

## 附子野生资源群体遗传多样性的 RAPD 分析

侯大斌<sup>1,\*</sup>, 任正隆<sup>2</sup>, 舒光明<sup>3</sup>

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010; 2. 四川农业大学, 四川 雅安 625014;

3. 四川省中药研究所, 成都 610041)

**摘要:**应用 RAPD 标记分析了分布在附子主栽区四川、重庆、陕西及湖北 16 个野生乌头种群的遗传变异。24 个引物共检测到 643 个 RAPD 位点, 多态位点 602 个, 总的多态位点百分率达 93.5%。Shannon 多样性和 Nei 遗传分化结果一致显示重庆酉阳种群和重庆城口种群遗传多样性最高, 四川盐源种群和陕西勉县种群的遗传多样性最低。Shannon 指数测出的种群内的遗传变异 (57.6%) 略占优势, 群体间的遗传分化达到 42.4%; Nei 基因分化系数 ( $G_{ST}$ ) 达 40.0%; 分子方差分析 (AMOVA) 发现群体间遗传变异仅为 25.37%; 种群每代迁移数  $Nm$  为 0.756。Nei 相似性系数的 UPGMA 分析结果显示该地区的野生乌头分布上有一定的地域性, 特别是同为附子道地产地江油供种的北川、安县和青川种群间遗传关系密切, 说明种质资源在道地药材形成中具有重要作用。研究结果表明, 附子主要栽培地区的乌头野生种群之间存在较大的遗传分化, 遗传多样性较高, 遗传种质资源较丰富, 存在一定的特异性资源, 为进一步开发利用乌头(川乌、附子)提供了丰富的种质资源。

**关键词:**附子(乌头); 遗传多样性; RAPD 标记; 种群分化; 野生种群

**文章编号:**1000-0933(2006)06-1833-09 **中图分类号:**Q949.95 **文献标识码:**A

RAPD analysis of genetic diversity in the wild populations of *Aconitum carmichaeli* Dexb. (Ranunculaceae) in China

HOU Da-Bin<sup>1,\*</sup>, REN Zheng-Long<sup>2</sup>, SHU Guang-Ming<sup>3</sup> (1. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang Sichuan 621010, China; 2. Sichuan Agricultural University, Yaan Sichuan 625014, China; 3. Sichuan Institute of Traditional Materia Medica, Chengdu 610041, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(6): 1833 ~ 1841.

**Abstract:** Chuanwu (*Aconitum carmichaeli* Dexb. (Ranunculaceae)) is a traditional Chinese medical herb, widely used for its pharmacological effects, including anti-inflammation and pain relief. This herb has been cultivated in China for medical use for over 1000 years and is mainly grown in Sichuan and Shanxi provinces in China. We have examined the genetic diversity and genetic differentiation in 16 wild populations of *A. carmichaeli* from HengDuan and QingBa Mountains in Southwest China using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. A total of 643 discernible loci were obtained for all populations using 24 primers, and 93.5% of these loci were polymorphic ( $PPL = 93.5\%$ ). POPOGENE analysis indicated that the genetic diversity by Shannon index among populations was 42.4% and Nei's gene diversity coefficient ( $G_{ST}$ ) was 40.0%. AMOVA also found the genetic diversity among population was 25.37%. It was found that the genetic variation was relatively greater within populations compared to that among populations. The estimated gene flow from  $G_{ST}$  ( $Nm$ ) was 0.756. Wind and insect pollination played important roles in the sexual reproduction of wild *A. carmichaeli*, resulting in a high level of out-crossing. Out-crossing and tuber reproduction were the main causes of high genetic diversity and abundant genetic differentiation in *A. carmichaeli* genetic

**基金项目:** 国家科技攻关资助项目(2004BA721A31); 四川省应用基础基金资助项目(03JY029-037); 四川省教育厅重点科技资助项目(2002A035)

**收稿日期:** 2005-01-18; **修订日期:** 2005-09-21

**作者简介:** 侯大斌(1965~), 男, 四川人, 博士, 副教授, 主要从事植物分子生物学及药用植物学研究. E-mail: dbhou@sina.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: dbhou@sina.com

**Foundation item:** The project was supported by National Key Project on Science and Technology of China (No. 2004BA721A31); Sichuan Basic Research Foundation (No. 03JY029-037) and Sichuan Education Office Key Research Foundation Project (No. 2002A035)

**Received date:** 2005-01-18; **Accepted date:** 2005-09-21

**Biography:** HOU Da-Bin, Ph. D., Associate professor, mainly engaged in plant molecule biology and pharmaceutical botany. E-mail: dbhou@sina.com

resources. Calculations of Shannon diversity and Nei genetic differentiation consistently indicated that the Chongqing Youyang and Chongqing Chengkou populations possessed the greatest genetic diversity, where as Sichuan Yanyuan and Shanxi Mianxian populations possessed the lowest genetic diversity. The results of UPGMA and Nei's analysis indicated that the genetic make-up of these wild populations of *A. carmichaeli* showed regional differences. The populations in a region including Beichuan, Anxian and Qingchuan were quite closely related. The high medical quality variety Jiangyou FUZI (*Radix Aconiti Lateralis Preparata*) is from this region and the tuber of this variety is usually used as seeds in cultivation. This research has indicated that there is rich germplasm resource of *A. carmichaeli* and there are large genetic diversities among its wild populations; both are important for selecting *A. carmichaeli* varieties that may have better medical quality.

**Key words:** *Aconitum carmichaeli* Dexb.; genetic diversity; population differentiation; RAPD; wild population

附子是一种常用中药,是四川道地药材之一,为毛茛科乌头属乌头(*Aconitum carmichaeli* Dexb.)的母根,子根则称为附子。附子的主要成分为乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)和中乌头碱(mesaconitine)等,其主要药理作用有抗炎、镇痛、强心、抗心律失常、降血糖、抗癌、毒性以及对心血管系统和对神经系统作用等<sup>[1,2]</sup>。附子的最佳道地产地是四川江油,已有上千年的栽培历史<sup>[3]</sup>,其栽培区主要分布在横断山区和秦巴山区,具体在四川绵阳地区(江油市、安县、北川县)和陕西汉中地区栽培面积较大,四川布拖县在 20 世纪 60~70 年代引种栽培后种植面积不断增加,同时在重庆、湖南、湖北、云南等省也有一定的栽培面积。这些地区的栽培附子品种,其最初来源均是野生乌头。乌头属植物最重要的分布和分化中心是我国西南部的横断山区,据记载有 104 种,37 变种<sup>[4,5]</sup>,并且大多数为该地区特有种。该属中的乌头是我国分布最广的种,自川藏高原东缘起向东至长江中、下游以及珠江流域上游各省区的丘陵地区,从江苏向北经过山东到达辽宁南部均有分布<sup>[3]</sup>。但由于附子的栽培地集中在四川、陕西等省区,这些地区的野生乌头既是极为重要的种质资源,又是栽培用种的一个来源,部分地方还直接入药。因此,研究这个区域的野生乌头种群的遗传多样性,为合理保护和利用附子资源,寻找具有更佳药用品质、产量、抗逆性的种质资源,提高附子的药用品质和产量均具有重要作用。

研究生物遗传多样性的方法很多,包括形态学水平、细胞学(染色体)水平、生理生化水平和目前的分子水平的方法。分子水平遗传多样性分析方法中,其应用最广而最具代表性的方法包括等位酶分析、限制性酶切片段长度多态性分析(RFLP)、随机扩增多态性 DNA 分析(RAPD)<sup>[6]</sup>和扩增片段长度多态性分析(AFLP)<sup>[7]</sup>。对乌头属植物种群遗传分化和遗传多样性研究方面,目前主要是应用等位酶技术的研究较多<sup>[8-14]</sup>,同时,利用 DNA 分子技术研究乌头属种群遗传多样性和系统发育已经开始起步<sup>[10,15-17]</sup>。国内学者张富明等<sup>[14,17]</sup>分别利用等位酶技术和测定 nrDNA 的 ITS 序列的方法对我国横断山地区紫乌头复合体(*Aconitum delavayi* complex)遗传多样性和系统发育进行了分析和研究,认为紫乌头 *A. delavayi* 复合体不是一个单系类群,可能经历了 3 次不同的起源。但是,目前对乌头主要栽培地区野生乌头种群的遗传多样性还缺乏研究,本文采用近年来广泛用于生态种群遗传多样性研究的 RAPD 技术<sup>[10,18-20]</sup>,从 DNA 水平上分析 16 个来自这一区域不同生境的附子野生种群的遗传变异及遗传分化程度,研究这一地区野生乌头种群的遗传多样性,探讨附子野生种群在区域范围内的遗传变异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2002 年 8~12 月分别从四川省、重庆市、陕西省、湖北省收集乌头野生种群 16 个,其中四川种群 10 个,重庆种群 4 个,陕西种群 1 个,湖北种群 1 个,各种群采集地见表 1。每个种群分别收集 50~200 株块根,集中种植。次年 3 月从每个种群新发幼苗植株中随机选择 15 株,每株分别采集幼嫩叶 1~2 片,置 4℃ 备用,分单株提取 DNA。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 DNA 提取、PCR 扩增及电泳检测** DNA 提取、PCR 扩增及电泳检测方法采用作者介绍的方法<sup>[21]</sup>,并以

购自北京赛百盛公司的 200bp DNA Ladder 作 Marker。在百乐公司生产的凝胶成像系统观察,保存图像。

**1.2.2 引物的筛选** 随机引物采用 Operon 公司的引物系列 A、B、D、G、O、Q、R、Z,经预备试验选择扩增产物稳定、重复性好的 24 个引物对所有个体的基因组 DNA 进行扩增,引物名见表 2。

表 1 不同附子野生种群所在生境的自然概况

Table 1 The environmental data for the sixteen wild populations of *Aconitum carmichaeli* Dxb

居群编号 Population code	样地 Sampling site	海拔高度 Altitude(m)	居群编号 Population code	样地 Sampling site	海拔高度 Altitude(m)
Hac02201	四川北川片口	1100	Hac02405	陕西勉县二道河	1300
Hac02204	四川青川大坝	1700	Hac02406	四川盐源卫城	3200
Hac02205	四川峨眉山二坪	600	Hac02407	重庆云阳清水	1000
Hac02206	重庆城口庙坝	1200	Hac02411	四川会东撒者邑	2900
Hac02207	四川安县沸水	1100	Hac02412	重庆酉阳板溪	1100
Hac02208	重庆南川金佛山	800	Hac02414	四川万源大竹河	1300
Hac02211	湖北竹山柳林	1150	Hac02416	四川布拖火烈	2800
Hac02403	四川昭觉哈苿	1800	Hac02417	四川冕宁曹古	2200

表 2 用于检测 16 个附子野生种群遗传分化的引物名称及其检测多态位点数

Table 2 The primers and their polymorphic loci in analyzing genetic variations of sixteen wild populations of *A. carmichaeli* Dxb

引物 Primers	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比率 Proportion of polymorphic loci	引物 Primers	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比率 Proportion of polymorphic loci
OPA08	30	29	0.967	OP005	22	20	0.909
OPA16	31	30	0.968	OP008	27	26	0.963
OPB03	31	28	0.903	OPQ04	23	19	0.826
OPB05	29	27	0.931	OPQ07	18	18	1.000
OPB08	31	30	0.968	OPQ11	23	22	0.957
OPB19	31	30	0.968	OPR03	31	29	0.935
OPD05	27	26	0.963	OPR04	29	27	0.931
OPG04	25	24	0.960	OPR10	27	24	0.889
OPG11	22	20	0.909	OPR19	28	27	0.964
OPG15	28	26	0.929	OPZ09	20	17	0.850
OP001	31	30	0.968	OPZ12	25	23	0.920
OP002	26	25	0.962	OPZ15	28	25	0.893

**1.2.3 数据记录与统计** 在 Quantity One 4.1.1<sup>[22]</sup> 下对电泳图中每一清晰谱带进行标记,以 200bp Ladder 分子量为 Marker,确定所有谱带的分子量。将结果转换为 Excel 表格数据,比较各模板的扩增谱带,将 PCR 扩增中出现的谱带记为 1,不出现的记为 0,录入计算机 Excel 表格中。每单株建立一条扩增谱带记录,建立附子野生种群 RAPD 扩增谱带矩阵。

**1.3 数据分析**

**1.3.1 多态位点比率 P** 扩增的 DNA 片段出现频率小于 0.99 的位点为多态位点:

$$\text{多态位点比率 } P = \text{具有多态的位点数} / \text{检测到的位点数}$$

**1.3.2 Shannon 信息指数** Shannon 信息指数<sup>[23]</sup>是生态学中用于度量物种多样性的最常用方法:

$$H = - \sum P_i \log P_i$$

式中, H 为多样性指数; P<sub>i</sub> 是一条扩增产物存在的频率。H 可计算两种水平的多样性:种群内遗传多样性 H<sub>pop</sub> 和种内多样性 H<sub>sp</sub>。H<sub>pop</sub>/H<sub>sp</sub> 是种群内遗传多样性所占的比例; (H<sub>sp</sub>-H<sub>pop</sub>)/H<sub>sp</sub> 为种群间多样性所占比例。

**1.3.3 用 Nei 指数<sup>[24]</sup>估算种群遗传结构参数**

总基因多样性: 
$$H_{sp} = 1 - \sum (\sum P_i / n_1)^2 / n_2$$

种群内基因多样性:  $H_{pop} = 1 - \sum (\sum P_i^2 / n_1) / n_2$

式中,  $P_i$  为单个位点扩增频率,  $n_1$  为总位点数,  $n_2$  为材料数。

种群间基因多样性:  $D_{ST} = H_{sp} - H_{pop}$

基因分化系数:  $G_{ST} = D_{ST} / H_{sp}$

基因流<sup>[25]</sup>使用种群每代迁移数目( $Nm$ )表示:

$$Nm = (1 - G_{ST}) / 2G_{ST}$$

#### 1.3.4 根据 Nei 和 Li 的公式<sup>[26]</sup> 计算相似系数和遗传距离

RAPD 片断的平均遗传相似度:  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$

式中,  $N_{xy}$  为  $x$ 、 $y$  两个个体或群体共有的扩增带数,  $N_x$ 、 $N_y$  为  $x$ 、 $y$  两个个体或两个群体各自拥有的扩增带数。根据遗传相似度计算遗传距离( $D = 1 - F$ )。

上述多态位点比率  $P$  在 Excel 表格中直接计算;其余各项参数计算时,对前述扩增建立的附子野生种群 RAPD 扩增谱带矩阵,按 POPGENE v1.32 统计软件<sup>[27]</sup> 要求的格式将同一群体的 15 个单株数据放在一起组成一个数列组,共得到 16 个群体数列组,用 POPGENE v1.32 软件计算各项遗传多样性参数。得到遗传相似系数后,以 NTSYSpc v2.1 数据软件<sup>[28]</sup> 进行分析,用非加权成组配对法(UPGMA, Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average)聚类,构建分子聚类图。

1.3.5 分子方差分析(AMOVA)利用 Arlequin ver. 2.000 软件<sup>[29]</sup> 进行 AMOVA 分析,计算种群内、种群间的变异方差分布。

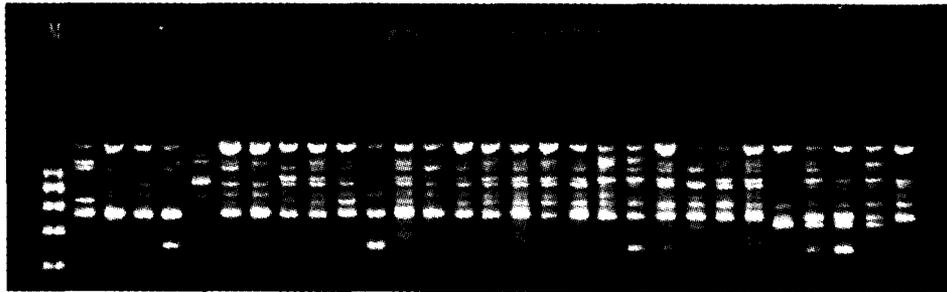


图 1 引物 OPG04 对部分单株总 DNA 的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of the total DNA templates of a part of plants by OPG04

## 2 结果分析

### 2.1 RAPD 扩增带的多态性

24 个引物在 16 个附子野生群体 240 个单株 DNA 模板中共扩增出 643 个 RAPD 位点,其中单态位点 41 个,多态位点 602 个,总的多态位点百分率达 93.5%。各引物检测到的单株 DNA 的 RAPD 位点数在 18~31 个之间(图 1 为引物 OPG04 对部分单株总 DNA 的扩增图谱),平均 26.8 个位点,不同引物扩增的多态带数及多态位点比率差异明显(表 2)。24 个引物扩增的 RAPD 多态位点 17~30 个,平均达 25.1 个,多态位点比率在 0.826~1.00 之间。其中,引物 OPQ07 产生的 RAPD 位点带全部为多态位点。

每个种群 RAPD 总位点数为 207~291 个,平均 253.7 个;多态位点数 166~250 个,平均 212.7 个,占 83.70%(表 3)。各种群的特有位点数 1~11 个,平均 5.2 个,仅占 2.08%,各种群的特有位点数和特有位点百分数均较低。

### 2.2 不同附子野生种群的遗传多样性

2.2.1 Shannon 多样性指数 在 Shannon 信息指数的基础上,用 24 个引物所检测到的 16 个种群表型频率计算各种群遗传多样性及种群遗传结构参数(表 3、表 4)。16 个乌头种群中,重庆酉阳板溪种群 Hac02412 的平

均遗传多样性最高(0.260),其次为重庆城口种群 Hac02206 (0.256),而四川盐源卫城种群 Hac02406 和陕西勉县二道河种群 Hac02405 两个种群的多样性最低(分别为 0.065 和 0.066),明显低于其余种群。多样性排列顺序如下:Hac02412 > Hac02206 > Hac02207 > Hac02407 > Hac02411 > Hac02205 > Hac02211 > Hac02204 > Hac02201 > Hac02208 > Hac02417 > Hac02416 > Hac02403 > Hac02414 > Hac02405 > Hac02406。Shannon 信息指数可把乌头的遗传变异划分为种群内变异和种群间变异,16 个乌头种群内平均遗传多样性为 0.173,种内平均遗传多样性为 0.300,存在于种群内的遗传变异(57.6%)略占优势,还有 42.4%的遗传变异存在于种群间,即附子野生群体间的遗传分化达到 42.4%。

**2.2.2 Nei 基因多样性指数** 由 Nei 指数估算的附子野生 16 个不同种群的基因多样性结果列于表 3、表 4。由该指数估算的基因多样性仍以重庆酉阳板溪 Hac02412 和重庆城口 Hac02206 两个种群为最高(均为 0.166),同样是四川盐源卫城 Hac02406 和陕西勉县二道河 Hac02405 两个种群的多样性最低(分别为 0.045 和 0.044)。各种群的遗传多样性大小顺序为:Hac02412 > Hac02206 > Hac02207 > Hac02407 > Hac02411 > Hac02205 > Hac02211 > Hac02201 > Hac02204 > Hac02208 > Hac02416 > Hac02417 > Hac02403 > Hac02414 > Hac02406 > Hac02405,这与按 Shannon 指数排列的顺序极为相似,但数值略低。根据 Nei 指数计算的附子各野生种群间的遗传分化为 0.400(表 4),即野生附子有 40.0%的遗传变异存在于种群之间,60.0%的变异存在于种群之内。

种群每代迁移数  $N_m$  是表征基因流的一种方法,根据种群间遗传分化系数  $G_{ST}$  计算的  $N_m$  为 0.756 (见表 4),表明种群之间存在一定程度的基因流,但数值不大。

表 3 16 附子野生种群 RAPD 位点数和遗传多样性

Table 3 RAPD locus and genetic diversity for 16 wild populations of *A. carmichaeli* Dexb

种群编号 Population code	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点百分数 Proportion of polymorphic loci(P)	特有位点数 Unique loci	特有位点百分数 Percentage of unique loci(P)	Shannon 信息指数 Shannon's diversity index (H)		Nei 指数 Nei's index(He)	
						H	St. Dev	He	St. Dev
Hac02201	255	214	83.92	4	1.57	0.181	0.253	0.121	0.172
Hac02204	280	239	85.36	4	1.43	0.186	0.237	0.118	0.163
Hac02205	264	223	84.47	11	4.17	0.191	0.246	0.123	0.170
Hac02206	291	250	85.91	6	2.06	0.256	0.264	0.166	0.186
Hac02207	283	242	85.51	8	2.83	0.246	0.258	0.158	0.182
Hac02208	265	224	84.53	3	1.13	0.165	0.237	0.107	0.161
Hac02211	248	207	83.47	5	2.02	0.187	0.249	0.122	0.173
Hac02403	207	166	80.19	8	3.86	0.120	0.218	0.079	0.150
Hac02405	244	203	83.20	3	1.23	0.066	0.171	0.044	0.117
Hac02406	240	199	82.92	1	0.42	0.065	0.178	0.045	0.122
Hac02407	223	182	81.61	5	2.24	0.232	0.249	0.148	0.173
Hac02411	239	198	82.85	9	3.77	0.222	0.252	0.143	0.174
Hac02412	256	215	83.98	3	1.17	0.260	0.254	0.166	0.178
Hac02414	257	216	84.05	3	1.17	0.115	0.210	0.075	0.143
Hac02416	225	184	81.78	5	2.22	0.123	0.231	0.084	0.158
Hac02417	238	197	82.77	2	0.84	0.127	0.219	0.084	0.149
平均 Mean	253.7	212.7	83.71	5.2	2.08	0.173	0.238	0.111	0.170

表 4 由 Shannon 多样性指数和 Nei 多样性指数估算的种群间遗传分化

Table 4 Genetic differentiations among 16 wild populations of *A. carmichaeli* Dexb estimated by Shannon's diversity index and Nei's index

指数 Index	种群内的基因多样性 Within-population gene diversity $H_{POP}$	总的基因多样性 Total gene diversity $H_{SP}$	种群内遗传多样性所占比率 Proportion of genetic diversity within-population $H_{POP}/H_{SP}$	基因分化系数 Genetic differentiation among populations $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp} (G_{ST})$	种群每代迁移数目 transfer number of per generation $N_m$
Shannon	0.173	0.300	0.576	0.424	—
Nei's	0.111	0.185	0.600	0.400	0.756

**2.2.3 AMOVA 分析** AMOVA 分析结果显示附子种群大部分的遗传变异发生在种群内(74.63%),只有 25.37% 的遗传变异发生在种群间(表 5),种群分化不是十分明显( $\Phi_{ST} = 0.2537$ )。AMOVA 分析所得附子野生种群间的遗传分化比 Shannon 指数测出的群体间遗传分化(42.4%)和 Nei 基因分化系数(40.0%)的数值要低许多,但一致表明群体间遗传分化比种群内变异低。

表 5 附子种群的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) for the populations of *A. carmichaeli* Dext

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	百分比 Percentage	P 值 P-value
种群间 Among populations	53.652	0.12737	25.37	< 0.001
种群内 Within populations	150.659	0.37477	74.63	< 0.001

### 2.3 遗传变异与聚类分析

16 个附子野生种群间遗传相似度  $F$  变异范围较大,其范围为 0.5224 ~ 0.8533,平均遗传相似度为 0.6245。相应地遗传距离  $D$  的变化为 0.1467 ~ 0.4776,平均遗传距离为 0.3755。变异最大的是四川昭觉哈昔种群 Hac02403 和四川冕宁曹古种群 Hac02417,变异最小的为四川北川片口种群 Hac02201 和四川青川大坝种群 Hac02204。

根据遗传相似度用 UPGMA 法进行聚类分析,聚类结果如图 2。研究中 16 个种群在遗传相似度 0.65(遗传距离为 0.35)处大致可分为 5 个聚类群:第 1 ~ 4 个聚类群均只包括一个种群,分别是四川昭觉哈昔种群 Hac02403、重庆云阳清水种群 Hac02407、四川会东撒者邑种群 Hac02411 和四川布拖火烈种群 Hac02416,其余种群归入另一个聚类群。如果在遗传相似度 0.725(遗传距离为 0.275)处进行进一步归类,可将 16 个研究种群分为 9 个聚类群,除第一次聚类划分的第 1 ~ 4 聚类群外,湖北竹山柳林 Hac02211、陕西勉县二道河种群 Hac02405 和四川峨眉山二坪种群 Hac02205 分别归入第 5、第 6、第 7 聚类群。第 8 聚类群包括 3 个种群:重庆酉阳板溪种群 Hac02412、四川万源大竹河种群 Hac02414 和四川冕宁曹古种群 Hac02417。第 9 聚类群包括其余 6 个种群:四川盐源卫城种群 Hac02406、重庆南川金佛山种群 Hac02208、重庆城口庙坝种群 Hac02206、四川安县沸水种群 Hac02207、四川青川大坝种群 Hac02204 和四川北川片口种群 Hac02201。

## 3 讨论

### 3.1 乌头种群的遗传分化

基因流和突变是把新的遗传因素带到某一群体仅有的两种方式<sup>[30]</sup>,是群体遗传变异产生的两个原因。一方面,由于地理位置不同,所处的气候、环境条件之间存在差异,导致植物在适应不同的环境中积累和保存的变异(基因突变)产生差异,在生态环境和内在遗传变异的长期作用下产生遗传分化,形成不同的种群。植物种群随地理距离的遗传分化,在形态、等位酶和 DNA 等不同水平上,已被许多研究者发现<sup>[14,31,32]</sup>。另一方面,一些个体从一个群体迁移到另一个群体就会把某些基因带到新的群体,从而产生基因流动<sup>[30]</sup>。基因流增加了群体内部的遗传变化,如果不同群体之间存在高水平的基因流可以防止种群的分化,而低水平的基因流可能造成种群对局部生态环境的适应,进而促使种群间的遗传隔离<sup>[31,33,34]</sup>。

分布在横断山地区和秦巴山地区的四川、重庆、陕西、湖北 4 个省(市)的 16 个乌头种群,地理位置不同,海拔高度不一,生态环境差异较大,各个自然种群间出现了明显的遗传分化。多态位点百分率(93.5%)、各种

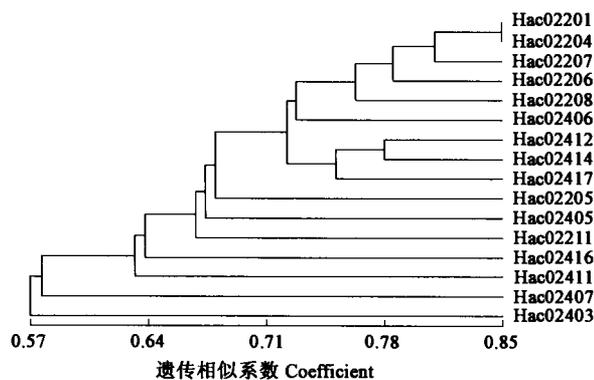


图 2 16 个附子野生种群的 UPGMA 聚类

Fig. 2 UPGMA clustering for 16 wild populations of *A. carmichaeli* Dext. based on RAPD

群间遗传距离(0.3755)和聚类分析的结果均表明,该地区的乌头野生种群之间存在较大的遗传分化,遗传多样性较高,遗传种质资源较丰富;2.08%特异性位点还说明该地区存在一定的特异性资源。这一结果与李千良<sup>[4,5]</sup>认为中国西南部的横断山区是乌头属植物最重要的遗传分布和分化中心的结论是一致的。该地区丰富的遗传分化为开发利用乌头(附子、附子)提供了丰富种质资源,也为筛选鉴定出具有更佳药用价值、更高产量、更强抗逆性的品种提供了可能。

### 3.2 乌头的遗传多样性

多态位点比率、Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数是衡量种群遗传变异的几个主要指标。从这几个指标来看,16个乌头种群内存在较丰富的遗传变异。Shannon 指数表明乌头种群内的遗传多样性比率为 57.6%,种群间的遗传多样性比率为 42.4%;采用 Nei 指数得到的种群内与种群间的遗传分化比率分别是 60.0%和 40.0%;而 AMOVA 分析种群内(74.63%)变异远大于种群间遗传变异(25.37%)。3个结果非常吻合,均说明与种群间遗传多样性相比,种群内的遗传变异占优势。王中仁<sup>[35]</sup>认为,外繁育的植物(如异花授粉的风媒植物)大多数高频率的等位基因都出现在每个居群之内,居群间的相似性较高,差异较少,种群间遗传变异较小;而内繁育的植物(如无融合生殖植物)其等位基因在居群间的差异较多,种群间遗传变异较大。乌头是兼块根无性繁殖和种子有性繁殖两种方式的植物,其种群内与种群间的遗传变异则介于外繁育植物与内繁育植物之间。种群每代迁移数( $Nm$ )0.756也反映了种群间仅存在一定程度的基因流。但种群内 60%的遗传变异说明,自然状态下该地区的乌头种群的有性异交繁殖占有一定优势,造成种群内变异大于种群间变异。乌头在四川西部、陕西南部及湖北西部一带主要生长于海拔 850~2150m 的山地草坡或灌丛中<sup>[3]</sup>,开花 9~10 月份,花期长,有助于风媒异交;同时花紫色,颜色鲜艳,吸引昆虫采蜜,虫媒异交起着极为重要的作用<sup>[8,13,36]</sup>。风媒异交和虫媒异交导致附子野生种群之间存在较高水平的异交繁殖和基因流,从而使群体内变异增加,而群体间相似性提高。与此同时,群体内的这些变异又通过乌头较强的块根无性繁殖保存下来。因此,较高水平异交繁殖的存在和较强的块根繁殖能力,是附子资源遗传多样性高和变异类型丰富的主要原因。

采用 Nei 指数与 Shannon 指数估算的群体间遗传多样性结果一致性说明,利用 RAPD 分析乌头这样兼具有性和无性两种繁殖方式的植物群体时,采用 Nei 指数与 Shannon 指数进行计算均是可行的,但其运用于 AFLP、RAPD 等显性分子标记时需要一定的前提与假设<sup>[37]</sup>。近年来发展的分子方差分析(AMOVA)适用于所有类型的遗传学数据<sup>[37]</sup>,充分考虑了单倍型之间的趋异程度,且可以在不需要假设的情况下直接对显性标记数据进行群体遗传结构分析,因而得到了广泛应用。本计算中,AMOVA 分析所得附子野生群体间的遗传分化(25.37%)比 Shannon 指数测出的群体间遗传分化(42.4%)和 Nei 基因分化系数(40.0%)的数值要低得多。说明方法间确实存在一定差异,在实际应用中应尽可能采用 AMOVA 方法分析。

### 3.3 不同乌头种群的遗传变异

从乌头的多态位点比率、有效等位基因数、Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数来看,所揭示的不同种群遗传多样性的变化趋势极为一致(相关分析表明,Shannon 指数和 Nei 指数间的相关系数为 0.9804( $P < 0.01$ ))。根据 Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数的大小,可将 16 个种群划分为 4 个组。

第 1 组遗传多样性最高,包括 5 个种群:重庆酉阳种群 Hac02412、重庆城口种群 Hac02206、四川安县种群 Hac02207、重庆云阳种群 Hac02407、四川会东种群 Hac02411。

第 2 组遗传多样性较高,包括 5 个种群:四川峨眉山种群 Hac02205、湖北竹山种群 Hac02211、四川青川种群 Hac02204、四川北川种群 Hac02201、重庆南川种群 Hac02208。

第 3 个组遗传多样性中等,包括 4 个种群:四川布拖种群 Hac02416、四川冕宁种群 Hac02417、四川昭觉种群 Hac02403、四川万源种群 Hac02414。

第 4 个组遗传多样性最低,包括 2 个种群:四川盐源种群 Hac02406、陕西勉县种群 Hac02405。从遗传多样性的大小上看没有明显的地理区域特征,说明影响乌头种群遗传分化并非单一因子,而可能是乌头种群生长生态环境中海拔、气候、植被、坡度坡向、人为采挖、当地昆虫种群活动等众多因子综合作用的结果。

### 3.4 群体间的遗传相似度、遗传距离及聚类分析

根据遗传一致度  $F$  对 16 个乌头种群进行了聚类分析。聚类结果显示,四川北川种群 Hac02201 首先与四川青川种群 Hac02204 聚类,接着与四川安县种群 Hac02207 聚类,这 3 个种群在地理位置上相邻,遗传距离也是最近,且均为附子道地栽培地——四川江油的用种供应地。这说明,长期以来形成的道地药材,除气候、土壤、海拔等生态环境外,与一定的种质资源的密切关系,是生态环境与种质资源共同作用的结果<sup>[38,39]</sup>。从聚类图上看,地理位置较近的四川万源种群 Hac02414 和重庆酉阳种群 Hac02412 遗传一致度较高,聚为一类;同样地,湖北竹山种群 Hac02211 与陕西勉县种群 Hac02405 聚类上较为靠近;聚类图上最后聚类的 4 个种群中,除重庆云阳种群 Hac02407 外,均为横断山区的四川布拖种群 Hac02416、四川会东种群 Hac02411 和四川昭觉种群 Hac02403。因此,从总体上看,聚类图反映了一定的地理位置关系,即地理位置较近的种群间在聚类图上聚在一起或位置较近,说明地理位置上靠近的种群间存在一定的遗传关系,一种情况是由相同种群分化而成不同种群,另一种情况是不同种群间存在遗传交换。聚类图上处于最远位置的几个种群主要分布在横断山区的结果同样说明,该地区处于乌头的分布和分化中心,乌头种质资源丰富,分化出了一些遗传差异较大的种质类型。

#### References:

- [ 1 ] Xiao B G. Modern Chinese Materia Medica, Tomus 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2002. 536 ~ 541.
- [ 2 ] Hu X M, Zhang W K, Zhu Q S, et al. Chinese BEN CAO, Tomus 3. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1996. 101 ~ 114.
- [ 3 ] Wang W T. Aconitum L. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 27. Beijing: Science Press, 1979. 264 ~ 268.
- [ 4 ] Li L Q. On distributional features of the genus *Aconitum* in Sino-Himalayan flora. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1988, 26(3): 189 ~ 204.
- [ 5 ] Li L Q. Aconitum. In: Wang W T, et al. Vascular Plants in Hengduan Mountains. Beijing: Science Press, 1993. 447 ~ 474.
- [ 6 ] Williams J, Kubelik A, Livak K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as markers. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 6531 ~ 6535.
- [ 7 ] Vos P K. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res., 1995, 23(21): 4407 ~ 4414.
- [ 8 ] Brink D E. Reproduction and variation in *Aconitum columbianum* (Ranunculaceae), with emphasis on California populations. American Journal of Botany, 1980, 67: 267 ~ 273.
- [ 9 ] Brink D E. Tuberos *Aconitum* (Ranunculaceae) of the continental United States: morphological variation, taxonomy and disjunction. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 1982, 109: 13 ~ 23.
- [ 10 ] Cole C T, and Kuchenreuther M A. Molecular markers reveal little genetic differentiation among *Aconitum noveboracense* and *A. columbianum* (Ranunculaceae) populations. Am. J. Bot., 2001, 88(2): 337 ~ 347.
- [ 11 ] Dixon P M, and B May. Genetic diversity and population structure of a rare plant, northern monkshood (*Aconitum noveboracense*), in ecosystem management: rare species and significant habitats. New York State Museum Bulletin, 1990, 471: 167 ~ 175.
- [ 12 ] Hardin J W. Variation in *Aconitum* of eastern United States. Brittonia, 1964, 16: 80 ~ 94.
- [ 13 ] Utelli A B, Roy b A, Baltisberger M. History can be more important than 'pollination syndrome' in determining the genetic structure of plant population: The case of *Aconitum lycoctomum* (Ranunculaceae). Heredity, 1999, 82: 574 ~ 584.
- [ 14 ] Zhang F M, Kong H Z, Ge S. Allozyme variation and population differentiation of the *Aconitum delavayi* Complex (Ranunculaceae) in the Hegduan Mountains of China. Biochemical Genetics, 2002, 41: 47 ~ 55.
- [ 15 ] Kita Y, Ito M. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae), With special reference to extensive polymorphism in individual plants. Plant Systematics and Evolution, 2000, 225: 1 ~ 13.
- [ 16 ] Utelli A B, Roy b A, Baltisberger M. Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae). Plant Systematics and Evolution, 2000, 224: 195 ~ 212.
- [ 17 ] Zhang F M, Ge S, Chen W L. Phylogeny of the *Aconitum delavayi* complex (Ranunculaceae) based on evidence from Unclear ribosomal ITS sequences. Acta Phytotaxonomica Sinica, 2003, 41(3): 220 ~ 228.
- [ 18 ] Dawson I K, Chalmers K J, Wangh R. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* population from Israel using RAPD markers. Molec. Ecol., 1993, 2: 151 ~ 159.
- [ 19 ] Mimura M, Yasuda K, Yamaguchi H. RAPD variation in wild, weedy and cultivated azuki beans in Asia. Genetic Resources and Crop Evolution, 2000, 47: 603 ~ 610.

- [20] Sheng Y, Zheng W H, PEI K Q, *et al.* Population Genetic Structure of a Dominant Desert Tree, *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae), in the Southeast Gurbantunggut Desert Detected by RAPD and ISSR Markers. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(6): 675 ~ 681.
- [21] Hou D B. Extraction of Genomic DNA and Optimization of RAPD System for *Aconitum carmichaeli* Dext (Ranunculaceae) in Chinese. *J of Southwest University of Sci. and Tech*, 2005, 20(2): 70 ~ 74.
- [22] Bio-Rad Laboratories. Quantity One Version 4.1.1 for Windows. Bio-Rad Laboratories, 1999.
- [23] Chalmers K J, Waug h R, Sprent J I, *et al.* Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 1992, 69: 465 ~ 472.
- [24] Nei M and Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76: 5269 ~ 5273.
- [25] Slatkin M, Barton NH. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 1989, 43: 1349 ~ 1368.
- [26] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583 ~ 590.
- [27] Francis C Y, Yang R C, Boyle T. POPGENE version 1.32 Microsoft Window-based freeware for Population Genetic Analysis, 1999.
- [28] Rohlf F J. NTSYSpc v2.10 Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Software, 2000.
- [29] Schneider S, Roessler D, Excoffier L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.
- [30] Qu R Z, Hou L, Lu H L, *et al.* The gene flow of population genetic structure. *HEREDITAS*, 2004, 26(3): 377 ~ 382.
- [31] Liu H F, Gao Y B, Wang D, *et al.* Genetic differentiation in eight populations of *Leymus chinensis* in Inner Mongolia Steppe. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3): 423 ~ 431.
- [32] Cao G X, Zhong Z C, Xie D T, *et al.* RAPD analysis of *Camellia rosthorniana* populations in different communities in Jinyun Mountain. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8): 1583 ~ 1589.
- [33] Levi D A, Kerster H W. Gene flow in seed plants. *Evol. Biol.*, 1974, 7: 139 ~ 20.
- [34] Slatkin M. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1985, 16: 393 ~ 430.
- [35] Wang Z R. *Plant Allozyme Analysis*. Beijing: Science Press, 1996. 120 ~ 163.
- [36] Yoko F, Kazuo S. The function of each sepal in pollinator behavior and effective pollination in *Aconitum japonicum* var. *montanum*. *Plant Species Biology*, 2001, 16(2): 151 ~ 158.
- [37] Zhang F M, Ge S. Data analysis in population genetics I. Analysis of RAPD data with AMOVA. *Biodiversity Science*, 2002, 10(4): 438 ~ 444.
- [38] Xiao X H, Chen S L, Chen S Y. Discussing on the Studying of Species Biology. *Chinese Medicine*, 1989, 12(7): 37 ~ 39.
- [39] Xiao X H, Chen S L, Chen S Y. Studying on variation within species of *Aconitum carmichaeli* Dext. *Chinese Medicine*, 1991, 14(5): 18 ~ 20.

#### 参考文献:

- [1] 肖培根, 张文康, 朱庆生, 等. 新编中药志(第1卷). 北京: 化学工业出版社, 2002. 536 ~ 541.
- [2] 胡熙明, 张文康, 朱庆生, 等. 中华本草(3). 上海: 上海科技出版社, 1999. 101 ~ 114.
- [3] 王文采. 中国植物志, 27. 北京: 科学出版社, 1979. 264 ~ 268.
- [4] 李良千. 论中国-喜马拉雅植物亚区乌头属植物地理分布特点. *植物分类学报*, 1988, 26(3): 189 ~ 204.
- [5] 李良千. 乌头. 见: 王文采, 等. 横断山维管植物. 北京: 科学出版社, 1993. 447 ~ 474.
- [17] 张富明, 葛颂, 陈文俐. 紫乌头复合体 nrDNA 的 ITS 序列与系统发育分析. *植物分类学报*, 2003, 41(3): 220 ~ 228.
- [21] 侯大斌. 乌头基因组 DNAR 提取与 RAPD 反应体系优化. *西南科技大学学报*, 2005, 20(2): 70 ~ 74.
- [30] 曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流. *遗传*, 2004, 26(3): 377 ~ 382.
- [31] 刘惠芬, 高玉葆, 王丹, 等. 内蒙古典型草原羊草种群遗传分化的 RAPD 分析. *生态学报*, 2004, 24(3): 423 ~ 431.
- [32] 操国兴, 钟章成, 谢德体, 等. 缙云山川鄂连蕊茶在不同群落类型中的 RAPD 分析. *生态学报*, 2003, 23(8): 1583 ~ 1589.
- [35] 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996. 120 ~ 163.
- [37] 张富民, 葛颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD 数据的 AMOVA 分析. *生物多样性*, 2002, 10(4): 438 ~ 444.
- [38] 肖小河, 陈士林, 陈善壖. 试论中药物种生物学研究. *中药材*, 1989, 12(7): 37 ~ 39.
- [39] 肖小河, 陈士林, 陈善壖. 乌头种内变异的初步研究. *中药材*, 1991, 14(5): 18 ~ 20.