85	采石场附近	8	1~ 8
Pop 2	大兴安岭呼玛县鸥浦乡	205~ 225	N52°44' E126°02'	75~ 85	生态环境恶劣	5	9~ 13
Pop 3	伊春市红星湿地	445~ 455	N48°46' E128°43'	80~ 95	生态环境恶劣	6	14~ 19
Pop 4	牡丹江市镜泊湖民族村	318~ 330	N44°03' E128°57'	55~ 75	人为破坏严重	8	20~ 27
Pop 5	五大连池二池	280~ 300	N48°42' E126°01'	60~ 80	人为破坏少	9	28~ 30, 38~ 43
Pop 6	五大连池南北泉	270~ 290	N48°38' E126°08'	70~ 85	旅游区, 人为干扰严重	10	31~ 37, 44~ 46

1. 2 方法

1. 2. 1 基因组 DNA 的提取: 采用改良的 CTAB 方法提取基因组 DNA^[7]。用紫外分光光度计和 1. 0% 琼脂糖电泳检测 DNA 纯度、完整性及产量。DNA 质量浓度大约为 50 ng/ μL。

1. 2. 2 模板 DNA 的酶切和连接: 基因组 DNA 100 ng, 在 20 μL 反应体系中经酶 *EcoR* I 和 *Mse* I 37 ℃水浴双酶切 4 h, 70 ℃、10 min 灭活酶后, 取 5 μL 加到含 *EcoR* I adapter、*Mse* I adapter、T4ligase 的 20 μL 反应体系中, 16 ℃水浴 12 h 者连接反应, 72 ℃、10 min 使酶灭活。

1. 2. 3 AFLP 扩增反应: 本实验采用改良的两步扩增法。预 PCR 引物: *EcoR* I , *Mse* I 不含有选择性碱基。选择性 PCR 引物采用 3+ 3 引物组合: *EcoR* I 选择性引物 (E1、E2、E3) 和 *Mse* I 选择性引物 (M1、M2、M3) 均含 3 个选择性碱基(表 2)。

预 PCR 反应参数: 94 ℃、3 min; 94 ℃、30 s, 56 ℃、30 s, 72 ℃、1 min, 30 个循环; 72 ℃、10 min; 4 ℃终止反应。选择性 PCR 反应参数: 94 ℃、3 min; 94 ℃、30 s, 65 ℃(每个循环降低 0. 7 ℃)、30 s; 72 ℃、1 min, 12 个循环; 94 ℃、30 s, 56 ℃、30 s, 72 ℃、1 min, 23 个循环; 72 ℃、10 min; 4 ℃终止反应。

表 2 引物和接头序列

Table 2 Primers and adapter sequences

扩增引物	序 列	接头	序 列
<i>EcoR</i> I	5'-GACTGCGTACCAATTG-3'	<i>EcoR</i> I	5'-CTCGTAGACTGCGTACG3'
<i>Mse</i> I	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'		3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
E1	5'-GACTGCGTACCAATTCAAT-3'	<i>Mse</i> I	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
E2	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'		3'-TACTCAGGACTCAT-5'
E3	5'-GACTGCGTACCAATTCATG-3'		
M1	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'		
M2	5'-GATGAGTCCTGAGTAACA-3'		
M3	5'-GATGAGTCCTGAGTAAATG-3'		

1. 2. 4 数据分析: 扩增条带采用 Labworker 4. 0 软件与人工读带相结合策略, 针对某一同源带(同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带)而言, “有”记作“1”, “无”记作“0”, 只判读清晰易辨的扩增带, 生成 0/1 二态性数据矩阵。使用 POPGENE32、NT-SYSPc 2. 10 等生物统计软件进行相关参数计算和聚类处理。

2 结果

2. 1 引物筛选结果: 本研究选用了随机搭配的 9 对引物组合, 筛选得到 3 对清晰易辨、表现丰富的多态性的引物, 分别为: *EcoR* I + AAG/ *Mse* I + CAA; *EcoR* I + AAG/ *Mse* I + ATC; *EcoR* I + ATC/ *Mse* I + CAA。

2. 2 物种和居群水平的遗传多样性: 用 3 对引物对

香鳞毛蕨 6 个居群的 46 个样本进行扩增(图 1), 共检测到 90 个位点。经 Popgene32 软件分析, 物种水平上, 多态位点百分率 (PPB) 76. 67%, *Nei's* 基因多样性 0. 292 1 和 Shannon 信息指数 (*I'*) 0. 431 6; 居群水平上, PPB 27. 78% ~ 64. 64%, 平均为 49. 45%, *Nei's* 基因多样性分布区间为 0. 101 8~ 0. 213 0, 平均值为 0. 170 5; Shannon *I'* 平均值为分布区间为 0. 151 0~ 0. 320 9, 平均值为 0. 255 4(表 3)

用 *Nei's* 基因多样性衡量, 6 个自然居群总的 *Nei's* 基因多样性指数 (*H_t*) 为 0. 290 3, 其中居群内基因多样性 (*H_s*) 为 0. 170 5, 居群间的基因多样性 (*D_{st}*) 为 0. 119 8, *Nei's* 遗传分化指数 (*G_{st}*) 为 0. 412 5。结果表明, 香鳞毛蕨居群间变异占总变异的 41. 25%, 居群内占 58. 75% 左右。同时居群间基

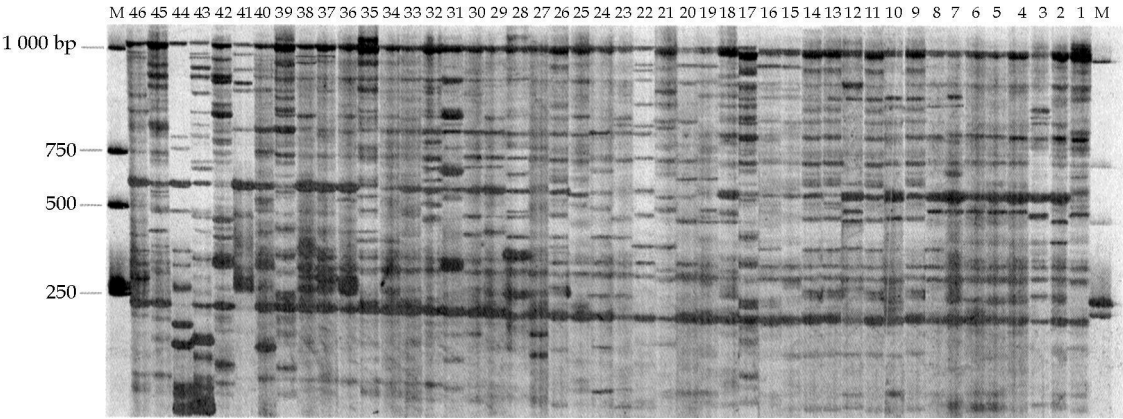


图 1 引物 E2M2 对 46 份香鳞毛蕨 DNA 的扩增结果

Fig 1 Amplification of AFLP primer E2M2 in 46 germplasm

表 3 6 个香鳞毛蕨居群的遗传多样性水平

Table 3 Parameters of genetic diversity in six populations of *D. fragrans*

序号	样本数	等位遗传标记 (N_a)	有效等位遗传 标记(N_e)	基因多样性 (H)	Shannon 信息 指数(I)	多态位点百 分率(PBP) / %	扩增条带分布
Pop 1	8	1 366 7	1 255 7	0 139 9	0. 204 3	36 67	1~ 8
Pop 2	5	1 277 8	1 178 5	0 101 8	0. 151 0	27 78	9~ 13
Pop 3	6	1 511 1	1 329 6	0 185 1	0. 274 1	51 11	14~ 19
Pop 4	8	1 555 6	1 291 8	0 177 1	0. 270 7	55 56	20~ 27
Pop 5	9	1 644 4	1 365 9	0 213 0	0. 320 9	64 44	28~ 30、38~ 43
Pop 6	10	1 611 1	1 349 3	0 206 4	0. 311 2	61 11	31~ 37、44~ 46
平均值	—	1 494 5	1 295 1	1 170 5	0. 255 4	49 45	
物种水平	46	1 766 7	1 504 6	0 292 1	0. 431 6	76 67	

因交流有限, 基因流(N_m) 为0. 712 1。用 Shannon 多样性指数衡量, 物种水平上 Shannon 多样性指数为 0. 431 6, 居群内平均值为0. 255 4, 居群分化系数为 0. 408 2, 即 40. 82% 的遗传变异分布在居群间。由此可见, $Nei's$ 基因多样性指数和 Shannon 信息指数的 AFLP 统计结果, 都显示出香鳞毛蕨遗传多样性主要存在于种群间遗传变异在 42% 左右, 趋向一致。

2.4 群体间遗传一致度、遗传距离和 UPGMA 聚类分析: $Nei's$ 的遗传一致度和遗传距离反映了群体间的遗传分化程度(表 4), 香鳞毛蕨群体的遗传一致度和遗传距离分别为 0. 763 4~ 0. 956 0, 0. 045 0~ 0. 269 9。其中镜泊湖与呼中区林业局的遗传距离最大为 0. 269 9, 遗传一致度最小为 0. 763 4, 遗传分化程度最高。五大连池 2 个地区的香鳞毛蕨遗传距离最小为 0. 045 0, 遗传一致度最大为 0. 956 0, 遗传分化程度最低。图 2 为基于 $Nei's$ 遗传距离绘出的香鳞毛蕨遗传 6 个居群的 UPGMA 聚类图, 其中居群 3 镜泊湖居群与各居群的遗传差异最大。经 Mantel 检测, 居群间的遗传距离和地理距离之间存在着显著的正相关关系($r = 0. 590 6$, $P = 0. 010 6$)。

表 4 香鳞毛蕨各种群间的 $Nei's$ 遗传相似度 (右上角) 和遗传距离(左下角)

Table 4 $Nei's$ genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of all *D. fragrans* populations

居群	Pop 1	Pop 2	Pop 3	Pop 4	Pop 5	Pop 6
Pop 1		0. 853 1	0. 815 7	0. 763 4	0. 768 4	0. 834 5
Pop 2	0. 158 8		0. 832 6	0. 767 0	0. 820 7	0. 887 9
Pop 3	0. 203 7	0. 183 2		0. 792 5	0. 889 3	0. 890 3
Pop 4	0. 269 9	0. 220 0	0. 222 8		0. 845 5	0. 843 5
Pop 5	0. 263 4	0. 199 6	0. 117 3	0. 191 7		0. 956 0
Pop 6	0. 181 0	0. 118 9	0. 116 2	0. 199 2	0. 045 0	

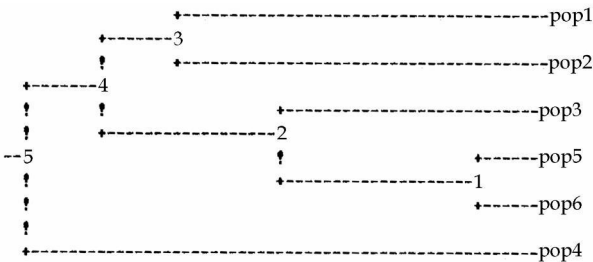


图 2 6 个居群基于遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig 2 UPGMA Dendrogram of six populations with genetic distance

3 讨论

3.1 遗传多样性: 植物的遗传多样性与物种的地理

分布范围有着很强的关联性^[8]。自然分布范围大的物种通常包含较多的遗传多样性^[9]。香鳞毛蕨在黑龙江境内的多态位点比率为 76.67%, 具有较高的遗传多样性, 香鳞毛蕨在我国黑龙江、河北、吉林、辽宁、内蒙都有分布, 其在较大范围内的遗传多样性可能较高, 表明其物种的遗传多样性丰富。

香鳞毛蕨在各个居群多态带百分率变化较大, 多态位点百分率 27.78% ~ 64.64%, 其中居群 11 最高, 为 64.44%; 居群 2 最低, 为 27.78%。

3.2 遗传结构: 用 POPGENE 计算出的香鳞毛蕨居群间遗传分化系数 $G_{st} = 0.4125$, 其遗传多样性 41.25% 分布在居群间, 58.75% 分布在居群内。

影响植物种群遗传结构的主要因素依次为: 繁育系统、分布范围和生活型^[10]。另外, 种子扩散机制也显示了类群间居群分化系数上的很大差异, 靠风力散布的植物具有低水平的居群分化 ($G_{st} = 0.143$), 而靠重力散布的植物具有相当强的居群分化水平 ($G_{st} = 0.277$)^[11]。目前对蕨类植物繁育系统和孢子扩散机制的研究尚未见报道, 根据实验数据推测香鳞毛蕨孢子的扩散范围可能很局限。且根据野外调查发现, 香鳞毛蕨的生长环境为熔岩地区, 其主要生于岩石缝中, 土壤稀薄, 这也导致了香鳞毛蕨孢子扩散并成功繁育的局限性。

香鳞毛蕨居群间 N_m 为 0.7121 (< 1), 这就意味着居群间基因流不足以防止居群间的遗传分化。Wright^[10]指出: 如果 N_m 小于 1, 则由于遗传漂变可导致小居群间明显分化, 而遗传漂变作用加剧。因此遗传漂变可能是导致香鳞毛蕨居群间遗传分化的重要因素之一。

3.3 遗传距离: Mantel 检验的结果显示香鳞毛蕨居群间遗传距离和地理距离有极显著的相关性 ($r = 0.5906$, $P = 0.0106$), 这表明香鳞毛蕨居群间的基因流受地理隔离的影响, 这也是导致种群间遗传分化大的重要因素。

同时, Nei's 遗传距离绘出的香鳞毛蕨 6 个居群的 UPGMA 聚类进一步证明了上述观点。五大连池二池和南北泉 2 个地区的香鳞毛蕨这两个居群亲缘关系最近, 先聚合在一起, 其遗传距离最小, 地理距离最小。而居群 3 镜泊湖居群与各居群的遗传距离较远, 可能是地理距离较远, 生境差异较大, 基因

交流的可能性相对较小所造成的。

3.4 遗传多样性保护: 了解物种的遗传结构和遗传多样性, 对探讨物种濒危机制、指导迁地保护和引种栽培、自然保护区的规划及评估特定群体的保护价值等有着重要价值^[12]。根据本实验结果, 香鳞毛蕨在物种水平具有较高遗传多样性, 但群体间遗传分化较大, 不同产地香鳞毛蕨具有不同的遗传特征。另外由于其生境均为火山熔岩环境, 具有特殊性。所以应对香鳞毛蕨居群的各个个体采取及时的就地保护策略, 尤其是对遗传多样性最低且数量最少的欧浦居群进行重点保护, 另外对于五大连池、镜泊湖等火山地质旅游景点的环境保护和防止人类的采集活动是极为重要的。

致谢: 所有样品均由东北农业大学刘保东教授鉴定, 部分样品经中国科学院张宪春研究员鉴定。特此向两位老师表示衷心的感谢。

参考文献:

- [1] 沈志滨, 金哲雄, 张德连, 等. 香鳞毛蕨治疗银屑病的作用研究 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 448-449
- [2] 沈志滨, 金哲雄, 张德连, 等. 香鳞毛蕨的生药学研究 [J]. 中草药, 2002, 33(7): 661-663
- [3] Ito H, Muranaka T, Mori K, et al. Dryofragin and aspidin PB, piscicidal components from *Dryopteris fragrans* [J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(10): 1720-1722
- [4] Vos F, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for NDA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407
- [5] 李凤岚, 马小军. 药用植物分子遗传图谱研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 129-133
- [6] 张杰, 徐涛, 张建光, 等. 半夏栽培品遗传差异的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1884-1889
- [7] 邹喻萃, 汪小全, 雷一丁, 等. 几种濒危植物及其近缘类群基因组 DNA 的提取和鉴定 [J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528-533
- [8] Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1989
- [9] Loveless M D, Hamrick J L. Ecological determinants of genetic structure in plant population [J]. Ann Rev Ecol Systematics, 1984, 15: 65
- [10] Wright S. The genetical structure of population [J]. Ann Eugen, 1951, 15: 323-354
- [11] Barrett B A, Kidwell K K. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest [J]. Crop Sci, 1998, 38: 1261-1271
- [12] 闫志峰, 张本刚, 张昭. 迁地保护黄檗群体的遗传多样性评价 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(10): 1121-1125