

短柄乌头遗传多样性的 AFLP 分析

杜春华¹, 普春霞², 刘小莉², 杨礼攀², 张爱丽², 钱子刚^{2*}

1. 云南省药物研究所 云南白药集团创新研发中心 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111

2. 云南中医学院, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 对濒危药用植物短柄乌头 *Aconitum brachypodum* 遗传多样性进行研究。方法 选用 3 对引物对短柄乌头 4 个自然居群 105 个样品进行了 AFLP 分析, 利用 POPGENE32、MEGA4、NTSYS 等生物统计软件进行相关参数计算和聚类分析。结果 在短柄乌头物种居群间的遗传多样性水平上, 多态位点百分率为 80.57%, Nei's 基因多样性指数 (H_e) 为 $0.322\ 9 \pm 0.179\ 8$, Shannon's 信息指数 (I) 为 $0.472\ 0 \pm 0.251\ 7$ 。在其居群内, 多态位点百分率为 12%, H_e 为 $0.115\ 4 \pm 0.044$, I 为 $0.168\ 0 \pm 0.065\ 3$ 。Nei's 基因分化系数 (G_{st}) 为 0.864 2。聚类分析表明, 禄劝居群和东川居群聚为一支, 丽江居群和会泽居群聚为一支。结论 短柄乌头物种居群间的遗传多样性丰富, 居群内的多样性偏低。居群间存在显著的遗传分化。AFLP 对短柄乌头的遗传多样性分析对其保护提供依据。

关键词: 短柄乌头; AFLP; 遗传多样性; 聚类分析; 种质资源

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0439-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.026

AFLP analysis of genetic diversity of *Aconitum brachypodum*

DU Chun-hua¹, PU Chun-xia², LIU Xiao-li², YANG Li-pan², ZHANG Ai-li², QIAN Zi-gang²

1. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center, Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China

2. Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity of *Aconitum brachypodum*, an endangered medicinal plants. **Methods** Three pair primers were used to evaluate the relevant genetic parameters and clustering pattern for four natural populations containing 105 individuals by using POPGENE32, MEGA4, NTSYS and other biometric softwares. **Results** For *A. brachypodum*, the Nei's genetic diversity index (H_e), Shannon's information index (I), percentage of polymorphic loci (PPB) were $0.322\ 9 \pm 0.179\ 8$, $0.472\ 0 \pm 0.251\ 7$, and 80.57%, respectively; and the population level were $0.115\ 4 \pm 0.044$, $0.168\ 0 \pm 0.065\ 3$, and 12%, respectively. The genetic differentiation index (G_{st}) was 0.864 2. The clustering results showed that, Luquan and Dongchuan populations are grouped together, Lijiang and Huize populations are clustered together. **Conclusion** *A. brachypodum* possesses the relatively high level of genetic diversity at the species level, however, low within populations. This study should provide an initial insights for *A. brachypodum* germplasm conservation

Key words: *Aconitum brachypodum* Diels; AFLP; genetic diversity; cluster analysis; germplasm resources

短柄乌头 *Aconitum brachypodum* Diels 系毛茛科 Ranunculaceae 植物, 生于海拔 2 800~3 700 m 的高山草地、山地草坡或山坡灌丛中^[1]。分布于甘肃、四川西南部、云南西北部及青海等省区, 具有祛风除湿、散瘀疗伤及活血止痛等功效, 用于治疗风寒湿痹所致的筋骨和关节疼痛、跌打损伤所致的瘀血疼痛及虫蛇咬伤等症^[2]。短柄乌头

化学成分主要为二萜生物碱类, 分为 C₁₉-二萜生物碱和 C₂₀-二萜生物碱, 以及 4 个非生物碱类化学成分^[3-7], 其具有镇痛、抗炎、抗菌作用^[8-10], 为骨痛宁酊、无敌膏、雪上一支蒿片等中成药制剂的组方药材之一, 是云南、贵州、湖南等地的习用药材。人为大量采挖较严重, 目前数量急剧减少。现已作为稀有濒危物种列于《中国植物红

收稿日期: 2017-07-25

作者简介: 杜春华 (1983—), 女, 云南昆明人, 硕士, 工程师, 主要从事中药的分析研究。

*通信作者 钱子刚 (1962—), 男, 浙江宁波人, 教授, 博士, 主要从事中药资源学研究工作。E-mail: qianzig@aliyun.com

皮书》中^[11]。物种的遗传多样性是长期进化的产物,也是物种生存和发展的前提,物种的遗传多样性越高或遗传变异越丰富,对环境变化的适应能力越强,其进化的潜力就越大。因此,明确短柄乌头的遗传基础,可以对其实施有效的保护并最大限度保存其遗传多样性^[12-14]。

分子标记技术 AFLP (amplification fragment length polymorphism) 是指扩增的限制性片段长度多态性结合了 RFLP 和 RAPD 的优点,既具有 RFLP 可靠性好、重复性高的优点,同时又具有 RAPD 操作简便、快速的优点,是一种研究物种遗传多样性的理想分子标记技术^[15-16]。目前,尚未见到 AFLP

用于短柄乌头种质资源遗传多样性的研究报道。本研究运用 AFLP 技术对具有代表性的 4 个短柄乌头居群的 105 个样本进行遗传多样性检测,了解短柄乌头自然居群的遗传变异及遗传结构,推测其致濒原因,为制定其种质资源的保护策略及其合理开发利用提供科学依据。

1 材料

在短柄乌头 *Aconitum brachypodum* Diels 的花果期,采集干净健康叶片用变色硅胶干燥后于 -20 °C 保存。样品基本情况见表 1。标本均由云南中医学院钱子刚教授鉴定,凭证标本保存于云南中医学院中药材优良种苗繁育中心实验室。

表 1 短柄乌头 4 个自然居群的取样情况

Table 1 Sampling situation of four natural populations of *A. brachypodum*

居群	采样数/株	采集地	地理位置	海拔/m	凭证标本号
云南东川	30	东川区汪家箐大牯牛山	N22°51.783', E103°59.463'	3180	20080824
云南禄劝	30	禄劝县雪山乡书姑槽子	N26°06.515', E102°49.767'	3220	20080917
云南会泽	21	会泽大海乡滴水岩	N26°09.656', E103°13.393'	3360	20081103
云南丽江	24	丽江玉龙雪山	N27°41.127', E99°44.006'	3780	20081112

2 方法

2.1 总 DNA 提取和检测

本实验使用改良 CTAB 法^[17]提取总 DNA。用蛋白核酸定量测定仪测其 A_{260}/A_{280} 应为 1.8~2.0; 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。

2.2 酶切

酶切体系反应总体积为 20 μ L, 其中包括短柄乌头基因组 DNA (30~100 ng) 12 μ L, EcoRI (20 000 U/mL) 0.25 μ L, MseI (10 000 U/mL) 0.5 μ L, BSA (100 $\times$) 0.2 μ L, NEB buffer (10 $\times$) 2.0 μ L, ddH₂O 5.05 μ L。37 °C 水浴 3 h 后 70 °C 反应 15 min, 灭活酶后, 离心, 置于冰上。外加 1 个 λ DNA EcoRI 单酶切进行对照实验。

2.3 连接

酶切后, 取 4 μ L 反应液于 20 μ L 连接反应体系中, 其中包括 MseI 接头 (50 pmol/ μ L) 2 μ L, EcoRI 接头 (5 pmol/ μ L) 2 μ L, T4 DNA 连接酶 (350 U/ μ L) 1 μ L, T4 buffer (10 $\times$) 2 μ L, ddH₂O 9 μ L, 室温下混匀, 离心, 16 °C 水浴 12 h 后 72 °C 保温 10 min, 冷却到室温, 将上述反应液稀释 10 倍, 不用的部分保存于 -20 °C 冰箱中。

2.4 预扩增

取 2 μ L 经过稀释 10 倍后的连接反应液, 加入 23 μ L 预扩增反应体系中: MseI+C 引物 (33 ng/ μ L)

1 μ L, EcoRI+A 引物 (33 ng/ μ L) 1 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 (1 U/ μ L) 1 μ L, PCR buffer (10 $\times$) 2.5 μ L, ddH₂O 14 μ L。瞬时离心之后, 在 PCR 仪上扩增, 反应参数为 94 °C、3 min; 94 °C、30 s; 56 °C、30 s; 72 °C、1 min, 共 30 个循环; 72 °C、5 min; 4 °C 保温。

2.5 选择性扩增

将预扩增产物稀释 10 倍后取 2 μ L 进行选择 PCR 扩增, 加入 23 μ L 选择性扩增反应体系中: 引物对 EcoR I+XXX 与 Mse I+XXX 各 1 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 (1 U/ μ L) 1 μ L, PCR buffer (10 $\times$) 2.5 μ L, ddH₂O 14 μ L。瞬时离心之后, 在 PCR 仪上扩增, 反应参数为 94 °C、3 min; 94 °C、30 s; 65 °C (每个循环降低 0.7 °C) 30 s; 72 °C 1 min, 共 12 个循环; 94 °C、30 s; 56 °C、30 s; 72 °C、1 min, 共 12 个循环; 72 °C、5 min; 4 °C 保温。

2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染

PCR 扩增产物加入等体积上样缓冲液, 混匀后 94 °C 变性 7 min, 迅速冰浴冷却, 10 min 后上样, 电泳在 DNA 测序电泳槽 (Bio-Rad) 中进行, 采用 Sequi-Gen[®] GT/3000 PAC 系统 6% 的 PAGE 胶进行电泳^[18]。电泳完毕进行固定、水洗、银染、冲洗、

显影、定影和干燥等银染程序。

2.7 数据处理

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、MEGA4、NTSYS 等生物统计软件进行相关参数计算和聚类分析。

3 结果与分析

本研究选用东川居群样本进行引物筛选，结果从 30 对选择性 PCR 引物组合中筛选出 3 对多态性好、条带分布均匀、清晰易辨的引物来扩增（EcoRI+ACT/MseI+CAA、EcoRI+ACA/MseI+CAA、EcoRI+ACG/MseI+CTA）。对 105 个个体样本进行扩增，由于本实验样本的 DNA 要经过酶切、连接、预扩增、选择性扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染这 6 个步骤，有些居群样本的 DNA 质量不好，在最后的步骤就没有电泳出来，最终 3 对引物均能得到很好的扩增效果的有 48 个样本（图 1、表 2）。

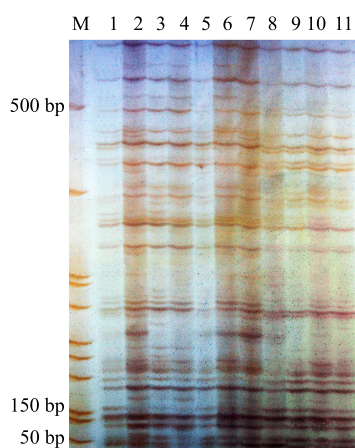


图 1 引物 EcoRI+ACA/MseI+CAA 对东川居群选择性 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoretogram of selecting PCR products generated by primer combination of EcoRI + ACA/MseI + CAA in Dongchuan population

3.1 物种和居群水平的遗传多样性

3 对引物对短柄乌头 4 个自然居群 105 个样品进行了 AFLP 检测，最终得到扩增效果好的 48 个样本，所得片段在 40~700 bp，总共产生了 175 条带，其中多态性条带 141 条，各引物之间相差不大（表 2）。在物种居群间的水平上，多态位点百分率为 80.57%，等位基因数（ N_a ）为 1.8057 ± 0.3968 ，Nei's 基因多样性指数（ H_e ）为 0.3229 ± 0.1798 ，Shannon's 信

表 2 3 对引物的单独扩增能力

Table 2 Bands generated by three primer pairs

引物组合	扩增总带数	多态性位点数	多态位点百分率/%
EcoRI+ACT/MseI+CAA	62	61	98.39
EcoRI+ACA/MseI+CAA	60	52	86.67
EcoRI+ACG/MseI+CTA	53	32	60.38
总计	175	145	81.81

息指数（ I ）为 0.4720 ± 0.2517 。表明短柄乌头在物种居群间的水平上仍保留较为丰富的遗传多样性。

在短柄乌头居群内的水平上，多态位点百分率为 12%， N_a 为 1.1200 ± 0.3011 ，有效等位基因数（ N_e ）为 1.0765 ± 0.2087 ， H_e 为 0.1154 ± 0.0440 ， I 为 0.1680 ± 0.0653 。多态位点在各个居群中的分布有所差异，4 个居群扩增出的多态位点百分率为 2.29%~23.43%，其中禄劝居群最高（23.43%），丽江居群次之（12.57%），会泽居群最低（2.29%），见表 3。表明短柄乌头物种居群间的遗传多样性高于居群内的遗传多样性。

3.2 居群遗传结构

POPGENE 分析结果显示，4 个居群间总基因多样性（ H_t ）为 0.3242 ± 0.0324 ，居群内基因多样性（ H_s ）为 0.0440 ± 0.0046 ，Nei's 基因分化系数（ G_{st} ）为 0.8642，居群间的基因多样性（ $D_{st} = H_t - H_s$ ）为 0.2802 ± 0.0278 ，基因流（ N_m ）为 0.0393。

利用 POPGENE 软件得出的 G_{st} 值，计算得各代迁移的个体数，以此来表征基因流。短柄乌头居群间的平均 N_m 为 0.0393，小于 1。

3.3 短柄乌头各居群的遗传关系

短柄乌头自然居群间的遗传距离在 0.3894~0.6036，差异较大。其中丽江居群和东川居群的遗传距离最大（0.6036）；禄劝居群和东川居群的遗传距离最小（0.3894），见表 4。由 NTSYS 软件对短柄乌头最终扩增出来的 48 个个体计算后得到 4 个居群各个个体的聚类树（图 2）。Mantel 检验，得出 $r=0.905$ ， $P=0.054$ 。其中禄劝居群和东川居群也表现出很近的关系聚为一支，分布于滇西北的丽江居群和分布于滇东北的会泽居群聚为一支，虽有相对远的地理距离，但此 2 居群具有较近的遗传距离（0.4448）聚为一类。

4 讨论

4.1 短柄乌头的遗传多样性和遗传结构分析

本研究结果表明短柄乌头物种居群间的（多态位点百分率为 80.57%， H_e 为 0.3229 ± 0.1798 ）遗传

表 3 居群内部和居群间的 N_a 、 N_e 、 H_e 、 I 及多态位点百分率Table 3 Average number of alleles, effective alleles, H_e , and I of diversity and PPB within populations and intraspecies

居群	样本数	N_a	N_e	H_e	I	多态位点百分率/%
禄劝居群	12	1.234 3±0.424 8	1.176 4±0.335 2	0.182 9±0.098 4	0.262 2±0.142 3	23.43
丽江居群	12	1.125 7±0.332 5	1.054 3±0.175 6	0.102 5±0.034 8	0.155 6±0.055 2	12.57
会泽居群	13	1.022 9±0.149 9	1.017 0±0.114 5	0.063 7±0.009 6	0.091 9±0.013 9	2.29
云南东川	11	1.097 1±0.297 0	1.058 4±0.209 6	0.112 4±0.033 2	0.162 3±0.049 6	9.71
平均值	—	1.120 0±0.301 1	1.076 5±0.208 7	0.115 4±0.044 0	0.168 0±0.065 3	12.00
物种居群间水平	48	1.805 7±0.396 8	1.568 5±0.353 8	0.322 9±0.179 8	0.472 0±0.251 7	80.57

表 4 4 个居群的遗传一致性 (斜上) 和 Nei's 的无偏差遗传距离 (斜下)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) within four populations

居群	禄劝居群	丽江居群	会泽居群	东川居群
禄劝居群 (1~12)	****	0.601 6	0.641 0	0.677 5
丽江居群 (13~24)	0.508 2	****	0.628 8	0.546 8
会泽居群 (25~37)	0.444 8	0.463 9	****	0.572 0
东川居群 (38~48)	0.389 4	0.603 6	0.558 7	****

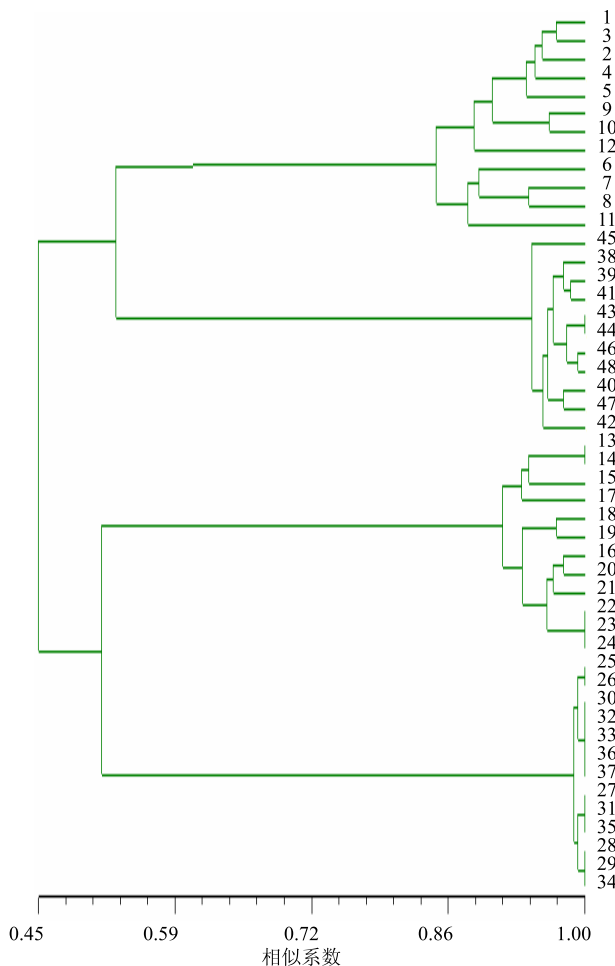


图 2 利用 NTSYS 软件对 48 个样品的聚类分析结果

Fig. 2 Dendrogram analysis of 48 samples by NTSYS software

多样性丰富,但其居群内(多态位点百分率为 12%, H_e 为 $0.115 4 \pm 0.044 0$) 的多样性偏低。根据短柄乌头的居群间遗传分化系数 (F_{st}) 的近似值 G_{st} 为 0.864 2, 表明总遗传多样性的 86.42% 来源于居群间遗传变异, 13.58% 来源于居群内遗传变异, 也就是说居群间的遗传分化大于居群内。造成短柄乌头居群内遗传多样性低下的原因是多方面的。首先, 自交或近交衰退引起短柄乌头居群内遗传多样性降低。短柄乌头物种居群间的多样性明显高于居群内的多样性恰好说明了这一点。其次传粉媒介传粉能力有限, 传粉昆虫多为熊蜂^[19], 由于短柄乌头生长在海拔较高 (3 000 m 以上) 的生境中, 传粉昆虫的活动收到了阻碍, 进而促使了自交或近交的可能性增大。虽然种子结实率高, 但是其散布距离有限, 使得居群间基因流受到很大程度上的限制, 居群间遗传分化增大, 从而使得居群内遗传多样性降低。Wright^[20]指出, 若 $N_m < 1$, 则遗传漂变可以导致居群间明显的遗传分化, 因此, 基因流受阻与遗传漂变可能是导致短柄乌头居群间产生较大遗传分化的主要原因。由于居群内遗传多样性低是短柄乌头遗传结构的特点, 为了丰富居群内的遗传多样性, 应该人为加强其居群间的基因交流。

4.2 短柄乌头各居群聚类分析和 Mental 检验

基于短柄乌头个体间层次和居群间层次的遗传相似系数的聚类分析, 聚类图中各个体间, 各居群间, 聚类关系明确、层次分明, 证明 AFLP 分子标

记技术能很好地检测到短柄乌头种内的遗传变异,为短柄乌头遗传连锁图谱的构建奠定了基础。Mantel 检验能否表明居群间的遗传距离与地理距离有没有相关性,需要增加居群的取样量,再进行深入分析。

4.3 短柄乌头濒危机制探讨

笔者推断造成短柄乌头濒危的因素有 2 方面。一方面为自身内在因素:①居群内的遗传多样性低下;②基因流较小。另一方面为人为因素:①生境的破碎化,人为的开发形成了内部环境质量下降。②由于居群空间格局为集群型^[21],靠昆虫传粉,在自然条件下进行有性繁殖,种子以人畜和弹力散布,由于其主要分布区自然条件环境恶劣,人畜稀少,种子散布距离有限,同时居群内存在有自交、近交的可能性,使居群内基因同化严重,遗传多样性偏低如会泽居群(多态位点百分率=2.29%, $H_e=0.063\ 7\pm0.009\ 6$),对遗传多样性偏低的某些单居群来说,较难适应环境变化给种群带来的危险。③人类的过度利用,短柄乌头具有较高的药用价值,以根入药,使得有限的野生资源遭到威胁。

4.4 短柄乌头种质资源有效保护与合理开发

短柄乌头自然居群存在丰富的遗传多样性,为遗传分化相对很高的物种,其 $G_{st}=0.864\ 2$ 。研究表明,对一个基因流较小,种间变异量占 60% ($G_{st}=0.60$) 的物种至少要取样 6 个有效居群才能保存其 95% 的遗传多样性^[22],因此对短柄乌头进行就地保护和迁地保护时其涉及的有效居群数应大于 6 个。对其实施就地保护时,最少要设置 6 个以上的保护点,此策略不仅可以保护其遗传多样性,同时可以保护其生境多样性等多方面的因素,使它们能在各自的小环境中保持特有的遗传变异性,这样更符合自然规律。由于短柄乌头直接被采挖所导致种群大幅度减少,应采取的措施是加大濒危药用植物的保护力度。对于短柄乌头生境的破坏,应对其生存的环境进行保护。对于短柄乌头的引种繁殖,应当将人工繁殖的种群再移植到其植物原有的生境中,这样才能获得保护短柄乌头种质的完全成功。

参考文献

- [1] 中国科学院昆明植物所. 云南植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [3] Shen Y, Zuo A X, Jiang Z Y, et al. Two new diterpenoid

- alkaloids from *Aconitum brachypodum* [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2010, 31(11): 3301-3303.
- [4] Shen Y, Zuo A X, Jiang Z Y, et al. Four new nor-diterpenoid alkaloids from *Aconitum brachypodum* [J]. *Helvetica Chim Acta*, 2010, 93(5): 863-869.
- [5] 王洪云, 左爱学, 孙 赞, 等. 短柄乌头地上部分化学成分研究 [J]. 中药材, 2014, 37(8): 1391-1395.
- [6] 王洪云, 左爱学, 孙 赞, 等. 东川雪上一枝蒿的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4324-4328.
- [7] Yang L G, Zhang Y J, Xie J Y, et al. Diterpenoid alkaloids from the roots of *Aconitum brachypodum* Diels [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18(9): 908-912.
- [8] 王 璐, 高菊珍, 张红宇, 等. 雪上一枝蒿速效止痛搽剂的抗炎镇痛作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21(4): 52-54.
- [9] 黄先菊, 任 炜, 潘 乐, 等. 雪上一枝蒿醇提物体外抗炎作用研究 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2012, 31(4): 36-40.
- [10] 王 静, 毛自文, 范黎明, 等. 30 种植物提取物抑菌活性研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(10): 5918-5919.
- [11] 傅立国. 中国植物红皮书 (第一册) 稀有濒危植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [12] 刘仲敏. 现代应用生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [13] 王博轶, 王跃华. 濒危植物猪血木的保护生物学研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2009.
- [14] 杨 佳, 李晓东, 李新伟, 等. 华中特有珍稀植物裸芸香的 AFLP 遗传多样性分析 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 226-234.
- [15] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucl Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [16] Ulrich G M, La Reesa W L. AFLP genotyping and fingerprinting [J]. *Tree*, 1999, 14(10): 389-392.
- [17] Yang Y W, Xie H, Qian Z G. RAPD Analysis of three populations of *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med*, 2003, 26(3): 21-23.
- [18] 陶爱林, 林兴华, 曾汉来, 等. 高分辨率 AFLP 胶图的获得 [J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(2): 101-104.
- [19] 李娅琼, 游 春. 濒危药用植物短柄乌头丽江居群繁殖生物学研究 [J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(1): 27-31.
- [20] Wright S. The genetical structure of populations [J]. *Ann Eugen*, 1951, 15(4): 323-354.
- [21] 李娅琼, 吴 凯. 濒危药用植物短柄乌头空间分布格局的研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(9): 2265-2267.
- [22] 祖元刚. 濒危植物裂叶沙参保护生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.