

耧斗菜野生资源的 AFLP 遗传多样性分析

杜 艳¹, 王 娟², 陈 冲², 段 莎莎³

(1. 山西运城农业职业技术学院 农林与工程系, 山西 运城 044000; 2. 山西省农业科学院 果树研究所, 山西 太原 030031;
3. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

摘 要:以包括 22 份野生资源的 5 个耧斗菜物种为试材, 采用 AFLP 分子标记方法, 分析了中国耧斗菜野生资源的遗传变异和遗传多样性, 为系统鉴定耧斗菜野生资源奠定基础。结果表明: 10 对引物共扩增出 293 个多态性位点, 多态性位点比率为 62.5%。Shannon 多样性和 H_e 值分析结果表明, 5 个物种的遗传多样性大小顺序为无距耧斗菜>耧斗菜>尖萼耧斗菜>直距耧斗菜>华北耧斗菜。遗传距离分析结果表明, 耧斗菜与尖萼耧斗菜遗传距离最小, 尖萼耧斗菜与直距耧斗菜遗传距离最大。

关键词:耧斗菜; AFLP; 遗传多样性

中图分类号:S 649.602 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)05-0085-04

耧斗菜(*Aquilegia viridiflora*)系毛茛科耧斗菜属(*Aquilegia*)植物, 主要分布于北半球的温带区域。目前全球发现的耧斗菜属有 76 个种, 其中 22 个种分布于北美洲, 23 个种分布于亚洲, 21 个种分布于欧洲, 其余种零星分布于其他洲^[1]。中国有 13 种耧斗菜属植物, 其中 4 个为特异地地方种^[2]。耧斗菜属物种生长环境极广, 从沙漠温泉到高山草甸、裸露岩石及温带森林, 从海平面到阿尔卑斯山区、洛基山区及阿尔卑斯山区均有分布。各物种间分布范围差异显著, 如 *A. borodinii*、*A. laramiensis* 及 *A. barbaricina* 仅分布在极其狭窄的地域, 而 *A. sibirica*、*A. vulgaris*、*A. canadensis* 和 *A. formosa* 在整个大陆均有分布^[3-4]。耧斗菜还存在显著的形态学差异, 其中花距

长短及性状、花瓣及花萼颜色、柱头外露程度及花冠大小极为明显, 同时其叶片数目和大小、叶形、株高等营养器官性状也是物种识别的标准^[5]。此外, 耧斗菜为虫媒花, 其传粉媒介主要有苍蝇、大黄蜂、天蛾及蜂鸟等。因生理、形态和传粉方面的多样性, 以及种间杂交的高亲和性, 耧斗菜的系统发生学地位及进化研究热度仅次于双子叶模式植物拟南芥^[6-7]。目前耧斗菜种间的系统发生关系及遗传多样性研究仅限于欧洲及北美洲, 国内耧斗菜种间亲缘关系和遗传多样性系统研究尚鲜见报道^[8]。分子标记是研究植物亲缘关系及遗传多样性的重要工具。该研究利用 AFLP 标记技术对 22 份耧斗菜进行遗传变异及遗传分化程度分析, 以期对系统评价中国耧斗菜遗传多样性提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 22 份耧斗菜材料具体信息见表 1。经表型鉴定, 供试样本分为 5 个耧斗菜属物种, 群体材料

第一作者简介:杜艳(1980-), 女, 山西运城人, 硕士, 讲师, 现主要从事花卉植物栽培与应用等研究工作。E-mail: xudu20061@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31400131, 81603223)。

收稿日期:2016-12-12

Abstract: Twenty *Lentiniula edodes* strains mainly cultivated in Liaoning were used as test materials, the genetic diversity and cluster analysis were studied by ISSR technique and NTSYS-PCR software, respectively. The results showed that 9 ISSR primers were selected from 30 random primers and 72 clear bands were identified by the ISSR-PCR amplification including 83.3% polymorphic bands. Clustering analysis found that 20 strains were gathered into four groups when the dissimilarity coefficient was 0.36.

Keywords: *Lentiniula edodes*; ISSR-PCR; clustering analysis

表 1 22 份楼斗菜资源来源及自然概况

Table 1 Origins and natural conditions of 22 wild resources of *Aquilegia*

编号 Code	采集地 Collecting place	材料 Material	拉丁名 Latin name	海拔 Altitude/m
Da4	甘肃景泰	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	1 750
Da5	甘肃宁夏	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	2 200
Da2	贵州毕节	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	2 750
Da3	贵州六盘水	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	2 000
Da1	贵州威宁	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	2 400
Da6	湖北巴东	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	2 300
Da7	湖北神农架	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	2 800
Da8	四川康定	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	3 000
Da9	四川天全	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	1 800
Da10	西藏理塘	无距楼斗菜	<i>A. ecalcarata</i>	3 300
Da11	四川康定	直距楼斗菜	<i>A. rockii</i>	3 200
Da12	西藏理塘	直距楼斗菜	<i>A. rockii</i>	3 300
Da22	河北丰宁	华北楼斗菜	<i>A. yabeana</i>	500
Da21	黑龙江塔河	华北楼斗菜	<i>A. yabeana</i>	500
Da19	河北丰宁	尖萼楼斗菜	<i>A. oxysepala</i>	500
Da18	黑龙江加格达奇	尖萼楼斗菜	<i>A. oxysepala</i>	450
Da20	黑龙江塔河	尖萼楼斗菜	<i>A. oxysepala</i>	500
Da13	甘肃景泰	楼斗菜	<i>A. viridiflora</i>	1 500
Da14	河北丰宁	楼斗菜	<i>A. viridiflora</i>	800
Da16	黑龙江加格达奇	楼斗菜	<i>A. viridiflora</i>	400
Da17	黑龙江塔河	楼斗菜	<i>A. viridiflora</i>	350
Da15	黑龙江新林	楼斗菜	<i>A. viridiflora</i>	400

以分株繁殖及种子繁殖方式保存。

1.2 试验方法

植物基因组 DNA 提取后,稀释为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度后备用。模板 DNA 的制备为每 250 ng 基因组 DNA 加 5 U *Mse* I 及 *Eco*RI 限制性内切酶消化。其后,在被消化 DNA 片段上连接 $5 \times 10^{-9} \text{ mmol EcoRI}$ 接头和 $5 \times 10^{-8} \text{ mmol Mse I}$ 接头。

取 $2 \mu\text{L}$ 的酶切-连接产物作为模板 DNA 进行预扩增。预扩增在 $20 \mu\text{L}$ 的反应体系中进行。预扩增体系除 DNA 模板外,还包括 $0.8 \mu\text{L EcoRI-A}$ 引物, $0.8 \mu\text{L Mse I} + \text{C}$ 引物, $0.4 \mu\text{L dNTPs}$ ($1 \times 10^{-7} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.4 U Taq DNA 聚合酶,及 $2 \mu\text{L}$ $10 \times \text{PCR}(+\text{Mg}^{2+})$ 缓冲液。将预扩增产物用 TE 稀释 50 倍后作为 AFLP 模板 DNA 进行选择扩增。选择性扩增产物通过 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后。各样本间 DNA 条带差异采用‘0’‘1’标记,其中‘0’为条带缺失,‘1’为条带存在。该研究共采用 10 对选择性引物,引物对分别为 F1B1、F1B2、F1B3、F2B1、F2B2、F1B3、F3B1、F3B2、F3B3 及 F4B1(表 2)。

表 2 参试引物编号及序列

Table 2 Sequence of AFLP primers

引物 Primer	编号 Code	序列 Sequence
EcoRAAC	F1	GACTGCGTACCAATTCAAC
EcoRACA	F2	GACTGCGTACCAATTCAACA
EcoRACT	F3	GACTGCGTACCAATTCACCT
EcoRAGG	F4	GACTGCGTACCAATTCAGG
MseICTC	B1	GATGAGTCCTGAGTAACTC
MseICTG	B2	GATGAGTCCTGAGTAACTG
MseICTT	B3	GATGAGTCCTGAGTAACTT

1.3 数据分析

物种内及物种间群体遗传多样性参数采用 POPGENE 1.32 软件运行^[8]。考查参数包括:多态位点比率 *P*、Shannon 信息指数 *H*, *He* 值,遗传距离 *D*,基因分化系数 *G_{ST}*。物种内及物种间分子方差分析(AMOVA)采用 Arlequin 3.0 软件分析^[9]。

2 结果与分析

10 对 AFLP 引物共得到 469 个位点,其中 293 个(62.5%)位点表现出多态性。各引物对多态性位点介于 13~47 个,其中 F3B2 引物对扩增多态性位点数最高,达到 47 个。各引物对多态性位点比率为 43.6%~88.2%,F3B3 多态性位点比率最高,为 88.2%。各引物对 Shannon 信息指数为 0.307~0.648,平均为 0.507。引物 F1B2 遗传多样性 *He* 值最高,为 0.457;F1B1 最低,为 0.213;各引物对 *He* 值平均为 0.350。引物 F1B3 基因分化系数最低,为 0.235;F2B2 最高,为 0.585(表 3)。

利用 10 对 AFLP 引物扩增结果对楼斗菜的遗传多样性评估结果表明,5 个楼斗菜物种位点多态性比率平均为 47.4%;华北楼斗菜位点多态性比率最低,为 39.7%;无距楼斗菜位点多态性比率最高,为 53.3%。各物种 Shannon 多样性指数平均为 0.306, *He* 值平均为 0.205。华北楼斗菜遗传多样性最低,其 Shannon 多样性指数为 0.224, *He* 值为 0.147。无距楼斗菜遗传多样性最高,Shannon 多样性指数为 0.337, *He* 值为 0.226。Shannon 多样性指数结果表明,各物种的遗传多样性大小顺序为无距楼斗菜>楼斗菜>尖萼楼斗菜>直距楼斗菜>华北楼斗菜。*He* 值与 Shannon 多样性指数结果基本一致(表 4)。5 个楼斗菜物种间遗传距离差异较大,其中楼斗菜与尖萼楼斗菜遗传距离最小,仅为 0.038,其遗传相似度为 0.963。尖萼楼斗菜与直距楼斗菜遗传距离最大,为 0.142,其遗传相似度为 0.868(表 5)。

表 3 10 对 AFLP 引物的扩增结果

Table 3 Result of amplifying by 10 pairs of AFLP primers

引物 Primer	多态性位点数 No. of polymorphic alleles	多态性比率 Ratio of polymorphic/%	遗传多样性 H_e 值 Genetic diversity H_e	Shannon 信息指数 Shannon information index	基因分化系数 Gene differentiation coefficient
F1B1	30	44.1	0.213	0.307	0.338
F1B2	31	70.6	0.457	0.648	0.289
F1B3	35	86.5	0.452	0.642	0.235
F2B1	32	86.1	0.415	0.600	0.438
F2B2	25	85.7	0.389	0.570	0.585
F2B3	20	76.0	0.322	0.498	0.349
F3B1	26	86.2	0.333	0.503	0.347
F3B2	47	45.2	0.221	0.316	0.254
F3B3	13	88.2	0.427	0.615	0.300
F4B1	34	43.6	0.227	0.323	0.276
汇总 Total	293	62.5	0.350	0.507	0.372

表 4 5 个耧斗菜物种的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of 5 *Aquilegia* species

物种 Species	多态性比率 Ratio of polymorphic/%	遗传多样性 H_e 值 Genetic diversity H_e	Shannon 信息指数 Shannon information index
无距耧斗菜 <i>A. ecalcarata</i>	53.3	0.226	0.337
直距耧斗菜 <i>A. rockii</i>	45.5	0.211	0.313
耧斗菜 <i>A. viridiflora</i>	51.3	0.224	0.336
尖萼耧斗菜 <i>A. oxysepala</i>	47.2	0.214	0.318
华北耧斗菜 <i>A. yabeana</i>	39.7	0.147	0.224
平均 Average	47.4	0.205	0.306

表 5 5 个耧斗菜物种的遗传一致性及遗传距离

Table 5 Genetic identity and genetic distance among 5 *Aquilegia* species

物种 Species	无距耧斗菜 <i>A. ecalcarata</i>	直距耧斗菜 <i>A. rockii</i>	耧斗菜 <i>A. viridiflora</i>	尖萼耧斗菜 <i>A. oxysepala</i>	华北耧斗菜 <i>A. yabeana</i>
无距耧斗菜 <i>A. ecalcarata</i>	—	0.946	0.952	0.908	0.917
直距耧斗菜 <i>A. rockii</i>	0.056	—	0.904	0.868	0.873
耧斗菜 <i>A. viridiflora</i>	0.049	0.101	—	0.963	0.950
尖萼耧斗菜 <i>A. oxysepala</i>	0.097	0.142	0.038	—	0.935
华北耧斗菜 <i>A. yabeana</i>	0.087	0.136	0.051	0.067	—

注:左下角为遗传距离,右上角为遗传一致性。

Note: Genetic identity and genetic distance are located above and under the line.

3 讨论

目前对耧斗菜物种间生殖隔离形成的主要因素有地理环境因素及传粉媒介的特异性。对加利福尼亚内华达山脉的 *A. formosa* 和 *A. pubescens* 2 个耧斗菜物种研究发现,造成这 2 个物种基因漂流障碍主要是环境特异性,其次所需授粉媒介的特异性也有影响^[10]。但对欧洲耧斗菜物种 *A. vulgaris*、*A. pyrenaica*、*A. nigricans*、*A. vulgaris* 及 *A. viscosa* 研究发现,欧洲耧斗菜物种开花习性及其相近,按常理推论这将导致欧洲耧斗菜种群多样性远低于北美洲种群,而欧洲耧斗菜物种数量与北美洲物种数量相当,因此各大洲内耧斗菜种群辐射进化机制并不一致^[11-13]。该研究中搜集的 5 个耧斗菜物种生长区域都有重叠分布,各物种间花期构造有显著差异,因此

较环境对中国耧斗菜物种形成的影响而言,开花习性及授粉媒介更重要。

该研究中无距耧斗菜遗传多样性最高,其多态性位点比率、Shannon 多样性指数及 H_e 值均为最高。在资源普查中也发现无距耧斗菜地域分布最广,其营养器官及花器构造多样性也极为丰富,这与前人研究结果基本一致^[14]。目前对耧斗菜的种系亲缘关系研究多针对 ITS 基序及叶绿体 DNA 基序分析^[14-16]。因为较低的多态性,ITS 基序分析结果未能完全揭示耧斗菜种间亲缘关系^[16-17]。该研究利用 AFLP 标记对 5 个耧斗菜资源评估结果表明,耧斗菜存在极高的遗传多样性,因此 AFLP 标记是评估耧斗菜辐射进化过程的有效工具。该研究结果表明,5 个耧斗菜亲缘关系较近,这与朱蕊蕊等^[18-20]研究结

果基本一致。此外,该研究的采样范围和样品量远大于前人研究,因此研究结果对研究亚洲耧斗菜物种进化形成具有重要意义。

参考文献

- [1] NOLD R. Columbines; *Aquilegia*, *Paraquilegia* and semi-*Aquilegia* [M]. Portland: Timber Press, 2003.
- [2] FU D Z, ROBINSON O R. *Aquilegia* [M] // WU Z Y, RAVEN P (ed). Flora of China. Beijing: Science Press, 2001.
- [3] WHITTALL J B, HODGES S A. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers [J]. Nature, 2007, 447: 706-710.
- [4] TANG L L, YU Q, SUN J F, et al. Floral traits and isolation of three sympatric *Aquilegia* species in the Qinling Mountains, China [J]. Plant Syst Evol, 2007, 267: 121-128.
- [5] BASTIDA J M, ALCÁNTARA J M, REY P J, et al. Extended phylogeny of *Aquilegia*: the biogeographical and ecological patterns of two simultaneous but contrasting radiations [J]. Plant Syst Evol, 2010, 284: 171-185.
- [6] KRAMER E M. *Aquilegia*: A new model for plant development, ecology, and evolution [J]. Annu Rev Plant Biol, 2009, 60: 261-277.
- [7] KRAMER E M, HODGES S A. *Aquilegia* as a model system for the evolution and ecology of petals [J]. Philos Trans Roy Soc Lond Ser B, 2010, 365: 477-490.
- [8] YEH F C, YANG R C, BOYLE T, et al. The user-friendly shareware for population genetic analysis [M]. Canada: University of Alberta Press, 1997.
- [9] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3. 0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evol Bioinform, 2005(1): 47-50.
- [10] ITAGAKI T, KIMURA M K, MAKI M. Differential self-fertilization rates in response to variation in floral traits within inflorescences of *Aquilegia buergeriana* var. *oxysepala* (Ranunculaceae) [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2016, 181(2): 294-304.
- [11] MEDRANO M, CASTELLANOS M C, HERRERA C M. Comparative floral and vegetative differentiation between two European *Aquilegia* taxa along a narrow contact zone [J]. Plant Syst Evol, 2007, 262: 209-224.
- [12] GAFTA D, MUNCACIU S, CSERGO A M. Morphometric variation in a rare endemic *Aquilegia* (Ranunculaceae) in the Carpathians [J]. Plant Biosyst, 2006, 140: 297-306.
- [13] LAVERGNE S, DEBUSSCHE M, THOMPSON J D. Limitations on reproductive success in endemic *Aquilegia viscosa* (Ranunculaceae) relative to its widespread congener *Aquilegia vulgaris*: the interplay of herbivory and pollination [J]. Oecologia, 2005, 142: 212-220.
- [14] ITAGAKI T, KIMURA M K, LIAN C, et al. Development of microsatellite markers for *Aquilegia buergeriana* var. *oxysepala* (Ranunculaceae), a vulnerable Japanese herb [J]. Plant Species Biology, 2015, 30: 159-162.
- [15] ERST A S, VAULIN O V. Phylogenetic relationships among North Asian species of the genus *Aquilegia* based on molecular markers [J]. Russian Journal of Genetics (Applied Research), 2014, 4(1): 35-42.
- [16] FIOR S, LI M, OXELMAN B, et al. Spatiotemporal reconstruction of the *Aquilegia* rapid radiation through next generation sequencing of rapidly evolving cpDNA regions [J]. New Phytol, 2013, 198(2): 579-592.
- [17] SHAW J, LICKY E B, SCHILLING E E, et al. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III [J]. Am J Bot, 2007, 94(3): 275-288.
- [18] 朱蕊蕊, 高亦珂, 张启翔. 部分耧斗菜种的 AFLP 遗传多样性分析 [C]. First International Symposium on Biomedicine and Engineering, 2011: 179-182.
- [19] 朱蕊蕊, 高亦珂, 张启翔. 耧斗菜属 AFLP 体系的建立与优化 [J]. 华北农学报, 2010, 25(suppl): 38-41.
- [20] 朱蕊蕊, 高亦珂, 张启翔. 耧斗菜属的物种进化与遗传学 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 784-789.

Genetic Diversity of Wild Resources of *Aquilegia* Based on AFLP Analysis

DU Yan¹, WANG Juan², CHEN Chong², DUAN Shasha³

(1. Department of A&F Engineering, Shanxi Yuncheng Vocational and Technical College of Agricultural, Yuncheng, Shanxi 044000; 2. Pomology Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031; 3. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010)

Abstract: In order to systematically identify genetic diversity of wild resources of *Aquilegia* in China, five species of *Aquilegia* including 22 wild resources were investigated by AFLP markers method. The results showed that a total of 293 polymorphic fragments were produced by 10 AFLP primers, which accounted for 62.5% of the total fragments. The genetic diversity by Shannon index and *He* index indicated that the highest genetic diversity species was *A. ecalcarata*, and followed by gradual decrease as *A. viridiflora*, *A. oxysepala*, *A. rockii*, and *A. yabeana*. The genetic distance analysis indicated that *A. oxysepala* and *A. viridiflora* showed the shortest genetic distance, whereas *A. oxysepala* and *A. rockii* showed the longest distance.

Keywords: *Aquilegia*; AFLP; genetic diversity