

基于 ISSR 的野生红芪种质遗传多样性与遗传结构研究

强正泽, 王 燕, 李 旭, 李 波, 李 硕, 王明伟, 李成义*

甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 研究甘肃野生红芪种质资源的遗传结构及遗传多样性。方法 收集 15 份武都、宕昌红芪自然分布区野生种质样本, 采用 ISSR 标记技术扩增, POPGENE 1.32 软件计算遗传多样性参数, NTSYS 软件进行 UPGMA 与 PCoA 分析, 采用 Arlequin 31 开展分子变异分析, 运用 structure 2.3.4 软件开展居群结构分析。结果 9 条引物总共扩增出 173 条条带, 多态性条带数为 126, 多态性比率为 72.83%, 取样野生红芪种群的多态性位点比率 (PPL) 为 49.71%~61.85%, 平均多态性比率为 55.78%。红芪种群的总体物种水平的等位基因观察数 (N_a) 为 1.728 3, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.364 6, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.224 2, Shannon's 指数 (I) 为 0.334 5。野生红芪种质的 Nei 总基因多样性为 0.223 0, Nei's 种群内基因多样性为 0.192 1, Nei's 基因分化系数为 0.138 9, 基因流为 3.099 4。野生红芪种质种群间的变异为 16.36%, 种群内的变异占 83.64%, 遗传变异主要发生在种群内。UPGMA、PCoA 与居群结构分析均表明取样野生红芪种质种群可分为 2 类, Mantel 相关性检测发现, 遗传分化与地理距离呈中等程度相关性。结论 取样野生红芪种质具有丰富的遗传多样性, 遗传结构呈现出遗传分化主要发生在种群内与多年生的特征, 为保护与开发利用红芪种质资源提供了理论基础。

关键词: 野生; 红芪种质; 遗传结构; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2432-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.027

Assessment of genetic diversity and genetic structure of germplasm of wild *Hedysari Radix* based on ISSR markers

QIANG Zheng-ze, WANG Yan, LI Xu, LI Bo, LI Shuo, WANG Ming-wei, LI Cheng-yi

Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective Assessment of genetic diversity and genetic structure of germplasm of wild *Hedysari Radix*. **Methods** Fifteen germplasms of wild *Hedysari Radix* were collected from Wudu populations and Tanchang populations. ISSR (Intersimple sequence repeat) markers were used. ISSR data were analyzed with the program POPGEN 1.32. The UPGMA tree and PCoA analysis was constructed using Ntsys software. The AMOVA analysis used Arlequin 31 software and Population structure analysis used the structure 2.3.4 software. **Results** The results of the ISSR-PCR showed that 126 (72.83%) of the 173 ISSR loci tested were polymorphic by the nine primers. The change of percentage of polymorphic loci (PPL) of wild germplasm populations were 49.71%—61.85%. The average of PPL was 55.78%. Two populations of species level of observed number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Nei's gene diversity (H), and Shannon's information index was 1.728 3, 1.364 6, 0.224 2, and 0.334 5, respectively. Total gene diversity (H_t), gene diversity with provenances (H_s), the coefficient of gene differentiation (G_{st}), and estimate of gene flow from G_{st} (N_m) of cultivated and wild population were 0.223 0, 0.192 1, 0.138 9, and 3.099 4, respectively. The among-population component accounted for 16.36% of the total variation, while the within-population component accounted for 83.64%, and genetic variation occurred mainly within the population. UPGMA analysis showed that 15 samples were clustered into two branches including I and II. PCoA and population structure analysis confirmed the partitioning results of the UPGMA clustering. Mantel correlation test showed that there existed middle-level correlations between the genetic differentiation and geographical distance. **Conclusion** Our studies showed that the genetic diversity of *Hedysari Radix* populations was at a higher level, the characteristics of genetic structure included genetic differentiation that occurs mainly within populations and perennials, which provides theoretical basis for protecting and utilizing germplasm of *Hedysari Radix* resources.

Key words: wild; germplasm of *Hedysari Radix*; genetic structure; genetic diversity; ISSR

收稿日期: 2017-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360621)

作者简介: 强正泽, 在读博士, 研究方向为中藏药资源学研究。E-mail: 948124394@qq.com

*通信作者 李成义, 教授, 博士生导师, 从事中药品种与质量研究。Tel: (0931)8765385 E-mail: gslichengyi@163.com

红芪为甘肃名贵药材, 来源于豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根, 属于多年生植物, 在西北地区具有悠久的药用历史, 其一直作为黄芪的一种记录于黄芪项下, 《中国药典》1985 年版将二者分开记载^[1]。据《武都县志》1998 年版^[2]中记载: “红芪为名贵药材, 由野生转家生已有 100 多年历史, 尤其以花斑、菊花心的‘米仓红芪’为独特品种而饮誉中外”。《宕昌县志》1995 年版^[3]记载: 从 1974 年开始家种驯化试验, 获得成功, 大面积推广栽种, 消减了野生药源日趋枯竭的危险。《岷县志》1995 年版^[4]记载: “解放后, 社会需求量大, 野生红芪难满足需求, 80 年代初, 家种驯化试验成功后, 大面积栽种”。《陇西县志》^[5] (1986—2005) 中记载: “1976 年, 红芪在首阳引进种植成功, 1984 年, 红芪在雪山、渭河沿川栽培”。从以上记载可以看出, 野生红芪曾经 20 世纪 70 年代时期处于资源匮乏的状态, 由于及时的驯化栽培, 资源匮乏的现状得到改善, 野生红芪资源得到了保护。近年来, 红芪的研究主要集中于栽培资源、药材质量、化学成分、药理作用等方面^[6-12], 缺乏对红芪种质的遗传变异信息及遗传背景的深入研究, 不利于红芪种质资源的可持续开发利用。

遗传多样性与遗传结构是遗传变异分布格局的总和, 遗传多样性对物种的演化和保存有重要的意义^[13], 同时野生种群的遗传变异在维持种群基因

多态性和管理策略方面起着重要作用。Xiao 等^[14]报道, 1994 年 Zietkiewicz 等首次提出了 ISSR 标记技术, 由于其可提供植物更多的基因组 DNA 信息, 而被广泛应用于遗传多样性、亲缘关系、药材鉴定、筛选高含量株系、阐明药材道地性等^[15-18]研究中, 并取得了良好的研究成果。近年来, 我国学者借助 ISSR 标记技术对中药的遗传多样性做了较多的研究, 如大黄、麻花苻等^[19-20], 为中药分子领域的研究奠定了基础, 这些研究表明采用 ISSR 标记技术分析中药的遗传多样性具有科学性、可行性, 为中药资源保护及遗传图谱库的建立夯实了基础。

本实验采用 ISSR 标记技术, 开展野生红芪种质资源的遗传结构、遗传多样性研究, 探索红芪自然分布种群的遗传分化, 为野生红芪种质资源的鉴定、保护与合理利用提供支撑。

1 材料

1.1 药材

所用 15 份红芪种质资源样品采自陇南市武都区及宕昌县野生居群, 由甘肃中医药大学药学院李成义教授鉴定为多序岩黄芪 *H. polybotrys* Hand. -Mazz. 的种子。样品采集后装入含有硅胶的自制无纺布袋中保存, 并现场编号, 经反复更换硅胶, 直至干燥, 后放入甘肃中医药大学中药鉴定与质量评价实验室-20 °C 冰箱保存, 备用。样品信息及采集点信息见表 1。

表 1 野生红芪种质样品信息

Table 1 Informations of germplasm of wild *Hedysari Radix*

| 编号 | 采样点 | 经度 (E) | 纬度 (N) | 海拔/m |
|----|--------------|---------------|--------------|---------|
| 1 | 甘肃省陇南市武都区安化镇 | 105°06'57.92" | 33°28'28.45" | 1 899.6 |
| 2 | 甘肃省陇南市武都区安化镇 | 105°06'42.80" | 33°28'54.05" | 1 844.1 |
| 3 | 甘肃省陇南市武都区马街乡 | 104°57'05.42" | 33°25'44.26" | 1 874.1 |
| 4 | 甘肃省陇南市武都区郭河乡 | 105°10'21.10" | 33°20'53.35" | 1 860.3 |
| 5 | 甘肃省陇南市武都区郭河乡 | 105°10'47.19" | 33°20'41.83" | 1 900.2 |
| 6 | 甘肃省陇南市武都区鱼龙镇 | 105°08'24.17" | 33°28'17.25" | 2 117.9 |
| 7 | 甘肃省陇南市武都区甘泉乡 | 105°08'07.04" | 33°27'18.88" | 1 839.9 |
| 8 | 甘肃省陇南市武都区龙凤乡 | 105°02'55.71" | 33°24'52.01" | 2 001.2 |
| 9 | 甘肃省宕昌县庞家乡 | 104°16'54.59" | 34°17'39.69" | 2 452.7 |
| 10 | 甘肃省宕昌县城关镇 | 104°23'23.87" | 34°02'47.26" | 1 923.2 |
| 11 | 甘肃省宕昌县将台乡 | 104°23'45.31" | 34°05'21.16" | 1 937.3 |
| 12 | 甘肃省宕昌县车拉乡 | 104°27'43.93" | 34°03'48.97" | 2 332.1 |
| 13 | 甘肃省宕昌县贾河乡 | 104°22'06.68" | 34°05'29.73" | 1 969.6 |
| 14 | 甘肃省宕昌县兴化乡 | 104°33'39.38" | 34°03'04.16" | 1 997.3 |
| 15 | 甘肃省宕昌县临江铺乡 | 104°30'11.72" | 33°57'42.16" | 2 212.9 |

1.2 仪器与试剂

实验用 ISSR-PCR 反应的 10×PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 缓冲液、Taq DNA Polymerase 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; dNTPs 购自科昊生物工程有限责任公司; ISSR-PCR 反应的 40 条引物来源于加拿大哥伦比亚大学公布的引物, 并由 Invitrogen 公司合成; 固体氢氧化钠、硼酸(天津市大茂化学试剂厂); 乙二胺四乙酸二钠(批号 1107315, 上海展云有限公司); Tris 碱(aMResco 公司, 美国)。

85-2 控温磁力搅拌器(金坛市大地自动化仪器厂); TGL-13 电动离心机(2Y-064-1, 美国); DYY-33A 电泳槽(北京市六一仪器厂); DYY-5 电泳仪(北京市六一仪器厂); EPED-10TF 实验室级超纯水器(南京易普易达科技发展有限公司); 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); ASV-3023 全自动高压消毒柜(日本); 荧光 PCR 仪(Icyclerie 公司, 美国); 凝胶成像分析系统(山特电子有限公司, Bio-RAD 公司); BS 224 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

2 方法

2.1 DNA 提取

DNA 提取方法采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。具体方法如下: 取种子适量, 加入液氮充分研磨成粉末状, 称取 30 mg 加入含有 800 μ L Lysis Buffer 的 1.5 mL 离心管中, 于 65 $^{\circ}$ C 下预热, 加入 0.8 μ L β -巯基乙醇, 65 $^{\circ}$ C 水浴 25 min, 期间颠倒混匀样品数次。加入 500 μ L 氯仿, 充分混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 小心吸取上层水相转入一个新的离心管中, 加入 700 μ L Binding Buffer, 充分混匀。将混匀的液体转入离心柱中(可分次转入), 12 000 r/min 离心 1 min。加入 700 μ L Wash Buffer A, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃废液。再加入 700 μ L Wash Buffer B, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃废液。后加入 500 μ L Wash Buffer B, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃废液, 再次 12 000 r/min 离心 2 min, 将离心柱置于新的离心管中, 并打开离心柱盖, 于室温放置 10 min, 至无明显乙醇味。加入 100 μ L 事先 60 $^{\circ}$ C 预热的 TE Buffer, 置于室温 5 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 离心管中即为所提取的基因组 DNA 溶液, 后稀释至 30 ng/ μ L, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量后于 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

2.2 引物筛选

从 40 条引物中, 初步筛选出扩增效果好、稳定性强、条带数较多的引物 9 条, 同时依据各引物的理论退火温度, 在梯度 PCR 仪上随机生成 8 个退火温度(即 52.0、52.8、54.1、55.9、58.4、60.3、61.5、62.0 $^{\circ}$ C), 确定各引物的最佳退火温度, 最终确定本实验所用引物见表 2。

表 2 引物信息

Table 2 Information of primers

| 引物序列 (5'-3') | 理论退火温度/ $^{\circ}$ C | 最佳退火温度/ $^{\circ}$ C |
|--------------------------|----------------------|----------------------|
| 807 (AG) ₈ T | 52.0 | 54.1 |
| 827 (AC) ₈ G | 55.0 | 55.9 |
| 834 (AG) ₈ YT | 55.0 | 55.9 |
| 841 (AG) ₈ YC | 55.0 | 52.8 |
| 855 (AC) ₈ YT | 52.7 | 52.0 |
| 856 (AC) ₈ YA | 52.7 | 52.8 |
| 864 (ATG) ₅ | 40.0 | 54.1 |
| 890 VHV(GT) ₇ | 56.0 | 58.4 |
| 891 HVH(TG) ₇ | 52.0 | 54.1 |

Y=C, T

2.3 PCR 扩增及产物检测

ISSR-PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进行 34 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 后据不同退火温度的引物复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。在含有 EB 的 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳中电泳分离扩增产物, 采用 DNA Marker (DL 2000) 作为相对分子质量标记, 选择的电压为 140 V, 电泳时间为 120 min, 电泳结束后在紫外凝胶成像系统下观察拍照, 并保存。

2.4 数据处理

采用人工读带法, 在琼脂糖凝胶电泳图谱上的每一条带 (DNA 片段) 均为一个分子标记, 并代表 1 个引物的结合位点。根据各分子标记的有无得到所有位点的“0/1”矩阵数据, 同 1 个位点上有带记为 1 (强带及弱带的赋值均为 1), 无带记为 0, 仅记录在实验中可重复稳定出现的条带用于数据分析。“01”矩阵数据统计结束后采用 POPGENE1.32 软件计算多态位点百分率 (PPL)、等位基因数 (number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、Nei's 基因多样性指数 (gene diversity, H)、Shannon's 多态性信息指数 (Shannon's information index, I)、Nei's 基因分化系数

(coefficient of gene differentiation, G_{st})、居群总基因多样性 (total gene diversity, H_t)、居群内基因多样性 (gene diversity with provenances, H_s)、基因流 (estimate of gene flow from G_{st} , N_m)、Nei's 遗传一致度和遗传距离 (D) 等遗传多样性数据, 利用 NTSYS 软件进行 UPGMA 与 PCoA 分析, 采用 Arlequin 3.1 开展分子变异分析 (AMOVA), 运用 structure 2.3.4 软件开展居群结构分析。

3 结果分析

3.1 遗传多样性分析

引物 855、856、891 的扩增结果见图 1, 各引物扩增位点数统计见表 3。9 条引物总共扩增出 173 条条带, 多态性条带数为 126, PPL 为 72.83%, 野生红芪种群的 PPL 在 49.71%~61.85%, 平均 PPL 为 55.78%。PPL 武都居群高于宕昌居群。

野生红芪种群的遗传多样性参数见表 4, 由表 4 可知, 红芪种群的总体物种水平的 N_a 为 1.728 3, N_c 为 1.364 6, H 为 0.224 2, I 为 0.334 5。野生武都居群的遗传多样性参数均高于宕昌居群。说明野生红芪种群的遗传多样性在不同的分布区域具有差异性, 同时暗示野生武都居群的遗传基础较宽, 适应性较好。

野生武都、宕昌居群红芪的遗传分化分析发现, 2 个分布区野生红芪的 H_t 为 0.223 0, H_s 为 0.192 1, G_{st} 为 0.138 9, N_m 为 3.099 4。

为了进一步明确野生武都、宕昌红芪居群间的亲缘关系, 对 2 个居群的遗传距离及遗传一致度做了分析, 发现武都居群与宕昌居群之间的遗传距离为 0.079 5, 遗传一致度为 0.923 6, 说明野生武都红芪居群与宕昌居群的亲缘关系具有一定的差异性。

3.2 UPGMA 聚类分析

UPGMA 分析结果表明 (图 2), 野生红芪居群

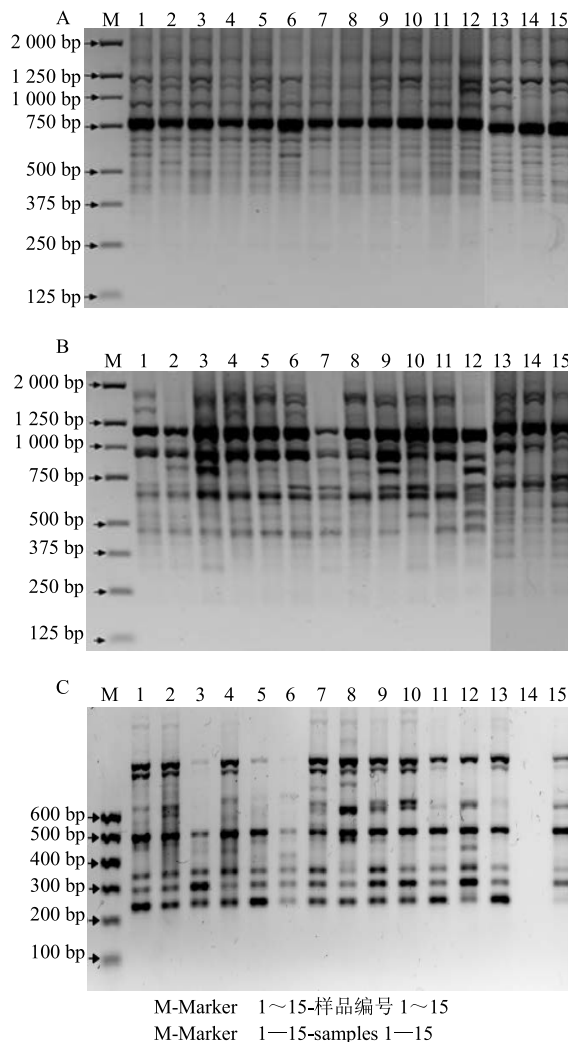


图 1 引物 855 (A)、856 (B)、891 (C) 扩增结果
Fig. 1 Amplification results of primers 855 (A), 856 (B), and 891 (C)

聚为 2 类 (0.74 处), 1、2、7、8、9、10、11、12、13、14、15 聚为第一类 (I), 既有武都居群红芪种质个体, 又包含宕昌居群个体, 同时 I 可分为 2 类 (0.764 处), 1、2、7、8 为 i 类, 均为武都居群个

表 3 9 条引物扩增位点数

Table 3 Amplification sites of nine primers

| 片段大小/bp | 扩增位点数 | | | | | | | 片段大小/bp | 扩增位点数 | |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | 引物 807 | 引物 827 | 引物 834 | 引物 841 | 引物 855 | 引物 856 | 引物 890 | | 引物 864 | 引物 891 |
| >2 000 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | >600 | 10 | 9 |
| 2 000~1 250 | 4 | 3 | 0 | 2 | 5 | 3 | 3 | 600~500 | 2 | 2 |
| 1 250~1 000 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 500~400 | 2 | 3 |
| 1 000~750 | 4 | 4 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 400~300 | 3 | 1 |
| 750~500 | 3 | 5 | 5 | 3 | 4 | 6 | 2 | 300~200 | 0 | 2 |
| 500~375 | 4 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 200~100 | 1 | 0 |
| 375~250 | 3 | 2 | 4 | 2 | 1 | 1 | 4 | <100 | 0 | 0 |
| 250~125 | 2 | 2 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 | | | |
| <125 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 总计 | 173 | | | | | | | | | |

表 4 红芪种质种群遗传多样性参数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Genetic diversity data of germplasm of wild *Hedysari Radix* ($\bar{x} \pm s$)

| 居群 | 个体数 | 多态性位点 | PPL/% | N_a | N_e | H | I |
|------|-----|-------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 武都 | 8 | 107.0 | 61.85 | 1.618 5±0.487 2 | 1.359 5±0.375 2 | 0.210 9±0.197 9 | 0.317 4±0.280 9 |
| 宕昌 | 7 | 86.0 | 49.71 | 1.497 1±0.501 4 | 1.297 1±0.370 2 | 0.173 2±0.198 9 | 0.259 6±0.285 0 |
| 平均 | 7.5 | 96.5 | 55.78 | 1.557 8 | 1.328 3 | 0.192 1 | 0.288 5 |
| 物种水平 | 15 | 126.0 | 72.83 | 1.728 3±0.446 1 | 1.364 6±0.334 7 | 0.224 2±0.179 7 | 0.334 5±0.253 3 |

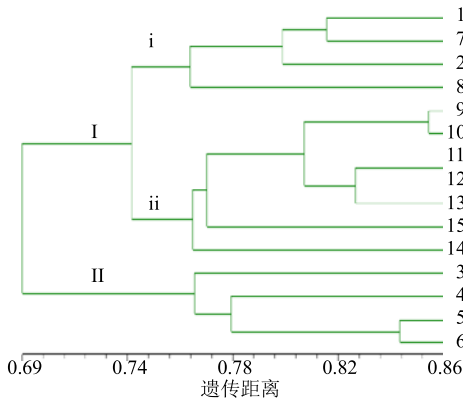


图 2 野生红芪种质居群的 UPGMA 分析

Fig. 2 UPGMA tree based on ISSR data of germplasm of wild *Hedysari Radix*

体, 9、10、11、12、13、14、15 为 ii 类, 均为宕昌居群个体; 3、4、5、6 聚为第 2 类 (II), 均为武都居群的野生红芪种质个体。由此看来, 野生武都居群与宕昌居群并未单独聚为 2 类, 其表现出相互掺杂, 但与居群的地理位置存在一定的相关性。而地理距离与遗传距离的 Mantel-test 相关性检测发现, 在物种水平上遗传距离与地理距离中等程度相关 ($r=0.758 7, P=1.000 0$), 验证了 UPGMA 分析的结果, 表明野生红芪种质居群间的地理距离可能是其遗传分化发生的关键原因。

3.3 PCoA 分析

PCoA 分析结果显示 (图 3), 前 4 个主成分的特征值分别为 0.779 5、0.498 3、0.388 4、0.336 5, 贡献率分别为 21.04%、13.45%、10.49%、9.08%, 占总变差的 54.07%, 显示出红芪的 ISSR 标记在整个红芪种群基因组中的分布情况。PCoA 分析图显示出野生红芪样品呈现出两类的结果, 与 UPGMA 聚类的结果是一致的。

3.4 分子变异分析 (analysis molecular variance, AMOVA)

野生红芪种质种群的分子变异分析结果见表 5, 可知取样野生红芪种质种群间的变异为 16.36%

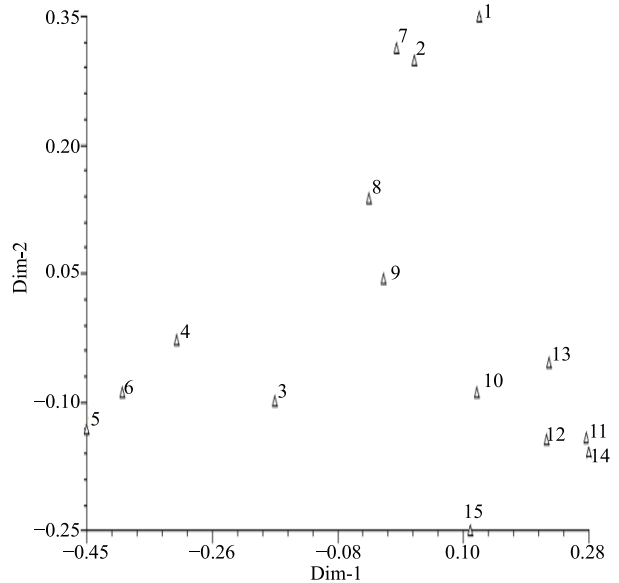


图 3 野生红芪种质居群的 PCoA 分析

Fig. 3 Distribution of 15 wild *Hedysari Radix* genotypes by PCoA analysis

($P<0.01$), 种群内的变异占 83.64% ($P<0.01$), 遗传变异主要发生在种群内。

3.5 居群遗传结构分析

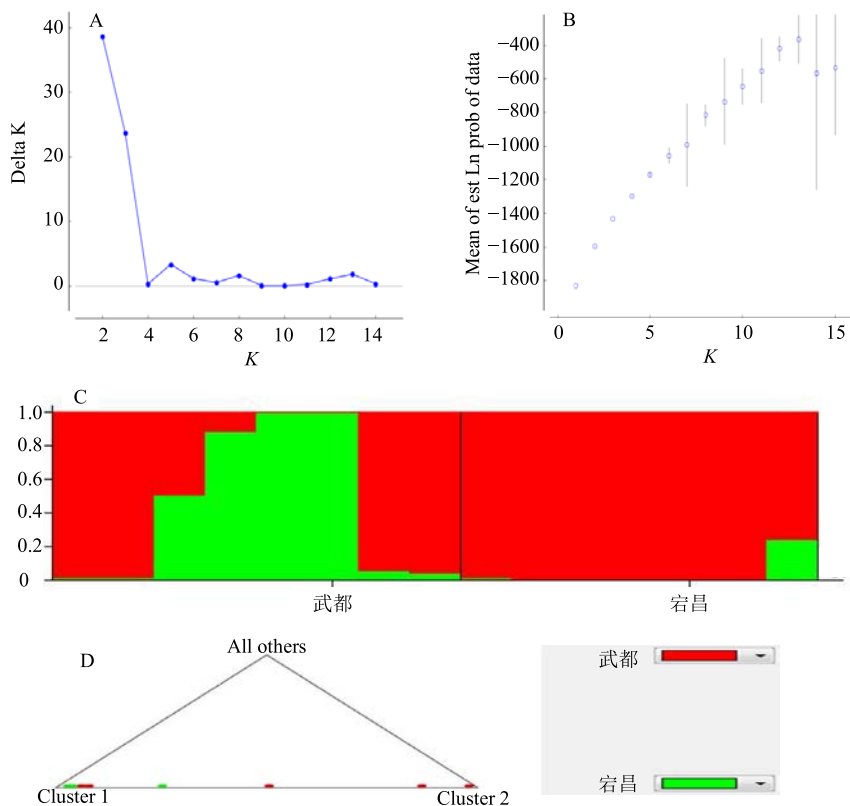
采用 structure 2.3.4 软件分析了 15 份野生红芪种质的种群结构, 结果见图 4。数据处理过程中 Burnin 周期长度为 1×10^5 , MCMC Reps 为 1×10^6 。对野生群体进行模拟, K 值为 1~15, 对每个 K 值重复 20 次。结构分析表明, ΔK 的最高峰揭示了 $K=2$ 的最佳值, 并且将这些种群分成 2 个不同的组, 暗示出 15 个野生红芪种质的遗传结构大致可分为 2 组。从图 4-D 可发现, 当 $K=2$ 时武都居群与宕昌居群并没有完全分开, 此结果与 UPGMA、PCoA 分析结果是一致的。

4 讨论

本实验对野生红芪种质资源的遗传多样性参数及居群结构进行了分析, 9 条引物总共扩增出 173 条条带, 多态性条带数为 126, 多态性比率为 72.83%, 取样野生红芪种群的多态性位点比率为

表 5 野生红芪种质种群的 AMOVA
Table 5 AMOVA of germplasm of wild *Hedysari Radix*

| 变异来源 | 自由度 | 平方和 | 方差分量 | 变异百分比/% | 概率值 |
|------|-----|---------|----------|---------|--------|
| 居群间 | 1 | 50.989 | 4.053 4 | 16.36 | <0.001 |
| 居群内 | 13 | 269.411 | 20.723 9 | 83.64 | <0.001 |
| 总量 | 14 | 320.400 | 24.777 3 | | |



A-在 Structure 分析中假定的不同数量居群的 K 值 B-每个 K 值的估计概率值的中值和方差 C-K=2 的条形图 D-K=2 的三角形图
A-K values for different numbers of populations assumed (K) in the Structure analysis B-median and variance of estimated probability value for each K value
C-bar plot representation for K=2 D-triangle plot representation for K=2

图 4 野生红芪种质种群结构

Fig. 4 Population structure of germplasm of wild *Hedysari Radix*

49.71%~61.85%，平均多态性比率为 55.78%。遗传参数计算结果显示，红芪种群的总体物种水平的 N_a 为 1.728 3, N_e 为 1.364 6, H 为 0.224 2, I 为 0.334 5。Yao 等^[21]研究发现 4 个豆科野生甘草群体 70 个个体中的 H 值和 I 值分别为 0.268 0、0.415 0。Ruisi 等^[22]发现豆科植物 *Hedysarum coronarium* L. 的 36 个自然种群中的 H 和 I 值分别为 0.18 ± 0.18 和 0.29 ± 0.25 。因此，与豆科植物甘草及 *Hedysarum coronarium* L. 遗传参数相比，野生红芪种质种群的遗传多样性水平较高。Huenneke^[23]认为，种群的遗传多样性越高，适应环境变化的能力就越强。所以我们认为野生红芪种质在中国甘肃省武都地区、宕

昌地区具有良好的适应性，在 20 世纪 70 年代出现过的野生红芪资源较大规模的无序采挖事件对野生红芪种质的遗传多样性影响较小。

本实验研究结果显示，多态性比率武都居群高于宕昌居群，野生武都居群的遗传多样性参数均高于宕昌居群，这与武都为“中国红芪之乡”“米仓红芪”的道地性内涵是一致的，也说明武都野生红芪种质居群环境适应性较宕昌居群强，二者之间的亲缘关系在遗传距离及遗传一致度具有一定的差异性。而武都居群的遗传变异较宕昌地区丰富，同时考察武都红芪野生转栽培的历史（约 100 年），推断武都区可能为红芪野生种质的中心产区。

遗传分化分析结果显示, 取样野生红芪种质的 G_{st} 为 0.138 9, 野生红芪种质 13.89% 的遗传分化存在于种群间, 86.11% 的遗传分化存在于种群内, 与野生红芪种质种群的分子变异分析结果是一致的, 而遗传变异存在于野生红芪种质群体内结果与多数多年生植物的遗传多样性研究结果是相似的^[24]。一个物种种群内的遗传多样性越高, 越有益于保护此物种的种质资源^[25]。故此, 在有限的种质资源收集能力及管理策略下, 应该在野生红芪分布区不同的居群之间较多的选取野生红芪种质个体, 以便于有效地管理和保护野生红芪种质资源,

野生红芪种质 N_a 为 3.099 4, 表明野生红芪种质群体间的 $N_a > 1$, 遗传漂变等因素引起的物种遗传多样性下降被基因流有效地抵制了^[26]。其遗传结构体现出遗传分化主要分布于种群内且多年生的特性。

UPGMA、PCoA 与居群结构分析均表明取样野生红芪种质种群可分为 2 类, 呈现出相互掺杂的现状, 并没有严格的按照地理距离的分布格局而分类。具体表现在 I 类可分为 i 类和 ii 类, i 类均为武都居群个体, 表明它们之间亲缘关系较近, 比较地理距离发现 i 类个体之间地理距离也较近; ii 类均为宕昌居群个体, 说明宕昌野生居群的个体之间亲缘关系较近, 比较地理距离发现 ii 类个体之间地理距离也较近; II 类中 4 个个体均为武都居群个体, 表明其个体之间亲缘关系较近, 比较其地理距离发现 II 类中 4 个个体的地理距离也较近, 同时这 4 个个体单独聚为一类, 显示出与 I 类的遗传距离较远, 推测该群体中可能含有较特殊的遗传信息。比较分析上述信息后, 不难发现野生红芪种质资源之间存在的特点为地理距离较近的个体, 其亲缘关系也较近, 出现了上述特点的原因可能是武都宕昌地区山峦叠嶂、沟壑纵横的地理位置阻碍了不同种群间种质资源的基因交流, 这可能也是遗传分化主要分布于种群内的原因之一。此外, Mantel 相关性检测发现, 此种相互掺杂的现状与地理距离呈中等程度的相关性, 因此取样野生红芪种质之间的地理距离可能是野生红芪种质发生遗传分化的主要原因。

综上所述, 取样野生红芪种质具有丰富的遗传多样性, 遗传结构呈现出遗传分化主要发生在种群内与多年生的特点, 遗传距离与地理距离之间存在显著的相关性。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 1985.
- [2] 武都县地方志编纂委员会. 《武都县志》(卷三) [M]. 北京: 生活·读书·新知三联书店, 1998.
- [3] 宕昌县志编纂委员会. 《宕昌县志》[M]. 兰州: 甘肃文化出版社, 1995.
- [4] 岷县志编纂委员会. 《岷县志》[M]. 兰州: 甘肃人民出版社, 1995.
- [5] 陇西县志编纂委员会. 《陇西县志》(1986—2005) [M]. 兰州: 甘肃文化出版社, 2015.
- [6] 潘水站, 李国业. 甘肃省红芪规范化栽培操作规程 [J]. 农业与技术, 2016, 36(19): 99-102.
- [7] 柳小亚, 李继平, 陈心悦, 等. HPLC 同时测定红芪中 8 个活性成分的含量及聚类分析 [J]. 药学学报, 2016, 51(5): 786-791.
- [8] Liu Y, Zhao Y, Chen H, et al. Development of high-performance liquid chromatographic fingerprint for quality analysis of *Hedysari Radix* [J]. *Nat Prod Res* 2013, 27(15): 1398-1403.
- [9] 赵昱波, 陈俊, 许浚, 等. 红芪的化学成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3434-3440.
- [10] Liu J, Hu X G, Yang Q, et al. Comparison of the immunoregulatory function of different constituents in *Radix Astragali* and *Radix Hedysari* [J]. *Biomed Res Inter*, 2010, 2010(1110/7243): 103-105.
- [11] Wang Z Y, Zhang P X, Kou Y H, et al. Hedysari extract improves regeneration after peripheral nerve injury by enhancing the amplification effect [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67921.
- [12] Kou W, Li Y D, Liu K, et al. *Radix Angelicae Sinensis* and *Radix Hedysari* enhance radiosensitivity of 12C6+ radiation in human liver cancer cells by modulating apoptosis protein [J]. *Saudi Medical J*, 2014, 35(9): 945-952.
- [13] Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(7): 422-433.
- [14] Xiao X H, Liu F Q, Yuan H L, et al. An outlook on the authentication of traditional Chinese drug (TCD) by DNA molecular marker [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2003, 31(8): 561-565.
- [15] Sandra C, Maria G, Anna L. Miscanthus: Genetic diversity and genotype identification using ISSR and RAPD markers [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(10): 911-924.
- [16] Wang X M, Hou X Q, Zhang Y Q, et al. Genetic diversity of the endemic and medicinally important plant *rheum officinale* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) Markers [J]. *Inter J Mol Sci*, 2012, 13(3):

- 3900-3915.
- [17] Yang H Q I, An M Y, Gu Z J, *et al.* Genetic diversity and differentiation of *dendrocalamus membranaceus* (Poaceae: Bambusoideae), a declining bamboo species in Yunnan, China, as based on inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis [J]. *Inter J Mol Sci*, 2012, 13(4): 4446-4457.
- [18] Angela R M, David C P, Manuel E, *et al.* Genetic diversity of *Pinus nigra* Arn. populations in southern Spain and northern Morocco revealed by inter-simple sequence repeat profiles [J]. *Inter J Mol Sci*, 2012, 13(5): 5645-5658.
- [19] Wang X M, Yang R, Feng S F, *et al.* Genetic variation in *Rheum palmatum* and *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), two medicinally and endemic species in China using ISSR Markers [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51667.
- [20] 王 笠, 赵志礼, 倪梁红, 等. 基于 ISSR 标记的麻花艽遗传多样性分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(15): 3168-3174.
- [21] Yao H, Zhao Y, Chen D F, *et al.* ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild populations of *Gycyrrhiza uralensis* [J]. *Biol Plant*, 2008, 52(1): 117-120.
- [22] Ruisi P, Siragusa M, Giorgio G D, *et al.* Pheno-morphological, agronomic and genetic diversity among natural populations of *sulla* (*Hedysarum coronarium* L.) collected in Sicily, Italy [J]. *Genet Res Crop Evol*, 2011, 58(2): 245-257.
- [23] Huenneke L F. Ecological implications of genetic variation in plant populations [M]. New York: Oxford University Press, 1991.
- [24] Xing C, Tian Y, Guan F H, *et al.* Evaluation of genetic diversity in *Amygdalus mira* (Koehne) Ricker using SSR and ISSR markers [J]. *Plant Syst Evol*, 2015, 301(3): 1055-1064.
- [25] Tian C J, Lei Y D, Shi S H, *et al.* Genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) populations in northeastern and northwestern China as revealed by ISSR markers [J]. *New Forests*, 2004, 27(3): 229-237.
- [26] 蒋艾平, 姜景民, 刘 军. 天目山不同海拔檫木群体遗传多样性和遗传结构 [J]. *应用生态学报*, 2016, 27(6): 1829-1836.