

河南产不同居群柴胡遗传多样性分析

袁王俊¹, 张维瑞², 尚富德^{2*}

1. 河南大学 中药研究所, 河南 开封 475004

2. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004

摘要: 目的 研究河南野生柴胡遗传多样性。方法 利用伏牛山区和太行山区的 4 个居群 36 份个体的 ITS 序列进行了遗传多样性分析。结果 基于 ITS 序列共得到 13 个单倍型 (A~M), 单倍型多样性指数 (H) 为 0.758 ± 0.0013 , 核酸多样性指数 (π) 为 0.00473, 遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.3198, 种群间基因流 (N_m) 为 0.53。结论 河南野生柴胡种群具有较高的遗传多样性, 但部分地区已经造成了柴胡遗传多样性的降低, 柴胡种群间地理距离会限制种子介导的基因流。

关键词: 柴胡; 遗传多样性; 单倍型; 核酸多样性指数; 基因流

中图分类号: R282.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1166-04

Analysis on genetic diversity of *Bupleurum chinense* from different geographical populations in Henan Province

YUAN Wang-jun¹, ZHANG Wei-rui², SHANG Fu-de²

1. Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China

2. College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity of *Bupleurum chinense* in Henan Province. **Methods** ITS sequences of 36 individuals of *B. chinense* collected from four populations in Funiu Mountain and Taihang Mountain areas were used to investigate the genetic diversity of *B. chinense*. **Results** Based on ITS sequence data, 13 haplotypes (A—M) were identified, the diversity index (H) and nucleotide diversity index (π) were 0.758 ± 0.0013 and 0.00473, respectively. Genetic differentiation index (G_{st}) was 0.3198, and gene flow (N_m) among populations was 0.53. **Conclusion** The results indicate that the wild populations of *B. chinense* in Henan Province still have high genetic diversity, but genetic diversity of populations in some areas declines dramatically. Geographic distance among populations will limit the seed-mediated gene flow.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; genetic diversity; haplotype; nucleotide diversity index; gene flow

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. 的干燥根。柴胡始载于《神农本草经》, 已有两千多年的药用历史, 能疏散退热、疏肝解郁、声举阳气, 用于感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛、月经不调、子宫脱垂、脱肛等症^[1]。主要分布于我国东北、西北、华中、华北。柴胡为我国常用大宗中药材品种之一, 不仅国内需求量大, 而且出口量大。由于来源长期依赖采挖, 野生资源及其生境破坏严重, 资源已近枯竭, 20 世纪 80 年代被列为国家计划管理品种。

种质资源是育种的基础, 遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分, 是指种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和。一个物种就是一个

独特的基因库, 物种的多样性显示了基因遗传的多样性。遗传多样性是每个物种或种群所固有的特性, 遗传多样性越丰富, 其生命力就越顽强, 反之则弱。因此, 在遗传多样性研究指导下对种质资源的收集、保存、评价和利用, 可以掌握种质资源多样性状况、遗传背景, 制定可持续开发利用的方案, 为合理保护与科学利用种质提供科学依据。柴胡种质资源遗传关系研究已有报道, 王秀全等^[2]采用 RAPD 研究了吉林省东丰县北柴胡栽培基地 5 种柴胡品种的种源道地性。赵良贵等^[3]采用 RAPD 和 AFLP 分子标记研究了不同栽培品种的遗传多样性。随着测序技术的发展测序成本不断下降, DNA 测序正蓬勃发展并成为比较分子数据的一个主要手段, 为植物遗

收稿日期: 2011-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30971076)

作者简介: 袁王俊 (1972—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为药用植物资源。E-mail: yuanwangjun@henu.edu.cn

*通讯作者 尚富德 E-mail: fudeshang@henu.edu.cn

传多样性研究开辟了广阔的前景。

河南是野生柴胡的主产地之一,野生柴胡资源破坏严重,而遗传多样性、引种驯化和栽培等工作则至今没有开展。本研究测定核基因组的 ITS 片段,分析了河南产不同居群柴胡的遗传多样性,为河南野生柴胡资源的评价、保护和育种提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 采自河南伏牛山区和太行山区 4 个野生种群,龙峪湾 (LYW) 和老界岭 (LJL) 属于伏牛山区,九莲山 (JLS) 和万仙山 (WXS) 属于太行山区。每个种群随机采集 9 份个体,个体间距保持 50 m 以上。采集当年萌发的新叶,放在保鲜袋中,变性硅胶干燥,置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存备用。大叶柴胡 *Bupleurum longiradiatum* Turcz. 和狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. 为 2 个外类群,均由河南大学生命科学学院董美芳副教授和袁王俊副教授共同鉴定。

1.2 PCR 扩增与 DNA 测序

使用宝生物工程(大连)有限公司植物基因组 DNA 抽提试剂盒(DV811A)提取柴胡基因组 DNA,操作流程按试剂盒说明书进行。以 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量。

扩增 ITS 区所用引物为 ITS-4 5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3' 和 ITS-5 5'-GGAAGTAAAGT-CGT AACAAGG-3'^[4]。引物、Taq 聚合酶等均来自上海生工生物工程技术有限公司。扩增反应在 Long Gene MG96⁺ PCR 仪上进行,扩增反应体系为 50 μL , 反应体系包括 50 ng 基因组 DNA, 4 μL 10 mmol/L dNTPs, 2 μL 10 mmol/L 引物, 和 2.5 U Taq 酶。PCR 反应扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 32 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、8 min。产物送华大基因科技股份有限公司测序。

1.3 数据分析

核基因片段 ITS 采用单倍型减法获得单倍型序列^[5-6]。将所得到的 ITS 序列用 ClustalX 1.83 软件^[7]进行序列比对,并进行适当的人工校正、剪切,使每条序列前后端对齐。

应用 DnaSP version 4.0^[8]对总体水平以及每个种群的遗传多样性参数 [遗传多样性 (H)^[9]和核苷酸多样性 (π)^[10]] 进行估计,并估算种群间的基因流 (Nm) 与分化系数 (Gst)^[11]。以狭叶柴胡和大叶柴胡为外类群,用 MEGA 4.0 软件^[12]进行单倍型

的系统发育分析,构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 树,模型选用 Kimura 2-parameter^[13]。用 Bootstrap 分析检验 NJ 树中各分支的内部支持率。

采用 Arlequin 3.0 软件^[14]中的 AMOVA 进行分子变异分析,计算群体内、群体间的变异方差分布及群体间遗传分化指数 (Fst)。

对柴胡 ITS 片段进行 Tajima's D 和 Fu & Li's D^* 、 F^* 检测,判断这些位点是否符合中性进化模式,以鉴定柴胡种群大小的变化。失配分布分析 (mismatch distribution analysis) 推测种群是否经历过扩张或瓶颈效应^[15-16]。这两个分析也均用 DnaSP version 4.0 软件进行。

2 结果与分析

本研究共对来自河南 4 个居群的 36 份柴胡个体进行 ITS 片段的测序, DNA 序列提交至 GenBank, 序列号为 JN800307~JN800319, 外类群大叶柴胡的 GenBank 序列号为 HM114236, 狭叶柴胡的序列号为 EU592005。ITS 片段比对后的长度为 413 bp, 共存在 14 个碱基替代位点, 产生 13 个单倍型 (A~M, 表 1)。单倍型 A 数目最多, 为 31 个, 其次是单倍型 C, 为 27 个, 单倍型 B、G、J, 分别只有 2 个, 单倍型 D、E、F、H、I、K、L、M 则分别仅有 1 个 (表 2)。LYW 有 2 个单倍型 (A、C), LJL 有 4 个单倍型 (A、C、L、M), JLS 有 5 个单倍型 (B、C、D、F、I), WXS 单倍型种类最多, 为 6 个 (C、E、G、H、J、K)。单倍型 C 是所有种群共有的单倍型。

为了进一步阐明核基因单倍型 A~M 的系统关系, 本研究以狭叶柴胡和大叶柴胡为外类群构建了系统树 (图 1)。其中 A、B、C、L、M 聚为一枝, 支持率为 60%, 除了 B 以外, A、L、M 这 3 个单倍型均只存在于伏牛山区所在的种群 (LYW 和 LJL)。而 A 和 C 为主要的单倍型, 总和为 58 个。其余的单倍型则与 A、B、C、L、M 这个枝平行, 支持率也是 60%。

根据 ITS 序列所得柴胡单倍型 $H=0.758\pm 0.001\ 3$, $\pi=0.004\ 73$ 。WXS 种群多样性水平最高 ($H=0.683\pm 0.014\ 4$, $\pi=0.002\ 97$), 其次为 JLS 种群 ($H=0.484\pm 0.019\ 1$, $\pi=0.002\ 26$), LJL 种群多样性水平最低 ($H=0.405\pm 0.020\ 4$, $\pi=0.005\ 05$)。基于 ITS 序列种群间 Gst 为 0.319 8, 种群间 Nm 为 0.53。LJL 与 JLS 种群间分化最大 (Gst 为 0.381 5), LYW 与 JLS 种群遗传分化次之为 0.36, 遗传分化最小的为 JLS

表 1 柴胡核基因片段 ITS 变化

Table 1 ITS variation of nuclear gene segments in *B. chinense*

单倍型	ITS 核酸位置 / bp													
	22	151	191	214	230	239	262	289	312	325	338	343	364	374
A	A	T	T	G	T	C	A	A	T	G	G	A	C	A
B	A	T	T	A	T	C	G	A	T	G	G	A	G	A
C	A	T	T	A	T	C	A	A	T	G	G	A	C	A
D	A	T	T	A	T	C	A	A	T	A	G	C	C	C
E	A	T	T	A	T	C	A	A	T	G	G	C	C	C
F	A	T	T	A	T	C	A	A	T	G	T	C	C	C
G	A	T	T	A	T	C	A	A	T	G	T	A	C	C
H	A	T	T	A	T	C	A	A	T	A	T	A	C	C
I	A	T	T	A	T	C	A	A	T	G	G	A	C	C
J	A	T	T	A	T	C	A	A	C	G	G	A	C	C
K	A	T	T	A	G	C	A	T	C	G	G	A	C	C
L	A	T	T	A	T	G	A	A	C	G	G	A	C	A
M	C	C	C	A	T	C	A	A	T	G	G	A	C	A

表 2 种群基本信息

Table 2 Basic information of populations

种群	单倍型个体数 / 个												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
LYW	17		1										
LJL	14		2									1	1
JLS		2	13	1		1			1				
WXS			11		1		2	1		2	1		

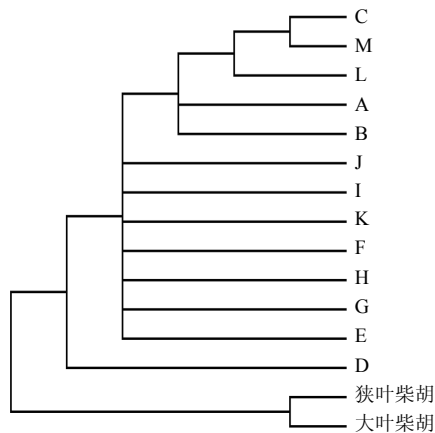


图 1 基于 ITS 序列建立的单倍型邻接树

Fig. 1 Haplotype NJ tree based on ITS sequence

与 WXS 种群 (G_{st} 为 0.002 85), LYW 与 LJL 种群遗传也非常小, 仅为 0.011 7。总之, 同一山区种群间遗传分化都非常小。ANOVA 结果 (表 3) 表明柴胡群体间的遗传变异 (61.87%) 高于群体内的变异 (38.13%), 群体间的差异已达到了显著水平 ($F_{st}=0.618 72, P<0.001$), 柴胡种内存在着较高水平的遗传分化。中均为负值, 但不显著。表明这些位点符合中性进化模式, 柴胡在整体水平上并未经历过瓶颈效应或快速扩张等。失配分布分析同样支持柴胡种群大小没有快速增长, 失配分布呈多峰分布 ($r=0.069, P=0.264$) (图 2)。

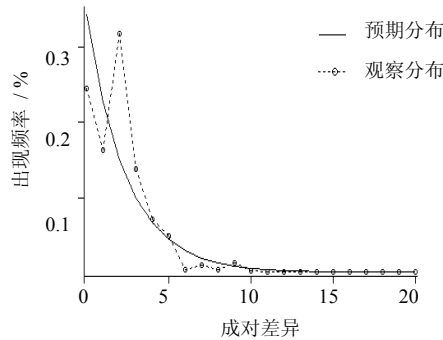
3 讨论

柴胡是广泛分布于北半球亚热带地区的草本, 种群规模很大, 应该具有高的遗传多样性。王秀全等^[2]用 RAPD 分子标记研究了 4 个不同种源柴胡的遗传多样性, 发现不同种源柴胡可以明显分开, 说明柴胡种内存在明显的多样性。本实验也发现河南柴胡野生种群具有较多的基因型, 单倍型在该地区数目为 13 ($H=0.758 \pm 0.001 3$), 尤其是太行山区遗传多样性程度更高, 单倍型在该地区数目为 11, 两个居群的单倍型多样性指数都最高, 可能是太行山区生态环境条件复杂, 能够较好保存柴胡的野生种

表 3 柴胡群体分子变异分析

Table 3 Analysis on molecular variation in all populations of *B. chinense*

变异来源	自由度	方差组分	变异分量	变异百分比 / %	F 值
居群间	3	55.014	0.985 05 Va	61.87	
局群内	68	41.278	0.607 03 Vb	38.13	
总体水平	71	96.292	1.592 08		0.618 72



实线代表种群扩张下的预期分布，虚线代表实际分布
Solid line represents expectant distribution under expanding population
Dashed line represents real distribution

图 2 基于 ITS 序列的柴胡的失配分布分析
Fig. 2 Mismatch distribution analysis of *B. chinense* based on ITS sequences

群资源。太行山区两个种群遗传多样性相对较高，而伏牛山区两个种群遗传多样性较低。可能是由于伏牛山区受到更多的为干扰。而人为干扰很大程度上会造成近亲繁殖，从而增加整个遗传上的同源性，使得遗传多样性丢失，从而形成目前伏牛山区种群遗传多样性较低的格局。遗传分化分析表明，同一山区种群间遗传分化较小，太行山区 JLS 与 WXS 之间 G_{st} 为 0.002 85，伏牛山区 LYW 与 LJL 之间 G_{st} 为 0.011 7。而不同山区种群间 G_{st} 最小的为 0.262 7 (LYW 与 WXS)，最高的为 0.36 (LYW 与 JLS)。表明种群间地理距离与遗传分化呈正相关。种群间地理距离的远近限制了传播种子介导的基因流。

失配分布指的是单倍型两两之间观察到的差异数目的分布，能够推测种群大小是否发生过变化。通常在动态平衡下，从种群中抽取样本，失配分布表现出多模式（双峰或者多峰），能反映基因树的高度随机性；但是如果种群经历过扩张后，这种分布变为单模式分布（钟型曲线分布），显然本研究表现为双峰（图 2）。Tajima's D 值对种群的动态历史比较敏感。显著性的 D 值（正值或者负值）可能是由于种群扩张、瓶颈效应等因素引起，而不是选择的影响。本研究中性检验与失配分布分析发现，Tajima's D 值和 Fu & Li's 检验 D^* 和 F^* 值均为负值，且都不显著。综上所述，认为柴胡种群在过去并未经历明显的瓶颈效应或进行快速的扩张，而是处于种群的动态平衡状态。

本研究结果表明河南野生柴胡具有较高的遗传多样性，但部分人类活动较多的地区造成柴胡种群的遗传多样性降低。柴胡种群间地理距离会限制种子介导的基因流。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[2] 王秀全, 李玉新, 李会成, 等. 北柴胡种源地性的 RAPD 分析 [J]. 中药材, 2003, 2(12): 855-856.
[3] 赵良贵, 南晓洁, 郝媛媛, 等. 柴胡栽培种的 RAPD 和 AFLP 遗传关系研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 113-117.
[4] Innis M S, Gelfand D H. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [M]. New York: Academic Press, 1990.
[5] Zhou C, Zeng K, Wu W, et al. Population genetics of speciation in non-model organisms: I. Ancestral polymorphism in mangroves [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(12): 2746-2754.
[6] Clark A G. Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations [J]. *Mol Biol Evol*, 1990, 7(2): 111-122.
[7] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
[8] Rozas J, Sanche Z, Delbarrio J C, et al. Dnasp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496-2497.
[9] Neim T, Ajima F. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data [J]. *Genet Abstr*, 1983, 105(1): 205-217.
[10] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics* [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
[11] Hudson R R, Slatkin M, Maddison W P. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data [J]. *Genet Abstr*, 1992, 132(2): 583-589.
[12] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
[13] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *J Mol Evol*, 1980, 16(2): 111-120.
[14] Excoffier L, Lischer H E L. Arlequin suite ver 3. 5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Mol Ecol Res*, 2010, 10: 564-567.
[15] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genet Abstr*, 1997, 147: 915-925.
[16] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genet Abstr*, 1989(123): 585-595.