

• 药材与资源 •

基于 ISSR 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究

朱田田^{1,2,3}, 晋玲^{1,2*}, 张裴斯¹, 李应东¹, 杜弢^{1,3}, 何子清⁴

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000
2. 甘肃中医药大学中(藏)药资源研究所, 甘肃 兰州 730000
3. 甘肃中医药大学药用植物遗传育种研究所, 甘肃 兰州 730000
4. 甘肃岷归中药材科技有限公司, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 研究甘肃不同产区栽培当归的遗传多样性。方法 应用 ISSR 分子标记技术对甘肃省 41 个居群的栽培当归样本进行分析, 利用 Popgene 32 软件分析 Nei's 基因多样性指数(H)等遗传信息参数, 应用 Ntsys 软件构建亲缘关系 UPGMA 聚类图。结果 8 条引物共检测到 154 个位点, 其中多态性位点 119 个, 多态位点百分率(PPB)为 77.27%。栽培当归居群间的 H 为 0.222 9, Shannon's 多样性信息指数(I)为 0.337 4, 种群间基因分化系数(G_{st})为 0.683 9, 基因流(N_m)为 0.231 1, 遗传距离变化范围 0.042 9~0.327 8。结论 甘肃栽培当归遗传多样性在物种水平上较高; 居群间遗传多样性水平明显高于居群内; 居群间遗传分化程度大, 且基本无基因交流。

关键词: 甘肃; 当归; 栽培; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)23-3549-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.018

Genetic diversity analysis on *Angelica sinensis* from different habitats in Gansu province based on ISSRZHU Tian-tian^{1,2,3}, JIN Ling^{1,2}, ZHANG Pei-si¹, LI Ying-dong¹, DU Tao^{1,3}, HE Zi-qing⁴

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China
2. Research Institute of Chinese (Tibetan) Medicinal Resources Lanzhou 730000, China
3. Research Institute of Medicinal Plant Genetic Breeding, Lanzhou 730000, China
4. Gansu Minggui Traditional Chinese Medicine Technology Co., Ltd., Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity of *Angelica sinensis* from different habitats in Gansu province. **Methods** ISSR markers were used to analyze the genetic diversity of 41 populations of *A. sinensis*. Nei's genetic diversity index (H) and other parameters of genetic information were calculated by Popgene 32. UPGMA dendrogram relationship was clustered by Ntsys. **Results** Eight primers produced 154 bands, among which 119 were polymorphic bands, the average percentage of polymorphic bands (PPB) was 77.27%. H and Shannon's information index (I) were 0.222 9 and 0.337 4, the genetic differentiation coefficient (G_{st}) and gene flow (N_m) were 0.6839 and 0.231 1 within the population levels. The genetic distance varied from 0.042 9 to 0.327 8. **Conclusion** The genetic diversity among species of *A. sinensis* is at higher level, but the level of genetic diversity between populations is higher than that within populations. There is a great degree of genetic differentiation among populations, and gene flow does not almost exist between populations.

Key words: Gansu province; *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; cultivation; ISSR; genetic diversity

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为伞形科多年生草本植物, 具有补血活血、调经止痛、润燥滑肠之功效, 是甘肃省的主产药材之一^[1-2]。目前市场

上流通的当归药材商品均为栽培品种, 一般以传统自产种子为主, 农户自留自育, 长此以往势必导致品种退化, 品质降低, 而当归新品种选育方面的研

收稿日期: 2015-04-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360615); 甘肃省科技计划自然科学基金(1308RJZA127); 国家中医药行业科研专项课题(财社[2012]13号)

作者简介: 朱田田, 讲师, 硕士, 研究方向为中药资源开发与质量综合评价。Tel: (0931)8612404 E-mail: ztt0935@163.com

*通信作者 晋玲, 教授, 博士, 研究方向为珍稀濒危和大宗常用中药资源可持续利用。Tel: (0931)8722303 E-mail: zyxyjl@163.com

究又相对甚少,近年来仅由甘肃省相关单位培育出“岷归1号”“岷归2号”“岷归4号”等几个新品系,但仍采用人工选择的传统育种方法^[3-4]。在人工选育优良品种的过程中只有每一世代里最符合需求的植株的种子才能被继续播种,这样的筛选导致了遗传瓶颈,减少了整个基因组中的遗传多样性,其减少的程度则由栽培时期群体大小和持续时间长短决定^[5-6]。当归在甘肃已栽培千年,栽培群体的遗传多样性和遗传结构状况,迄今为止并无相关报道。因此,本实验利用 ISSR 分子标记技术对甘肃不同产地栽培当归进行遗传多样性状况、遗传结构和亲缘

关系研究,旨在为解决当归种质退化和良种繁育提供更多遗传学理论支持,为当归资源的可持续利用和保护提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 植物材料

材料为当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels 的新鲜叶片,于2013年7~8月采自甘肃省41个不同产区(表1)。采样时选取无病虫害的幼嫩叶片,放入硅胶中迅速干燥,编号后于-20℃冰柜中保存。全部样品由甘肃中医学院中药资源教研室晋玲教授鉴定为伞形科当归属 *Angelica* L.植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels。

表1 植物材料信息
Table 1 Information of plant materials

居群编号	采集地	地理位置		海拔/m	样本数
		E	N		
1	渭源县麻家集乡	103°55'4.927"	35°6'11.362"	2 519	20
2	渭源县庆坪乡	104°5'40.806"	35°14'45.091"	2 117	16
3	渭源县锹峪乡	104°10'10.278"	35°2'44.640"	2 279	20
4	漳县金钟乡	103°02.720'	34°50.146'	2 744	20
5	漳县草滩乡	104°28.223'	34°35.490'	2 434	20
6	漳县四足乡	104°22.005'	34°41.764'	2 088	20
7	漳县痘虎桥乡	103°12.954'	34°51.414'	2 304	20
8	渭源县上湾乡	103°56'49.824"	35°12'2.748"	2 091	16
9	漳县石川乡	104°19.168'	34°37.408'	2 166	20
10	岷县维新乡	103°52.666'	34°39.664'	2 455	20
11	漳县大草滩乡	104°13.375'	34°46.228'	2 305	20
12	岷县麻子川乡	104°06.233'	34°17.149'	2 515	20
13	岷县蒲麻乡	104°23.593'	34°33.259'	2 349	20
14	岷县马坞乡	104°55.172'	34°25.504'	2 100	20
15	岷县禾驮乡	104°09.237'	34°28.792'	2 321	20
16	岷县闫井乡	104°36.906'	34°21.038'	2 831	20
17	岷县锁龙乡	104°43.428'	34°24.200'	2 321	20
18	岷县寺沟乡	104°04.907'	34°21.547'	2 396	20
19	岷县茶埠乡	103°06.207'	34°29.762'	2 321	20
20	岷县秦许乡	104°01.419'	34°22.974'	2 424	20
21	岷县申都乡	104°18.783'	34°24.549'	2 827	20
22	岷县西寨乡	103°51.408'	34°28.681'	2 373	20
23	临潭县长川乡	103°24.777'	34°40.623'	2 826	20
24	临潭县羊永乡	103°27.040'	34°39.035'	2 768	20
25	临潭县石门乡	103°41.141'	34°43.284'	2 528	20
26	临潭县三岔乡	103°45.928'	34°34.893'	2 634	20
27	临洮县康家集乡	103°59'54.480"	35°13'42.810"	2 289	20

续表 1

居群编号	采集地	地理位置		海拔/m	样本数
		E	N		
28	卓尼县藏吧哇乡	103°56.531'	34°45.578'	2 824	20
29	卓尼县纳浪乡	103°45.724'	34°29.515'	2 413	20
30	和政县松鸣乡	103°19'4.620"	35°23'34.440"	2 335	20
31	和政县三合乡	103°20'19.818"	35°28'19.530"	2 340	20
32	宕昌县哈达铺镇	104°14.997'	34°11.358'	2 172	20
33	宕昌县庞家乡	104°16.944'	34°16.803'	2 351	20
34	康乐县巴松乡	103°29'41.772"	35°18'47.880"	2 335	20
35	康乐县景古镇	103°40'8.472"	35°7'44.844"	2 250	20
36	卓尼县羊沙乡	103°41.924'	34°53.262'	2 629	20
37	卓尼县洮砚乡	103°51.503'	34°46.138'	2 550	20
38	渭源祁家庙乡 (北坡)	104°01.834'	35°07.394'	2 519	16
39	渭源祁家庙乡 (南坡)	104°01.834'	35°07.394'	2 519	16
40	武山县沿安乡	104°55.010'	34°27.054'	2 028	20
41	宕昌县阿坞乡	104°09.694'	34°16.885'	2 372	20
合计					804

1.2 仪器与试剂

PCR 扩增仪 (德国 Biometra); 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad); DYY-7 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); 电泳槽 (北京六一仪器厂); TGL16M 型台式高速冷冻离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司)。

CTAB、EDTA、SDS、Tris、PVP、 β -巯基乙醇 (西安科昊生物工程有限责任公司); ISSR 随机引物 (根据 British Columbia 大学公布的序列设计, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成); RNaseA、Agarose 琼脂糖、Gold View 核酸染料、TaqDNA 聚合酶等 PCR 试剂 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 其他化学试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取及检测

采用试剂盒法提取不同居群当归样本基因组 DNA, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 将条带明亮、整齐、无降解的样本适当稀释后保存于 -20°C 冰箱中备用。

2.2 ISSR-PCR 反应体系与扩增程序

根据前期的研究结果^[7], 当归反应总体系为 20 μL , 内含 $10\times\text{PCR Buffer (Mg}^{2+}\text{ Plus)}$ 1.5 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 0.6 U, 引物 0.3 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 0.375 mmol/L 以及 DNA 模板 42 ng。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, (根据不同引物的退火温度) 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存结束反应。

2.3 供试样品电泳检测

用筛选出的 8 条 ISSR 随机引物^[7]按其最佳退火温度逐条对 41 个不同居群样本基因组 DNA 进行 PCR 扩增。反应结束后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 溶胶时加入适量 Gold View 核酸染料, 电泳缓冲液为 $1\times\text{TBE}$, 电压 100 V 下电泳 1.5 h 左右, EB (10 mg/mL) 染色 20 min, 在凝胶成像系统下检测并拍照保存。

2.4 数据统计与分析

采用人工读带法, 在相同迁移率位置上, 有带记为 1, 无带记为 0, 建立数据矩阵。利用 Popgene 32 软件对数据资料进行遗传多样性统计, 分析各居群多态位点百分率 (PPB)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 多态性信息指数 (I)、居群总基因多样性 (H_t)、居群内基因多样性 (H_s)、基因分化系数 (G_{st})、基因流 (N_m)、Nei's 遗传一致度和遗传距离 (D), 并根据 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析, 应用 Ntsys 软件构建系统树状图。

3 结果与分析

3.1 ISSR-PCR 扩增结果

用筛选出的 8 条 ISSR 引物对所有当归基因组 DNA 进行扩增和电泳检测。结果显示, 大部分样本均能扩增出清晰、数量多的条带, 扩增产物碱基数在 200~2 000 bp。图 1 为引物 UBC-835 和 UBC-868 对甘肃省临潭县三岔乡当归居群部分样本的扩增图谱。

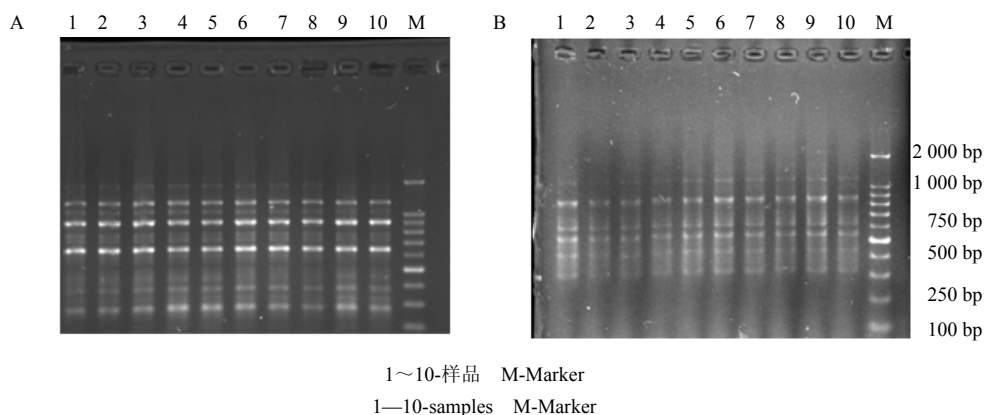


图 1 UBC-835 (A) 和 UBC-868 (B) 对 26 号居群部分样本的扩增结果

Fig. 1 PCR reaction of samples from No. 26 population by UBC-835 (A) and UBC868 (B)

3.2 甘肃不同产区栽培当归居群间遗传多样性分析

用 8 条 ISSR 随机引物对 41 个居群的 804 个个体进行了扩增, 统计结果见表 2。结果显示共检测到 154 个位点, 其中多态性位点 119 个, 多态性比率为 77.27%, I 平均值为 0.337 4, H 平均值为 0.222 9, 各指数均显示出甘肃栽培当归在物种水平上具有较

高的遗传多样性。当归不同居群内的 PPB 在 4.55%~29.87%, H 为 0.019 1~0.120 9, I 为 0.027 7~0.174 5, H 和 I 的大小与各居群 PPB 的高低趋势基本一致, 此外, 由于居群间的 PPB、 H 和 I 均高于各居群内的值, 说明当归居群内的遗传多样性水平明显低于居群间。

表 2 41 个不同居群当归遗传信息参数

Table 2 Parameters of genetic information for 41 populations of *A. sinensis*

居群编号	样本个数	总位点数	多态性标记位点数	PPB	H	I
1	20	154	46	29.87	0.120 1	0.174 5
2	16	154	33	21.43	0.078 8	0.115 8
3	20	154	39	25.32	0.100 7	0.146 4
4	20	154	24	20.13	0.080 0	0.117 6
5	20	154	40	25.97	0.109 2	0.156 7
6	20	154	33	21.43	0.079 6	0.117 5
7	20	154	25	16.23	0.070 9	0.101 9
8	16	154	13	21.43	0.080 9	0.118 1
9	20	154	29	18.83	0.056 7	0.087 8
10	20	154	7	4.55	0.020 9	0.029 6
11	20	154	19	12.34	0.046 5	0.068 8
12	20	154	36	23.38	0.095 6	0.139 1
13	20	154	25	16.23	0.066 9	0.097 5
14	20	154	46	29.87	0.119 6	0.173 2
15	20	154	24	15.58	0.062 9	0.091 1
16	20	154	14	9.09	0.034 6	0.051 1
17	20	154	29	18.83	0.079 2	0.114 9
18	20	154	25	16.23	0.066 6	0.096 3
19	20	154	41	26.62	0.088 6	0.132 8

续表 2

居群编号	样本个数	总位点数	多态性标记位点数	PPB	H	I
20	20	154	27	17.53	0.070 7	0.102 9
21	20	154	35	22.73	0.071 7	0.107 8
22	20	154	37	24.03	0.089 9	0.132 6
23	20	154	43	27.92	0.120 9	0.173 5
24	20	154	38	24.68	0.103 0	0.149 0
25	20	154	43	27.92	0.109 8	0.161 4
26	20	154	41	26.62	0.110 1	0.159 7
27	20	154	38	24.68	0.102 8	0.148 3
28	20	154	27	17.53	0.068 0	0.099 9
29	20	154	27	17.53	0.065 2	0.097 0
30	20	154	26	16.88	0.066 5	0.096 5
31	20	154	19	12.34	0.041 7	0.062 8
32	20	154	24	15.58	0.061 7	0.090 5
33	20	154	27	17.53	0.068 5	0.100 5
34	20	154	7	4.55	0.019 1	0.027 7
35	20	154	17	11.04	0.044 5	0.064 3
36	20	154	13	8.44	0.033 7	0.049 3
37	20	154	10	6.49	0.024 3	0.035 9
38	16	154	18	11.69	0.033 8	0.052 7
39	16	154	9	5.84	0.024 4	0.035 5
40	20	154	22	14.29	0.052 1	0.077 5
41	20	154	17	11.04	0.048 3	0.069 2
总计	804	154	119	77.27	0.222 9	0.337 4

3.3 甘肃不同产区栽培当归居群间遗传分化分析

通过 Popgene 32 软件分析得到栽培当归各居群的 H_t 为 0.222 9, H_s 为 0.070 5, 根据 H_t 和 H_s 来计算 G_{st} 为 0.683 9。这表明有 68.39% 的变异存在于居群间, 而 31.61% 的变异存在于居群内。居群的遗传分化分析表明, 居群间的分化程度较大, 但居群内部的遗传分化却较低。Wright 提出当基因流 $N_m > 1$ 时, 居群间存在一定的基因流, 其值越大基因交流越强^[8], 本研究得到的 N_m 值为 0.231 1, 表明不同产区栽培当归间基本无基因交流, 这与其栽培方式有关。

3.4 甘肃不同产区栽培当归居群间亲缘关系分析

Popgene 32 软件分析结果表明, 41 个不同产区的当归栽培群体之间遗传距离的变异范围是 0.042 9~0.327 8 (表 3), 其中遗传距离最小的为临潭县石门乡当归居群和临潭县三岔乡当归居群, 遗传距离最大的为渭源县庆坪乡当归居群和卓尼县纳浪乡当归居群。

利用 Ntsys 软件根据 Nei's 遗传距离构建甘肃不同产区栽培当归群体的 UPGMA 聚类图 (图 3), 结果显示, 在遗传距离 0.22 处, 来自漳县、岷县、临潭县、渭源县多数乡镇、卓尼县部分地区、和政县、宕昌县境内的栽培当归聚为一类, 而康乐县巴松乡、景古镇, 卓尼县羊沙乡、洮砚乡, 渭源祁家庙乡 (北坡), 武山县沿安乡的栽培当归聚为一类; 在遗传距离 0.20 处, 来自渭源县麻家集乡、庆坪乡、锹峪乡、祁家庙乡 (南坡), 漳县金钟乡、草滩乡、四足乡、殪虎桥乡、石川乡、大草滩乡, 岷县维新乡、禾驮乡、闰井乡的栽培当归聚为一类, 来自岷县麻子川乡、蒲麻乡、马坞乡、锁龙乡、寺沟乡、茶埠乡、秦许乡、申都乡、西寨乡, 临潭县长川乡、羊永乡、石门乡、三岔乡, 临洮县康家集乡, 卓尼县藏吧哇乡、纳浪乡, 和政县松鸣乡、三合乡, 宕昌县哈达铺镇、庞家乡、阿坞乡的栽培当归聚为一类。

表 3 41 个居群栽培当归的遗传距离

Table 3 Genetic distance for 41 populations of *A. sinensis*

居群编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****										
2	0.118 1	****									
3	0.128 1	0.161 4	****								
4	0.099 4	0.153 9	0.128 8	****							
5	0.175 8	0.202 3	0.127 3	0.113 3	****						
6	0.141 8	0.175 1	0.123 1	0.133 1	0.117 5	****					
7	0.162 0	0.132 6	0.167 9	0.168 4	0.162 8	0.122 2	****				
8	0.216 5	0.180 9	0.194 3	0.208 8	0.241 1	0.208 8	0.093 2	****			
9	0.143 6	0.137 9	0.141 1	0.111 7	0.165 2	0.160 5	0.120 9	0.125 1	****		
10	0.220 7	0.179 2	0.219 9	0.216 9	0.250 2	0.222 9	0.145 4	0.223 4	0.191 1	****	
11	0.144 7	0.141 8	0.147 7	0.151 2	0.175 4	0.123 1	0.091 5	0.151 5	0.142 1	0.152 7	****
12	0.216 0	0.218 4	0.167 0	0.191 2	0.221 9	0.206 2	0.130 1	0.100 7	0.110 1	0.169 3	0.183 2
13	0.210 0	0.190 4	0.159 2	0.184 5	0.210 9	0.178 9	0.099 0	0.102 8	0.102 9	0.124 1	0.158 2
14	0.135 2	0.136 7	0.142 3	0.143 8	0.202 0	0.157 1	0.083 8	0.087 7	0.096 2	0.129 5	0.119 6
15	0.115 7	0.111 6	0.128 4	0.103 7	0.168 1	0.160 8	0.143 4	0.194 9	0.090 1	0.144 2	0.105 0
16	0.138 1	0.159 2	0.113 4	0.089 0	0.145 4	0.147 7	0.157 3	0.222 9	0.094 9	0.169 0	0.111 2
17	0.242 6	0.202 7	0.156 9	0.180 3	0.184 8	0.205 3	0.150 7	0.146 2	0.125 9	0.184 6	0.202 4
18	0.209 8	0.148 2	0.199 0	0.202 1	0.232 9	0.230 8	0.148 9	0.146 9	0.127 8	0.184 4	0.197 3
19	0.222 3	0.179 3	0.168 5	0.198 3	0.224 8	0.187 7	0.163 4	0.163 9	0.146 2	0.199 4	0.181 0
20	0.315 4	0.257 8	0.226 2	0.286 0	0.265 2	0.266 9	0.175 0	0.185 7	0.223 4	0.175 8	0.185 0
21	0.235 2	0.173 7	0.176 1	0.226 0	0.240 9	0.271 8	0.163 5	0.147 1	0.116 4	0.222 5	0.221 3
22	0.299 7	0.237 4	0.190 8	0.264 1	0.251 6	0.291 5	0.196 8	0.160 5	0.177 9	0.221 6	0.253 4
23	0.226 2	0.233 7	0.204 9	0.218 5	0.214 3	0.228 2	0.175 3	0.151 0	0.161 3	0.209 6	0.247 2
24	0.284 6	0.261 8	0.241 8	0.261 6	0.220 8	0.231 9	0.204 9	0.186 7	0.209 6	0.226 4	0.213 1
25	0.179 1	0.204 7	0.184 5	0.183 9	0.181 0	0.148 9	0.145 4	0.191 7	0.183 5	0.207 8	0.122 7
26	0.182 2	0.225 7	0.210 0	0.191 7	0.197 6	0.166 5	0.177 5	0.207 7	0.195 9	0.225 5	0.165 7
27	0.211 3	0.228 3	0.191 0	0.220 9	0.209 9	0.183 8	0.120 7	0.152 4	0.166 6	0.170 2	0.137 3
28	0.225 8	0.259 1	0.222 9	0.208 4	0.221 7	0.221 2	0.164 2	0.143 6	0.192 7	0.262 0	0.198 2
29	0.310 8	0.327 8	0.248 2	0.278 5	0.250 7	0.269 3	0.233 8	0.216 3	0.259 3	0.229 0	0.236 0
30	0.236 0	0.242 2	0.208 8	0.211 8	0.239 0	0.198 6	0.153 8	0.137 3	0.199 6	0.234 6	0.182 2
31	0.258 8	0.301 8	0.196 8	0.226 0	0.237 3	0.204 0	0.171 6	0.170 6	0.215 5	0.223 7	0.230 0
32	0.241 9	0.255 3	0.194 4	0.173 5	0.203 2	0.221 3	0.177 6	0.162 1	0.176 5	0.215 2	0.243 3
33	0.235 2	0.253 3	0.195 9	0.175 5	0.206 2	0.187 4	0.163 9	0.160 1	0.161 2	0.254 4	0.195 1
34	0.282 4	0.255 1	0.323 9	0.240 1	0.314 6	0.303 2	0.241 2	0.215 1	0.257 6	0.277 6	0.297 0
35	0.244 0	0.241 7	0.259 6	0.209 8	0.231 8	0.250 7	0.210 7	0.203 9	0.207 7	0.304 0	0.266 4
36	0.259 4	0.221 2	0.238 1	0.261 9	0.299 4	0.269 1	0.214 7	0.178 6	0.211 6	0.321 7	0.279 9
37	0.213 6	0.187 9	0.236 9	0.218 4	0.270 5	0.242 9	0.228 2	0.173 5	0.199 2	0.278 0	0.287 3
38	0.247 7	0.233 8	0.231 7	0.187 1	0.249 4	0.216 0	0.218 7	0.196 1	0.244 3	0.219 8	0.250 5
39	0.178 8	0.119 3	0.238 6	0.202 2	0.240 7	0.211 4	0.168 4	0.216 3	0.194 1	0.153 0	0.165 6
40	0.296 7	0.254 7	0.247 9	0.304 1	0.277 1	0.249 9	0.224 2	0.192 5	0.236 6	0.275 6	0.267 1
41	0.164 0	0.231 3	0.131 6	0.145 8	0.187 3	0.164 1	0.163 4	0.181 3	0.149 9	0.215 3	0.152 2
居群编号	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
12	****										
13	0.071 8	****									
14	0.065 9	0.056 6	****								
15	0.207 2	0.168 1	0.119 6	****							
16	0.185 3	0.150 9	0.124 5	0.049 4	****						
17	0.114 8	0.083 5	0.110 5	0.137 5	0.126 6	****					
18	0.164 3	0.145 9	0.136 4	0.109 8	0.172 9	0.111 4	****				
19	0.159 7	0.142 9	0.148 2	0.148 1	0.169 1	0.107 5	0.074 4	****			
20	0.189 4	0.177 7	0.189 3	0.203 6	0.208 2	0.135 9	0.165 9	0.151 0	****		
21	0.111 5	0.117 2	0.112 6	0.169 3	0.164 5	0.106 7	0.123 7	0.152 9	0.139 6	****	
22	0.132 7	0.128 5	0.128 0	0.189 3	0.214 1	0.089 7	0.140 0	0.149 1	0.145 4	0.075 3	****

续表 3

居群编号	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
23	0.127 6	0.132 7	0.128 0	0.188 2	0.200 4	0.113 3	0.158 0	0.168 8	0.119 5	0.111 8	0.098 8
24	0.173 7	0.166 7	0.160 3	0.217 4	0.200 9	0.154 3	0.211 3	0.188 9	0.124 4	0.142 4	0.129 9
25	0.199 0	0.168 9	0.153 9	0.143 1	0.135 4	0.179 4	0.195 8	0.173 9	0.141 8	0.175 7	0.190 6
26	0.211 8	0.198 0	0.158 3	0.148 2	0.153 8	0.180 4	0.199 6	0.177 3	0.156 8	0.193 1	0.177 1
27	0.156 5	0.117 4	0.109 5	0.142 2	0.138 6	0.131 8	0.171 3	0.165 9	0.114 0	0.158 2	0.134 4
28	0.143 5	0.149 2	0.143 4	0.203 8	0.186 9	0.143 4	0.178 1	0.183 1	0.151 2	0.161 6	0.158 3
29	0.202 3	0.189 6	0.189 6	0.251 6	0.257 9	0.193 3	0.251 8	0.226 5	0.179 2	0.203 2	0.138 4
30	0.162 3	0.145 0	0.145 4	0.196 5	0.185 1	0.143 9	0.172 1	0.149 5	0.124 0	0.164 8	0.166 1
31	0.140 6	0.140 3	0.143 6	0.253 7	0.216 2	0.160 1	0.212 8	0.191 0	0.169 5	0.172 0	0.174 4
32	0.126 0	0.113 4	0.105 0	0.222 5	0.194 4	0.139 9	0.194 5	0.194 0	0.204 9	0.164 4	0.156 7
33	0.148 2	0.105 8	0.138 6	0.221 2	0.190 5	0.144 3	0.209 2	0.163 3	0.188 1	0.181 8	0.193 4
34	0.256 5	0.226 7	0.205 9	0.260 5	0.305 5	0.247 6	0.201 4	0.243 7	0.295 5	0.241 6	0.262 0
35	0.193 0	0.199 6	0.185 6	0.257 4	0.292 6	0.215 4	0.222 4	0.214 3	0.235 8	0.225 6	0.230 4
36	0.201 0	0.194 2	0.175 6	0.244 5	0.306 9	0.195 7	0.144 3	0.160 4	0.230 6	0.202 1	0.194 8
37	0.175 3	0.183 4	0.157 9	0.227 4	0.281 6	0.190 1	0.126 4	0.137 2	0.260 7	0.178 4	0.186 8
38	0.175 3	0.159 7	0.140 7	0.234 6	0.252 4	0.172 5	0.191 9	0.165 8	0.225 7	0.225 9	0.183 8
39	0.236 7	0.209 9	0.154 9	0.143 1	0.219 2	0.217 3	0.118 3	0.162 5	0.221 6	0.211 6	0.228 8
40	0.200 5	0.198 5	0.188 3	0.290 4	0.295 5	0.249 6	0.221 9	0.204 6	0.246 3	0.184 8	0.217 1
41	0.161 5	0.139 3	0.117 4	0.158 2	0.122 9	0.122 0	0.214 0	0.148 1	0.186 6	0.172 6	0.181 4
居群编号	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
23	****										
24	0.106 4	****									
25	0.132 5	0.081 9	****								
26	0.135 8	0.076 2	0.042 9	****							
27	0.120 5	0.075 6	0.062 0	0.059 3	****						
28	0.097 1	0.102 5	0.087 2	0.096 6	0.086 6	****					
29	0.152 0	0.164 2	0.165 0	0.158 7	0.144 1	0.145 1	****				
30	0.113 9	0.101 6	0.104 6	0.099 1	0.094 0	0.062 8	0.132 4	****			
31	0.135 7	0.145 1	0.155 6	0.168 4	0.131 0	0.104 3	0.150 3	0.091 1	****		
32	0.155 9	0.185 8	0.195 6	0.189 5	0.126 8	0.125 6	0.155 3	0.153 0	0.083 9	****	
33	0.160 3	0.130 8	0.140 8	0.161 8	0.120 3	0.143 0	0.232 7	0.146 3	0.137 5	0.111 5	****
34	0.248 3	0.287 5	0.300 9	0.290 4	0.277 6	0.229 6	0.278 4	0.233 4	0.180 8	0.149 0	0.216 6
35	0.179 7	0.201 1	0.200 7	0.191 1	0.192 2	0.159 9	0.249 0	0.158 3	0.150 8	0.166 9	0.130 3
36	0.216 6	0.224 2	0.276 9	0.265 3	0.231 5	0.195 5	0.277 4	0.178 4	0.188 6	0.208 3	0.179 4
37	0.190 4	0.247 7	0.274 8	0.235 6	0.237 9	0.190 2	0.257 9	0.181 4	0.162 8	0.152 4	0.196 4
38	0.153 0	0.208 8	0.230 3	0.204 1	0.192 4	0.152 5	0.192 6	0.148 2	0.146 9	0.115 8	0.159 3
39	0.260 4	0.275 1	0.248 1	0.243 5	0.223 1	0.250 3	0.253 3	0.228 6	0.227 9	0.222 4	0.262 5
40	0.232 7	0.231 7	0.258 4	0.267 9	0.246 1	0.204 2	0.233 1	0.188 1	0.143 7	0.169 2	0.233 4
41	0.161 1	0.158 6	0.131 7	0.124 5	0.135 6	0.154 2	0.169 2	0.118 2	0.151 6	0.169 8	0.130 2
居群编号	34	35	36	37	38	39	40	41			
34	****										
35	0.219 9	****									
36	0.199 6	0.151 6	****								
37	0.140 4	0.145 7	0.088 8	****							
38	0.163 8	0.142 5	0.156 1	0.085 3	****						
39	0.170 9	0.194 6	0.142 6	0.103 1	0.155 3	****					
40	0.128 7	0.240 2	0.185 7	0.153 6	0.192 0	0.199 8	****				
41	0.294 3	0.246 0	0.245 3	0.247 5	0.203 1	0.275 7	0.235 8	****			

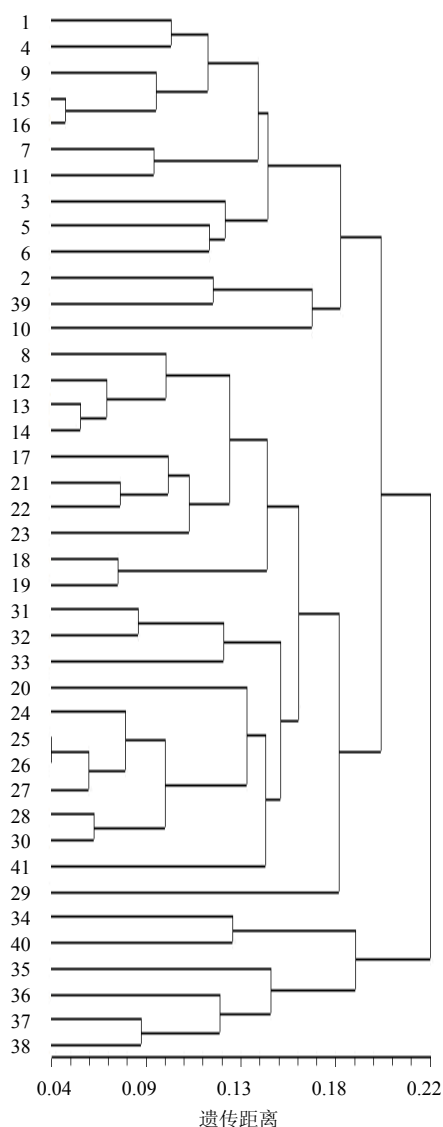


图 3 41 个居群栽培当归的 UPGMA 树状聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for 41 populations of *A. sinensis*

4 讨论

遗传多样性可以反映一个物种适应环境的能力以及可被改造和利用的潜力^[8-10]，若该物种遗传多样性水平较低，就会导致其适应能力变差，有害隐性基因表达增加，最终导致该物种的退化，对于栽培植物来说，其在种植过程中会出现结实率低，不易存活，抗病虫害能力差等问题。目前，甘肃大面积栽培的当归品种主要为岷归 1 号，占产区种植面积的 90% 左右，因此，本研究选取的研究材料为岷归 1 号的居群栽培样本。利用 8 条 ISSR 随机引物对 41 个不同居群的 804 个样本扩增后，PPB 为 77.27%，说明甘肃主要栽培当归的遗传多样性在物种水平上较高，但与多数其他栽培药材相比偏低或

持平^[11-13]，且居群内的遗传多样性水平明显低于居群间。通常居群的进化速率与其遗传多样性成比例，居群内遗传变异水平是和其适和度呈正相关的，遗传多样性的下降意味着其适应环境变化的能力下降，而遗传多样性的丧失将导致有机体对环境适应能力的降低^[14-16]，因此对于遗传多样性较低的当归居群，是否会出现抗病力下降、产量降低等现象，还有待于进一步调查。

通过 Popgen 软件分析得到栽培当归居群的 H_t 为 0.222 9， H_s 为 0.070 5，根据 H_t 和 H_s 来计算 G_{st} 为 0.683 9，居群间基因流估计值 N_m 为 0.231 1，这表明有 68.39% 的变异存在于居群间，而 31.61% 的变异存在于居群内，不同居群栽培当归间基本无基因交流。当归虽然在甘肃种植地区较多，但除岷县、漳县、宕昌、临潭等少数县区的农民能够自己繁育种子外，其余地区的栽培种苗均是从以上地区购买，且当年移栽当年采挖，而能够育苗留种的地区地理距离相隔不远，因此更容易产生近交衰退或小居群内的遗传漂变，从而导致栽培当归的遗传多样性丧失、有害基因固定、种质退化^[17]。

从 41 个当归居群的遗传距离和聚类结果来看，临潭县石门乡和临潭县三岔乡当归居群亲缘关系最近，渭源县庆坪乡和卓尼县纳浪乡亲缘关系最远。渭源县和漳县多数乡镇的当归居群聚为一类，岷县、临潭县、宕昌县、和政县和临洮县的大多数乡镇的当归居群聚为一类，而康乐县、卓尼县部分乡镇和武山县的当归居群单独聚为一类，由此可以看出渭源等地的农民仍习惯从离自己较近的种苗产地漳县购买种苗；距离种苗产地较远的康乐、卓尼部分乡镇和武山等县的农民在购买种苗时并不注重产地，因此其种苗来源较为混杂；而岷县、宕昌县和临潭县作为传统的当归育苗区，其种苗除了满足本地区农民的需求外，临洮县、和政县等地的农民也从该地区购买种苗，这与笔者的调查结果基本一致。此外笔者也了解到，近几年来，卓尼县和渭源县部分有条件的地区也开始尝试自己留种育苗，但对留种种苗的来源却不清楚，应鼓励这些地区选留地理距离较远或来源于不同栽培品种的当归种子，可以更好地防止近交衰退。

以上研究仅讨论了当归栽培群体的遗传多样性和遗传分化状况，与其野生居群相比遗传多样性是否降低、遗传分化是否更明显则需要进一步研究讨论。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 孙红梅, 张本刚, 齐耀东, 等. 当归药材资源调查与分析 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 437-441.
- [4] 李鹏程, 刘效瑞. 当归新品种岷归4号选育及优化种植技术研究 [J]. 中药材, 2011, 34(7): 1017-1019.
- [5] Doebley J. Molecular evidence for a missing wild relative of maize and the introgression of its chloroplast genome into *Zea Perennis* [J]. *Evolution*, 1989, 43(7): 1555-1559.
- [6] Eyre-Walker A, Gaut R L, Hilton H, *et al*. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1998, 95(8): 4441-4446.
- [7] 朱田田, 张裴斯, 晋玲, 等. 当归简单重复序列区间-聚合酶链反应体系的建立及优化与品种(系)间遗传关系研究 [J]. 中国药房, 2014, 25(35): 3265-3269.
- [8] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 96-100.
- [9] 朱田田, 晋玲, 杜弢, 等. 基于 ISSR 的甘肃中麻黄遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1764-1768.
- [10] 王建波. 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. 遗传, 2002, 24(5): 613-616.
- [11] 张金渝, 杨维泽, 崔秀明, 等. 三七栽培居群遗传多样性的 EST-SSR 分析 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(9): 1473-1477.
- [12] 王熬. 蒙古黄耆和膜荚黄耆居群遗传多样性研究 [D]. 北京: 中央民族大学, 2013.
- [13] 何俊. 滇重楼遗传多样性的 ISSR 分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [14] 施立明. 遗传多样性及其保存 [J]. 生物科学信息, 1990, 2(4): 158-164.
- [15] 何平. 珍稀濒危植物保护生物学 [M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 2005.
- [16] Frankham R, Ballon J D, Briscoe D A. *Introduction to Conservation Genetics* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- [17] 李典谟, 徐汝梅. 物种濒危机制和保育原理 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.