

基于 ISSR 分子标记的野生桃儿七遗传多样性研究

沈 奇^{1,2}, 张 盾², 臧春鑫¹, 朱文娟¹, 齐 月¹, 任梦云², 关 潇¹, 张银东²

(¹ 中国环境科学研究院生物多样性研究中心实验室, 北京 100012; ² 海南大学热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 通过对甘肃南部青藏高原边缘区道地性药材桃儿七遗传多样性研究, 为野生桃儿七资源的保护提供依据。采用 ISSR 分子标记技术, 对 13 个野生桃儿七居群 153 份 DNA 进行 PCR 扩增, 对其扩增条带进行遗传多样性分析, 在所得遗传距离的基础上进行 UPGMA 聚类分析和 Mantel 检验地理距离, 对野生桃儿七居群间遗传多样性差异进行分析。11 条 ISSR 引物共检测到 155 个条带, 每条引物 10~17 个, 平均 14.1 个, 共 1320 个多态性位点; 居群平均多态性位点百分比 (PPL) 65.50%; Nei's 遗传多样性指数 (H) 为 0.2101, Shannon's 信息指数 (I) 为 0.3191; 遗传距离变化范围 0.0316~0.3769; Mantel 检验 $P=0.4220$ 。甘肃南部青藏高原边缘区 13 个野生桃儿七居群间具有较高的遗传多样性, 种群内的基因流十分丰富, 居群内的遗传分化明显比居群之间的分化要大, 各居群间遗传距离与地理距离无相关关系。

关键词: 桃儿七; ISSR 分子标记; 遗传多样性; 聚类分析; 地理距离

Genetic Diversity Analysis of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying Germplasm Accessions Using ISSR Markers

SHEN Qi^{1,2}, ZHANG Dun², ZANG Chun-xin¹, ZHU Wen-juan¹, QI Yue¹, REN Meng-yun²,
GUAN Xiao¹, ZHANG Yin-dong²

(¹ Biodiversity Research Center, Chinese Research Academy of Environmental Science, Beijing 100012;

² College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: In order to provide information for the domestication and protection of wild *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying that serves as genuine medicinal material, we analyzed the genetic diversity by using ISSR markers in thirteen populations with 153 DNA samples, which were collected from the southern part of Gansu province. By cluster analysis using the un-weighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) and Mantel test with geographic distance, we constructed a dendrogram out based on the molecular data. In total, 155 alleles and 1320 polymorphic loci were amplified using these 11 ISSR primers. Each marker produced 10–17 alleles, with an average of 14.1. The average percentage of polymorphic loci (PPL) was 65.50%. The Nei's gene diversity (H) and Shannon's information index (I) were 0.2101 and 0.3191, respectively. The genetic distance range from 0.0316 to 0.3769. The genetic diversity among 13 populations of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying was relatively abundant and the gene flow within the populations were frequently observed. The genetic differentiation within the population was significantly higher than that between populations, and no correlation was observed between the genetic diversity and the distances among populations.

Key words: *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying; ISSR molecular markers; genetic diversity; cluster analysis; geographic distance

收稿日期: 2018-05-04 修回日期: 2018-06-21 网络出版日期: 2018-09-08

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.s.20180906.1054.001.html>

第一作者研究方向为植物细胞与分子生物学, E-mail: 504138870@qq.com

通信作者: 关潇, 研究方向为遗传资源与生物安全, E-mail: cynthia815@126.com

张银东, 研究方向为分子生物学, E-mail: 23300558@163.com

基金项目: 生物多样性保护专项 (2096001006)

Foundation project: Biodiversity conservation program(2096001006)

桃儿七 (*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying) 为小檗科 (Berberidaceae) 桃儿七属 (*Sinopodophyllum* T.S.Ying) 多年生草本植物, 又名西藏鬼白; 四川西部藏区居民称之为八月瓜, 是一种较常用藏药, 为中国珍稀的药用植物; 由于人为无节制采挖等因素, 桃儿七生境破坏严重, 种群数量急剧减少, 并且种群更新困难^[1], 种群严重濒危, 被列入《中国生物多样性红色名录》《中国植物红皮书》和《中国珍稀濒危植物名录》, 是国家二级保护植物^[2-3]。桃儿七分布范围较广、生态适应幅度大, 喜马拉雅及邻近地区都有分布, 生长海拔高, 适应寒冷干燥以及凉爽湿润等生态环境, 耐受性较强^[4-5]。桃儿七的药用价值高, 研究发现桃儿七富含抗癌物质, 其根、茎富含抗癌药物合成原料鬼臼毒素的量高于同类植物^[6], 其果实中的黄酮素对乳腺癌细胞有抵抗能力^[7]; 被《中国药典 1977 年版》收录, 同时其果实作为中药小叶莲被《中国药典》《西藏常用中草药》和《陕西中草药》收录^[8]。目前, 国内外对其研究主要集中在生物学特性及人工栽培技术, 化学成分及药理作用与应用, 遗传多样性与野生资源保护研究相对较少。

表 1 桃儿七居群采样点地理特征

Table 1 Geographic features of the sample collection sites of the wild *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying

编号 Code	来源 Source	纬度 (N) Latitude	经度 (E) Longitude	海拔 (m) Height	样本数 Numbers	样本编号 No. of sample
1	甘肃临潭贡巴寺	34° 58.629'	102° 53.888'	2881	18	1~18
2	甘肃碌曲县则岔石林	34° 29.489'	102° 41.137'	3014	13	19~31
3	甘肃岷县麻子川乡瓦沟沟	34° 17.409'	104° 05.424'	2481	10	32~41
4	甘肃卓尼县光盖山	34° 20.713'	102° 58.064'	3486	12	42~53
5	甘肃卓尼县大峪沟	34° 23.287'	103° 33.852'	2783	11	54~64
6	甘肃甘南州碌曲县西仓乡神山山顶	34° 55.591'	102° 53.601'	3274	11	65~75
7	甘肃榆中县兴隆山西山	35° 47.026'	104° 03.112'	2268	4	76~79
8	甘肃迭部县扎尕那乡	34° 09.120'	102° 47.381'	2505	11	80~90
9	甘肃迭部县益哇乡	34° 13.442'	103° 11.750'	2835	10	91~100
10	甘肃和政县铁沟山庄驴耳朵	35° 12.886'	103° 12.782'	2977	16	101~116
11	甘肃康乐县莲花山	34° 54.989'	103° 43.810'	2870	13	117~129
12	甘肃永登县竹林沟	34° 55.062'	103° 43.653'	2409	13	130~142
13	青海北山互助国家森林公园扎隆沟	36° 49.294'	102° 31.434'	2460	11	143~153

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取与质量检测 运用改良的 CTAB 法结合试剂盒法, 利用全式金植物 DNA 提取试剂盒与 CTAB 法相结合提取植物样品 DNA, 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳检测 DNA 质量, DNA 浓度与纯度则是通过分光光度计进行测定, DNA 模

ISSR (inter-simple sequence repeat) 即简单重复序列间扩增, 运用 ISSR 分子标记技术得到的结果具有很高的稳定性与重复性。实验操作较为简单, 所需 DNA 模板量较少, 且不需要测序, 实验成本低廉^[9-13]。该技术可鉴定药用植物, 研究近缘物种的进化关系, 建立中药质量标准, 以及辅助育种等多个领域^[14]。本研究采用 ISSR 分子标记技术对桃儿七分布区域甘肃和青海野生资源进行了遗传多样性分析, 旨在从分子水平上揭示不同地区野生桃儿七的遗传多样性水平, 对野生桃儿七资源提供保护依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2015 年 9 月, 根据选取的青藏高原边缘区域, 如甘肃、青海等地各样点, 采集野生桃儿七鲜嫩叶片, 采下后立即放置在存有变色硅胶的密封袋中保存, 各采样点集大于 10 个样本, 居群个体间距不小于 25 m。记录各个样点的地理信息, 包括经纬度、海拔 (表 1)。共有 13 个居群, 但甘肃榆中县兴隆山西山居群样本数仅为 4 个, 因其处于青藏高原区外, 具有地理代表性, 故单独列为 7 号居群作为参考。

板置于 -80 °C 冰箱保存待用。在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测 DNA 模板; Marker 为 2K plus II DNA Ladder marker (北京全式金生物技术有限公司), 电泳完成后在紫外光下成像观察并拍照。

1.2.2 单因素结合正交设计建立 PCR 体系 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计, 对影响 ISSR-PCR 的主要

因素,包括 DNA 浓度、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、引物、 Mg^{2+} 浓度进行 5 因素 4 水平的筛选分析,共进行 16 个处理,每个处理 3 次重复。反应体系中总体积为 25 μ L,包括 10 \times buffer 2.5 μ L,不足体积用 ddH₂O 补足至 25 μ L,以此来筛选出各因素的最佳水平,最后建立的桃儿七 ISSR-PCR 反应的最佳体系为 DNA 浓度 40 ng/ μ L, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTPs 0.20 mmol/L, Taq 酶 0.5 U/25 μ L,引物 0.4 μ mol/L^[15]。

1.2.3 引物筛选、ISSR-PCR 反应与扩增产物检测
根据建立的桃儿七 ISSR-PCR 反应的最佳体系,随机选择了某个居群的桃儿七 DNA 模板,从 100 条 ISSR 通用引物中筛选出适合该物种的引物,在 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司, C1000 Touch Thermal Cycler)上设置温度梯度并筛选出各引物的最适退火温度,在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳(DDY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂)分离 PCR 反应产物; Marker 使用 2K plus II DNA Ladder marker(北京全式金生物技术有限公司)。电泳完成后在紫外光下成像观察并拍照。试验于中国环境科学研究院生物多样性研究中心实验室进行。

1.2.4 数据统计分析 在凝胶成像系统下得到 ISSR-PCR 扩增产物的电泳结果,根据条带迁移的位置及清晰有无进行统计,将在相同迁移位置上,稳定出现的条带记为“1”,无带或难分辨的弱带记为

“0”,记录“0, 1”原始矩阵数据。

运用 POPGENE 32 软件^[16],对供试野生桃儿七居群 ISSR 结果进行统计分析,得到多态位点百分率(*PPL*)、观测等位基因数(*Na*)、有效等位基因数(*Ne*)、Nei's 遗传多样性指数(*H*)、Shannon 信息指数(*I*)和 Nei's 遗传距离等参数。利用 NTSYS 软件^[17]根据 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析。利用其中的 SIMQUAL 程序计算所有样本间的遗传相似系数,最后通过 Tree-plot 程序生成聚类图。为了探讨地理距离与遗传距离的相关性,根据 Arcmap 统计的各桃儿七居群的位置信息,用 R 语言 Vegan 包^[18]进行 Mantel 检验。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增多态性分析

用桃儿七全基因组 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳检测,同时使用分光光度计进行 DNA 分子质量检测,OD 值及 DNA 明亮程度均满足 ISSR-PCR 扩增要求。

用筛选出的 11 条引物对 153 份桃儿七 DNA 样本进行扩增,共得到 155 条清晰条带,均具有多态性,平均多态性位点百分率为 99.4%,每个引物扩增出的 DNA 条带数为 10~17 条,平均为 14.1 条(表 2),这些 DNA 片段大小主要集中在 1000~5000 bp

表 2 ISSR 引物序列及扩增条带数

Table 2 The sequences of ISSR primers and the outcome of PCR amplification

引物 Primes	序列 Sequence	理论退火 温度(°C) Academic Tm	退火温度(°C) Annealing temperature	扩增总带数 Total bands number	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性条 带百分比 (%) <i>PPB</i>
UBC807	(AGAG) ₄ T	54.6	53.5	14	14	100
UBC823	(TC) ₈ C	54.6	54.5	16	16	100
UBC824	(TC) ₈ G	54.6	53.5	13	13	100
UBC825	(AC) ₈ T	54.6	53.5	13	13	100
UBC835	(AG) ₈ YC	51.5	55.3	14	14	100
UBC836	(AG) ₈ YG	61.8	60.8	16	15	93.7
UBC840	(GA) ₈ YT	52.6	50.4	14	14	100
UBC844	(CT) ₈ RC	53.0	51.0	10	10	100
UBC873	(GACA) ₄	53.0	53.9	17	17	100
UBC895	(AG) ₂ TTGGTAGCTCTTGATC			14	14	100
UBC900	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTAA (CA) ₂	52.6	54.6	14	14	100
合计 Total	—	—	—	155	154	100
平均数 Mean	—	—	—	14.1	14	99.4

PPB: The percentage of polymorphic band

之间。其中针对桃儿七扩增条带数最多引物的是 UBC873, 达 17 条, 扩增条带数最少的引物是 UBC844, 为 10 条。几乎所有引物多态性百分比均为 100%, 仅仅一条引物 UBC836 引物多态性为 93.7%, 表明 ISSR 能够揭示材料间的多态性。

2.2 桃儿七 ISSR 的遗传多样性分析

通过 POPGENE 32 软件, 对桃儿七 13 个野生居群 ISSR 结果进行统计分析可见(表 3), 居群 2 甘肃碌曲县则岔石林居群的多态性位点百分比最高, 为 86.45%, 居群 7 甘肃榆中县兴隆山西山居群

的多态性位点百分比最低, 为 29.68%。从居群水平上来看, 13 个居群的多态性位点百分比平均为 65.50%; Nei's 遗传多样性指数 (H) 在 0.1100~0.2882 之间, 平均值为 0.2101。Shannon's 信息指数 (I) 在 0.1633~0.4365 之间, 平均值为 0.3191。各居群的 Shannon's 信息指数大小变化与多态位点百分比正相关。在物种水平上, 桃儿七 13 个居群多态位点百分比为 100.00%、遗传多样性指数为 0.3261、Shannon's 信息指数为 0.4941。ISSR 分子标记的遗传多样性分析表明, 野生桃儿七居群存在较高的遗传多样性。

表 3 13 个桃儿七居群遗传多样性

Table 3 The genetic diversity of 13 wild *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying populations

居群编号 Population code	平均观察等 位基因数 N_a	平均有效等位基 因数 N_e	Nei's 遗传多样 性指数 H	Shannon's 信息 指数 I	多态性 位点 NPL	多态性位点百 分比 PPL
1	1.8194 ± 0.3860	1.4006 ± 0.3431	0.2431 ± 0.1791	0.3736 ± 0.3736	127	81.94
2	1.8645 ± 0.3433	1.4808 ± 0.3303	0.2882 ± 0.1673	0.4365 ± 0.2275	134	86.45
3	1.6387 ± 0.4819	1.3286 ± 0.3629	0.1958 ± 0.1924	0.2994 ± 0.2716	99	63.87
4	1.6774 ± 0.4690	1.4047 ± 0.3668	0.2379 ± 0.1959	0.3562 ± 0.2777	105	67.64
5	1.6000 ± 0.4915	1.33.3 ± 0.3632	0.1963 ± 0.1941	0.2978 ± 0.2768	93	60.00
6	1.7613 ± 0.4277	1.3913 ± 0.3506	0.2364 ± 0.1819	0.3624 ± 0.2536	118	76.13
7	1.2968 ± 0.4583	1.1923 ± 0.3419	0.1100 ± 0.1822	0.1633 ± 0.2628	46	29.68
8	1.6000 ± 0.4915	1.3527 ± 0.3874	0.2034 ± 0.2037	0.3045 ± 0.2875	93	60.00
9	1.6710 ± 0.4714	1.3784 ± 0.3642	0.2249 ± 0.1920	0.3402 ± 0.2722	104	67.10
10	1.7097 ± 0.4554	1.3535 ± 0.3559	0.2127 ± 0.1882	0.3263 ± 0.2643	110	70.97
11	1.6645 ± 0.4737	1.3273 ± 0.3557	0.1967 ± 0.1898	0.3021 ± 0.2680	103	66.45
12	1.5806 ± 0.4951	1.3080 ± 0.3548	0.1841 ± 0.1931	0.2799 ± 0.2764	90	58.06
13	1.6323 ± 0.4838	1.3409 ± 0.3657	0.2020 ± 0.1952	0.3065 ± 0.2764	98	63.23
居群水平 Population level	1.6551 ± 0.4561	1.35493 ± 0.3571	0.2101 ± 0.1889	0.3191 ± 0.2760	1320	65.50
物种水平 Species level	2.0000 ± 0.000	1.5470 ± 0.3085	0.3261 ± 0.1407	0.4941 ± 0.1737	155	100.00

N_a : Observed number of alleles, N_e : Effective number of alleles, H = Nei's gene diversity, I = Shannon's Information index, NPL : The number of polymorphic loci, PPL : The percentage of polymorphic loci. The same as below

2.3 桃儿七 ISSR 的遗传结构与经纬度和海拔关系

根据 POPGENE 运算得到的结果(表 4) 进行分析, 13 个野生桃儿七居群的总基因多样性为 0.3227, 种群内遗传多样性为 0.2101, 表明其遗传多样性来自于居群之间。基因分化系数为 0.3489, 发生在种间的遗传分化为 34.89%, 则剩下 65.11% 的遗传分化于桃儿七的居群内发生, 居群内的遗传分化明显比居群之间的分化要大。种群间的基因流 $Nm=0.9331$, 表明居群之间的基因流十分丰富, 个体的迁移可带来原始种群中没有

或者很少存在的基因, 可以增加种群内的遗传变化, 基因流是种群内和种群间产生变异的重要因素。

对野生桃儿七不同居群采样环境因素中的经纬度, 海拔与遗传多样性指标进行 Pearson 相关性检验。根据表 5, N_a 、 N_e 、 H 、 I 等遗传多样性指标与经度、纬度、海拔的相互关系或多或少呈现出强相关和中等程度相关, 弱相关的比较少, r 绝对值范围 0.1263~0.7052, 桃儿七居群的遗传多样性指标与经度坐标和海拔的关系较为显著。

表 4 桃儿七种群间和种群内分子变异的分析

Table 4 Nei's analysis of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying populations

项目 Item	总基因 多样性 <i>Ht</i>	种群内 遗传多 样性 <i>Hs</i>	基因分 化系数 <i>Gst</i>	基因流 <i>Nm</i>
平均值 Mean	0.3227	0.2101	0.3489	0.9331
标准差 Standard deviation	0.0204	0.0099	-	-

2.4 基于 ISSR 分子标记的聚类分析

利用 11 个 ISSR 引物共扩增出 155 条条带, 计算桃儿七 13 个居群的 Nei's 遗传距离及遗传相似系数(表 6)。居群之间的遗传距离变化范围为 0.0316~0.3769, 平均为 0.1574。13 份野生桃儿七的相似系数在 0.7061~0.9689 之间, 平均值为 0.8546, 说明所选取的桃儿七单株在分子水平上差异较小, 其遗传多样性较弱。5 号和 6 号的相似系数最大,

为 0.9689, 表明这 2 个单株的亲缘关系最近, 遗传相似程度是最高的。将试验结果转换为“0、1”矩阵数据, 再利用 NTSYS 软件进行转换分析, 根据 ISSR 分子标记计算的遗传相似系数矩阵, 对 153 个样本 13 个居群进行 UPGMA 聚类分析(图 1), 结果表明, 在相似系数约 0.82 处, 13 个居群分为两大类, I 类群包括 1 号甘肃临潭贡巴寺居群和 2 号甘肃碌曲县则岔石林居群; II 类群又可分成 3 个亚群, II-1 类群为 3 号甘肃岷县麻子川乡瓦沟沟居群和 4 号甘肃卓尼县光盖山居群; II-2 类群为 5 号甘肃卓尼县大峪沟居群和 6 号甘肃甘南州碌曲县西仓乡神山顶居群, 8 号甘肃迭部县扎尕那乡居群和 9 号甘肃迭部县益哇乡居群, 10 号甘肃和政县铁沟山庄驴耳朵居群和 11 号甘肃康乐县莲花山居群, 12 号甘肃永登县竹林沟居群和 13 号青海北山互助国家森林公园孔隆沟居群; II-3 类群为 7 号甘肃榆中县兴隆山西山居群。

表 5 多样性指标与经纬度海拔间的 Pearson 相关性检验

Table 5 The Pearson test between genetic index and geographic distribution

多样性指标 Diversity index	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude
平均观察等位基因数 <i>Na</i>	-0.5501 (0.0515)	-0.3472 (0.2451)	0.6542 (0.0153)
平均有效等位基因数 <i>Ne</i>	-0.3172 (0.2910)	0.1367 (0.6562)	0.1263 (0.6811)
Nei's 遗传多样指数 <i>H</i>	-0.6128 (0.0260)	-0.4259 (0.1467)	0.7052 (0.0071)
Shannon's 信息指数 <i>I</i>	-0.6040 (0.0288)	-0.4159 (0.1575)	0.7031 (0.0073)
多态性位点百分比 <i>PPL</i>	-0.5499 (0.0516)	-0.3467 (0.2458)	0.6531 (0.0155)

表 6 基于 ISSR 分子标记桃儿七 13 个居群的 Nei's 遗传距离(左下角)及遗传相似系数(右上角)

Table 6 Nei's genetic distance (left corner) and genetic similar coefficient (right corner) of 11 wild *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying populations based on ISSR markers

居群编号 Population Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	****	0.9525	0.8031	0.8191	0.7968	0.8021	0.6860	0.7574	0.7678	0.7804	0.7678	0.7785	0.7622
2	0.0486	****	0.8165	0.8257	0.7953	0.8095	0.7061	0.7582	0.7730	0.7845	0.7916	0.7842	0.7647
3	0.2193	0.2028	****	0.9162	0.8697	0.8563	0.8060	0.8198	0.8502	0.8772	0.8474	0.8812	0.8661
4	0.1995	0.1915	0.0875	****	0.9222	0.9000	0.8151	0.8863	0.9045	0.9097	0.8912	0.8910	0.8941
5	0.2271	0.2290	0.1396	0.0810	****	0.9689	0.8657	0.8833	0.9166	0.9135	0.9060	0.9019	0.8942
6	0.2205	0.2113	0.1551	0.1054	0.0316	****	0.8625	0.8671	0.9112	0.8904	0.9030	0.8991	0.8825
7	0.3769	0.3480	0.2157	0.2044	0.1443	0.1479	****	0.8226	0.8149	0.8145	0.7924	0.8226	0.7912
8	0.2779	0.2768	0.1987	0.1207	0.1241	0.1426	0.1953	****	0.9392	0.9168	0.8920	0.9023	0.8849
9	0.2642	0.2574	0.1623	0.1004	0.0871	0.0930	0.2047	0.0628	****	0.9395	0.9290	0.9346	0.9212
10	0.2479	0.2427	0.1310	0.0947	0.0905	0.1161	0.2052	0.0869	0.0624	****	0.9541	0.9259	0.9182
11	0.2399	0.2337	0.1656	0.1152	0.0987	0.1020	0.2327	0.1143	0.0736	0.0470	****	0.9163	0.8855
12	0.2504	0.2430	0.1265	0.1154	0.1033	0.1063	0.1953	0.1028	0.0676	0.0770	0.0874	****	0.9359
13	0.2715	0.2682	0.1437	0.1120	0.1119	0.1250	0.2342	0.1223	0.0820	0.0853	0.1216	0.0662	****

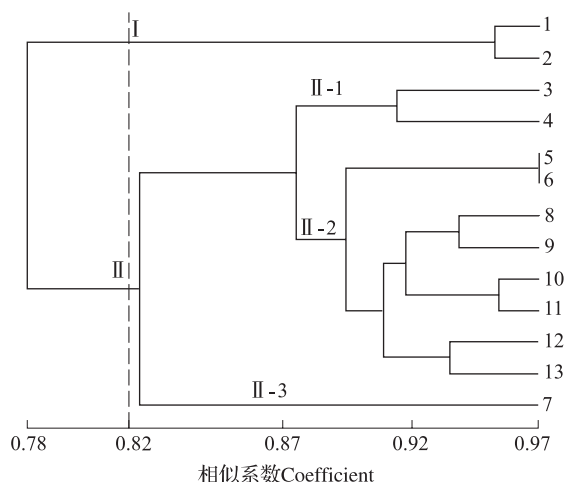


图1 基于ISSR标记桃儿七13个居群聚类图

Fig.1 UPGMA dendrograms of the genetic relationships among 13 wild *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S.Ying constructed from estimated simple matching genetic distance based on ISSR markers

2.5 遗传分化,遗传距离与地理距离相关性分析

参照 Burns 等^[19]对不同种群地理距离的自然对数和遗传距离进行 Mantel 相关性检验。one-tail P 值和 two-tail P 值,若 P 值都大于 0.05 则两个矩阵之间没有相关性,若 one-tail $P_x < 0.05$ 则相关, r 正负值表示正负相关性。使用 R 语言“vegan”包中的“vegdist”和“mantel”进行 Mantel 检验, $P=0.4220$,得到不同桃儿七居群的遗传距离与地理距离不相关(图2)。

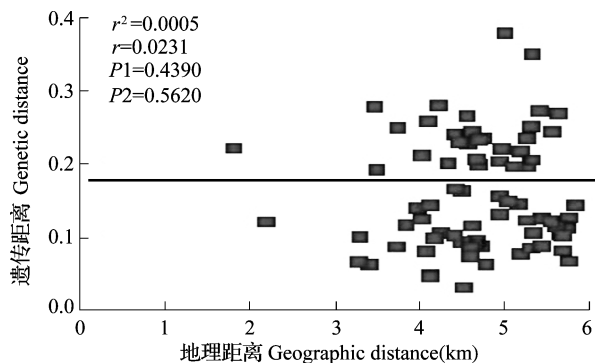


图2 地理距离自然对数和遗传距离 Mantel 检验

Fig.2 Mantel test between geographical distance and genetic distance

3 讨论

我国药用植物资源丰富,种类达 11146 种^[20],其中已知临床常用的植物药材达 700 多种^[21],分子鉴定技术为中国中药资源提供了支持与保障^[22]。

桃儿七作为青藏高原区一种道地性的传统药物资源,遭受过度采挖、鸟类和鼠类摄食、营养生长期长、种子不耐贮藏且萌发缓慢、生境破碎化等原因面临濒危,对其遗传多样性的研究及可持续利用保护尤为重要。在《生物多样性公约》的履行中,我国已经初步完成了云南全省的生物多样性编目^[23],生物多样性编目对某一地区的某特定物种是否解除濒危状态等提供了管理理论依据^[24],同时随着《名古屋议定书》的签署与履约,需要确定遗传资源的来源与产地,进行监测与保护利用^[25]。纵观历史,人类从植物多样性中获取的最大利益就是传统药物资源,世界上 80% 的人口依赖于传统药物来保持健康^[26]。由于桃儿七药材主要来源于野外,这使得野生植物资源受到很大的破坏,所以厘清植物野生居群系统发育,对植物遗传多样性和植物保护至关重要。虽然近年来有一些学者致力于研究野生药用植物遗传多样性,并有了一定的研究积累,但是这方面的研究仍然相对较少。随着对野生植物资源,特别是红色名录植物研究步伐的加快,势必为桃儿七等濒危药用野生遗传资源的保护提供更好的研究平台,ISSR-PCR 等分子标记方法在植物遗传多样性研究上将发挥更为重要的作用^[27-28]。

根据 ISSR 分子标记进行 UPGMA 聚类分析,1 号甘肃临潭贡巴寺居群和 2 号甘肃碌曲县则岔石林居群,与其他 11 个居群的遗传距离较远,但与 1 号居群相近的 6 号甘肃甘南州碌曲县西仓乡神山山顶居群却和相距较远的 5 号甘肃卓尼县大峪沟居群聚类,12 号甘肃永登县竹林沟居群和 13 号青海北山互助国家森林公园扎隆沟居群聚类,3 号甘肃岷县麻子川乡瓦沟沟居群和 4 号甘肃卓尼县光盖山居群聚类,8 号甘肃迭部县扎尕那乡居群和 9 号甘肃迭部县益哇乡居群聚类,10 号甘肃和政县铁沟山庄驴耳朵居群和 11 号甘肃康乐县莲花山居群聚类,7 号甘肃榆中县兴隆山西山居群单独聚类,各居群相互交错,说明桃儿七在该区域 13 个居群的遗传多样性相当丰富。从地理位置上来看,其在青藏高原区的边缘,与 3 号甘肃岷县麻子川乡瓦沟沟居群经度差距不大,但横向纬度跨越较大,相对来说,靠近公路受到人为的干扰更大,同时公路在一定程度上将野生桃儿七居群的生境分割开来,这可与 UPGMA 聚类图互相印证。结合野生桃儿七各居群在青藏高原区地理分布,由于青藏高原区地理位置的特殊性,在收集其样本时发现很难寻找到相关的居群,7 号甘肃榆中县兴隆山西山居群样点的海拔最低,仅

仅 2268 m, 其与 3 号甘肃岷县麻子川乡瓦沟沟居群同位于青藏高原区外非桃儿七主要分布区, 故可解释为何居群内个体分布稀少, 这也侧面验证了桃儿七对生长环境的选择性。2 号甘肃碌曲县则岔石林居群的 Shannon' s 信息指数最高, 其次是 1 号甘肃临潭贡巴寺居群, 再次是 6 号甘肃甘南州碌曲县西仓乡神山山顶居群, 相较来看, 其位置都较集中, 故此为桃儿七野生遗传资源的重要保护地。根据 Mantel 检验的结论, 各居群的遗传多样性与地理距离的无相关关系, 这可能与桃儿七的繁育方式和较为丰富的基因流等因素有关, 虽然桃儿七具有一系列适应于虫媒传粉的形态结构和生物学特征, 但同时也具有许多和自花授粉有关的适应机制。桃儿七在开花习性及花部形态上常表现出多态。在自然状况下, 桃儿七具有较大当前适合度, 除了自花授粉有性生殖外, 也可通过根茎无性繁殖, 故青海、甘肃的 13 个桃儿七野生居群除了 7 号甘肃榆中县兴隆山西山居群样点个体最少, 其居群尚需进一步地寻找样品, 其余的桃儿七野生遗传资源保存良好, 不处于濒危状态。

对于甘肃南部青藏高原边缘区 13 个野生桃儿七居群, 提出针对性保护建议: 除了主要采取就地保护策略保障其原始居群的遗传多样性外, 适当对不同地区桃儿七种质资源进行迁地保护, 维持其基因流的稳定性, 以 2 号甘肃碌曲县则岔石林居群作为原位核心保护地, 3 号甘肃岷县麻子川乡瓦沟沟居群和 7 号甘肃榆中县兴隆山西山居群着重观察和监测, 尽量保护桃儿七的所有遗传资源。对某一区域通过不同种群野生资源进行遗传资源研究, 通过分子生物学方法探究其遗传多样性, 探讨其不同海拔下不同自然居群的遗传多样性, 从不同生境下居群的遗传结构进行分子变异分析, 确定其保护策略, 应是野生药用植物保护的重要研究内容。

参考文献

- [1] 尚海琳. 桃儿七形态与生理特征的地理变异及种子萌发生理. 西安: 西北大学, 2009: 60-61
Shang H L. Geographic variation of morphology and physiology characteristics and seed germination physiology of *Sinopodophyllum hexandrum*. Xi'an: Northwest University, 2009: 60-61
- [2] 傅立国. 中国植物红皮书—稀有濒危植物. 北京: 科学出版社, 1991: 184
Fu L G. Chinese plant red data book-Rare and endangered plants. Beijing: Science Press, 1991: 184
- [3] 陈大霞, 赵纪峰, 刘翔, 王昌华, 张植伟, 秦松云, 钟国跃. 濒危药用植物桃儿七野生居群遗传多样性与遗传结构的 SCOT 分析. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 278-283
Cheng D X, Zhao J F, Liu X, Wang C H, Zhang Z W, Qing S Y, Zhong G Y. Genetic diversity and genetic structure of endangered wild *Sinopodophyllum emodi* by start codon targeted polymorphism. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(2): 278-283
- [4] 应俊生. 小檗科八角莲属和桃儿七属(新属)的研究. 植物分类学报, 1979, 17(1): 15-23
Ying J S. On *Dysosma Woodson* and *Sinopodophyllum Ying*, gen. nov. of the Berberidaceae. Journal of Systematics and Evolution, 1979, 17(1): 15-23
- [5] 马绍宾, 胡志浩. 小檗科鬼臼亚科的地理分布与系统发育. 云南植物研究, 1997, 19(1): 48-56
Ma S B, Hu Z H. A contribution to the geographical distribution and phylogeny of podophylloideae (berberidaceae). Acta Botanica Yunnanica, 1997, 19(1): 48-56
- [6] 李经纬. 中医大词典. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 143
Li J W. Dictionary of traditional chinese medicine. Beijing: People's Health Publishing House, 2004: 143
- [7] 陈毓亨. 我国鬼臼类植物资源的研究. 药学学报, 1979, 14(2): 101-107
Chen Y H. A study on the resources of Chinese podophyllin plants. Acta Pharmaceutica Sinica, 1979, 14(2): 101-107
- [8] Kong Y, Xiao J J, Meng S C, Dong X M, Ge Y W, Wang R F, Shang M Y, Cai S Q. A new cytotoxic flavonoid from the fruit of *Sinopodophyllum hexandrum*. Fitoterapia, 2010, 81: 367-370
- [9] 王笠, 赵志礼, 倪梁红, 嘎务, 米玛. 基于 ISSR 标记的麻花苳遗传多样性分析. 中草药, 2017, 48(15): 3168-3174
Wang L, Zhao Z L, Ni L H, Gaawe Dorje, Mi M. Assessment of genetic diversity on *Gentiana straminea* based on ISSR markers. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(15): 3168-3174
- [10] Gupta M, Chyi Y S, Romero-Severson J, Owen J L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89(7-8): 998-1006
- [11] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750
Qian W, Ge S, Hong D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(7): 741-750
- [12] McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica, 2000, 113(2): 135-144
- [13] Wolff K, Zietkiewicz E, Hofstra H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(3): 439-447
- [14] 任梦云, 陈彦君, 张盾, 杜乐山, 刘方, 关潇, 张银东. ISSR 标记技术在药用植物资源中的研究进展及应用. 生物技术通报, 2017, 33(4): 63-69
Ren M Y, Chen Y J, Zhang D, Du L S, Liu F, Guan X, Zhang Y D. Application and research progress of inter-simple sequence repeat (ISSR) marker in medicinal plants. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(4): 63-69
- [15] 张盾, 任梦云, 关潇, 张银东. 濒危藏药桃儿七 ISSR-PCR 反

- 应体系的建立与优化. 分子植物育种, 2017, 15(4): 1408-1416
- Zhang D, Ren M Y, Guan X, Zhang Y D. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction System for *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(4): 1408-1416
- [16] Ye H F C, Yang R C, Boyle T B J. Popgene: Microsoft windows?-Based freeware for population genetic analysis, Version 132. Canada: University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1997
- [17] Rohlf F J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics, 1992
- [18] Oksanen J, Kindt R, Legendre P. The vegan package. Community ecology package, 2007, 10: 631-637
- [19] Burns E L, Eldridge M D, Houlden B A. Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hyliid *Litoria aurea*. Molecular Ecology, 2004, 13(7): 1745-1757
- [20] 张惠源, 赵润怀, 袁昌齐, 孙传奇, 张志英. 我国的中药资源种类. 中国中药杂志, 1995(7): 387-390
- Zhang H Y, Zhao R H, Yuan C Q, Sun C Q, Zhang Z Y. Types of Chinese traditional medicine resources in China. China Journal of Chinese Materia Medica, 1995(7): 387-390
- [21] 董静洲, 易自力, 蒋建雄. 我国药用植物种质资源研究现状. 西部林业科学, 2005, 34(2): 95-101
- Dong J Z, Yi Z L, Jiang J X. Current situation of the research on the germ plasm resources of medicinal plant in China. Journal of West China Forestry Science, 2005, 34(2): 95-101
- [22] 时圣明, 潘明佳, 王洁, 陈常青. 分子鉴定技术在中药中的应用. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126
- Shi S M, Pan M J, Wang J, Chen C Q. Application of molecular identification techniques in Chinese materia medica. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(17): 3121-3126
- [23] 蒋志刚, 马克平. 中国生物多样性保护的国家意志, 科学决策和公众参与: 第一份省域物种红色名录研究. 生物多样性, 2017, 25(7): 794-795
- Jiang Z G, Ma K P. The state's will, scientific decision and citizen participation: in memory of the first provincial species red list in China. Biodiversity Science, 2017, 25(7): 794-795
- [24] 贺金生, 马克平. 保护生物学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1997: 20-33
- He J S, Ma K P. Conservation biology. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997: 20-33
- [25] 薛达元. 《名古屋议定书》的主要内容及其潜在影响. 生物多样性, 2011, 19(1): 113-119
- Xue D Y. Analysis for the main elements and potential impacts of Nagoya Protocol. Biodiversity Science, 2011, 19(1): 113-119
- [26] Nag A, Ahuja P S, Sharma R K. Genetic diversity of high-elevation populations of an endangered medicinal plant. AoB Plants, 2015: 7
- [27] 任秀霞, 张盈, 薛璟祺, 朱富勇, 石丰瑞, 王顺利, 张秀新. 滇牡丹天然居群的遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 2015, 16(4): 772-780
- Ren X X, Zhang Y, Xue J Q, Zhu F Y, Shi F R, Wang S L, Zhang X X. Genetic Diversity analysis of natural populations in *Paeonia delavayi*. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(4): 772-780
- [28] 刘强, 尹翔, 杨艳, 陈景震, 蒋丽娟. 白檀自然居群遗传结构与遗传多样性研究. 植物遗传资源学报, 2015, 16(4): 751-758
- Liu Q, Yin X, Yang Y, Chen J Z, Jiang L J. Analysis of genetic diversity and genetic structure in natural populations of *Symplocos paniculata*. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(4): 751-758