

云贵地区金铁锁 EST-SSR 遗传多样性分析

邱 芬¹, 雷 瀚¹, 陈 杰², 杨生超³, 白 斌¹, 刘 成¹, 叶 鹏¹, 高丽云¹, 辛培尧^{1*}

1. 西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用教育部重点实验室, 云南 昆明 650224

2. 毕节市中药研究所, 贵州 毕节 551700

3. 云南农业大学 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 分析云贵地区金铁锁 *Psammosilene tunicoides* 遗传多样性和变异情况。方法 采用转录组测序技术开发金铁锁的 EST-SSR 引物, 并利用筛选出的分子标记对金铁锁进行多态性分析。结果 共获得了 17 530 条含 SSR 位点的 EST 序列; 筛选出了 14 对具有较高多态性的 EST-SSR 引物, 对云贵地区的 17 份金铁锁进行多样性分析, 发现其在位点水平上多态性信息含量(PIC) 范围为 0.350 0~0.795 0, 具有较高的多态性; 在群体水平上明显偏低, 多态位点百分率(PPB) 为 64.29%~100%, Nei's 基因多样性指数的范围为 0.188 2~0.477 7, 平均 0.323 2; 云贵地区金铁锁群体内基因流(N_m) 较小(N_m 均值为 0.302 0), 群体间存在较大的遗传分化(Fst 均值为 0.452 9)。结论 转录组测序丰富了金铁锁 EST 数据库; 云贵地区金铁锁的遗传多样性可能与其繁殖方式、分布区较长的进化历史有关, 群体间遗传分化大可能是地理阻隔截断了不同群体间的基因交流。

关键词: 金铁锁; 云贵地区; EST-SSR; 遗传多样性; 多态性信息含量

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3895-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.025

EST-SSR analysis of genetic diversity of *Psammosilene tunicoides* in Yunnan-Guizhou provincial region

QIU Fen¹, LEI Han¹, CHEN Jie², YANG Sheng-chao³, BAI Bin¹, LIU Cheng¹, YE Peng¹, GAO Li-yun¹, XIN Pei-yao¹

1. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine of Bijie, Bijie 551700, China

3. National-Local Joint Engineering Research Center on Gemplasm Innovation & Utilization of Chinese Medicinal Materials in Southwest China, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity and variation of *Psammosilene tunicoides* in Yunnan-Guizhou provincial region. **Methods** The genetic diversity of different populations of *P. tunicoides* with high polymorphism was analyzed by using EST-SSR primers developed from transcriptomic sequencing technique. **Results** A total of 17 530 SSR-containing EST sequences were obtained by transcriptomic sequencing, 14 pairs of polymorphism EST-SSR primers were used to analyze the genetic diversity of 17 populations of *P. tunicoides* in Yunnan-Guizhou region, the results showed that the *P. tunicoides* in different populations had a high level of genetic diversity with the polymorphic information content (PIC) in the range from 0.350 0 to 0.795 0 in locus level; and had a lower value in group level with percentage of polymorphic bands (PPB) of 64.29%—100%. And the range of Nei's genetic similarity coefficient was from 0.188 2 to 0.477 7 with mean value of 0.323 2. The gene flow in *P. tunicoides* in Yunnan-Guizhou region was small with N_m mean value of 0.302 0, and there is a large genetic differentiation between groups with Fst mean value of 0.452 9. **Conclusion** Transcriptomic sequencing enriched *P. tunicoides* EST database. The genetic diversity of *P. tunicoides* might be related to the long evolutionary history of reproductive pattern and distribution area. And there was a highly genetic diversity among the populations of *P. tunicoides* in Yunnan-Guizhou region, it might be that the geographic barrier cut off the genes exchange among different populations.

收稿日期: 2018-02-06

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2016ZZX52); 贵州省科技计划项目(黔科合 SY 字【2015】3027); 西南林业大学科研基金项目(XL21611)

作者简介: 邱 芬(1990—), 女, 硕士, 研究方向为植物遗传育种及繁育。E-mail: 331308230@qq.com

*通信作者 辛培尧(1975—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为林木遗传育种与繁育。

Tel: (0871)63863721 E-mail: xpytgx@163.com

Key words: *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu; Yunnan-Guizhou region; EST-SSR; genetic diversity; polymorphic information content

金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu 为石竹科单属种常用药用植物, 在云南有悠久的药用历史, 主要分布于云南、贵州、四川、西藏等中国西南地区。金铁锁以根入药, 根含有皂苷成分, 并含有三萜化合物及一些氨基酸等化合物, 其结构经过研究鉴定为齐墩果酸型五环三萜化合物, 另外还含有环二肽、环八肽类成分及有机酸, 有较好的镇痛和抗炎作用, 一般用于跌打损伤、风湿痛、胃痛、创伤出血等的治疗^[1], 备受消费者青睐。但野生金铁锁自然资源长期无计划采挖且自然繁殖率低, 加之自然生长条件恶劣及环境条件恶化使金铁锁生态环境遭受严重破坏, 加上金铁锁自身的生理特点导致金铁锁分布范围狭窄, 其居群个体数量大量减少使其濒临灭绝^[2]。1991 年作为稀有濒危物种被列入《中国植物红皮书》第一册, 是国家二级重点保护植物之一^[3-4]。

基于金铁锁自然资源现状, 对金铁锁遗传多样性的研究迫在眉睫。对物种保护措施方案的制定, 需要先对该物种的遗传多样性水平和居群遗传结构有充分的了解^[5]。杨耀文等^[6]通过比较金铁锁 8 个不同居群组培植株的生长量, 发现丽江云杉坪、昆明小墨雨这 2 个居群相对其他居群优势明显, 可作为优良种源。梁南熙^[7]研究了金铁锁 7 个居群的 12 个形态性状, 结果发现, 变异主要存在于居群之间且营养器官性状变异程度大于生殖器官。使用显性分子标记扩增片段长度多态性 (AFLP) 技术对金铁锁居群遗传多样性进行分析, 结果表明金铁锁种内遗传多样性水平丰富, 但居群内的遗传多样性水平相对较低, 在居群间的遗传分化显著^[8]。戴住波等^[9]研究认为, 金铁锁资源保护应着重在不同生态地理居群取样保存上, 优良单株保存为辅助手段, 进而达到全方位保护金铁锁遗传多样性的目的。

在短期内对植物变异性有所了解或在其他研究方法无法开展时, 利用形态性状和成分变异来估测植物变异是最直接和最快速的方法。但植物表型的遗传表达受限于环境条件和基因显隐性等因素的作用。为了更加详尽地理解种群的遗传变异情况, 仅依赖于表型性状并不能达到目的。因此, 还需要利用分子标记对其进行进一步的研究、比较和验证^[10-11]。

EST-SSR 分子标记具有操作简单、多态性高、

信息含量高等优点, 是相对于其他分子标记较理想的研究遗传多样性的手段。杨维泽等^[12]对人参属植物的 EST 序列进行搜索并设计了 48 对引物, 发现利用人参属的 EST 序列开发三七 EST-SSR 标记是可行的。邓科君等^[13]针对 10 种鼠尾草和 13 个不同居群的丹参样品验证丹参 EST 序列开发的 SSR 引物, 发现 EST-SSR 可区分丹参及其他同属植物。陈国庆^[14]利用 NCBI 上的公共数据库开发出了番红花的 ESR-SSR 引物。通过利用 NCBI 上的现有 EST 资源, 已经开发了银杏 *Ginkgo biloba* Linn.^[15]、罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey^[16]、青叶胆 *Swertia mileensis* T. N. Ho et W. L. Shih^[17]、药用菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat^[18]; 还有利用转录组文库的构建开发 EST-SSR 引物, 如地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.^[19]、淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.^[20]、黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.^[21]、沙棘 *Hippophae rhamnoides* Linn.^[22]、连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl^[23]、白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg^[24]。利用 EST-SSR 引物进行性别鉴定也是一个重要的研究方向, 如利用 EST-SSR 引物鉴别药用植物真伪也有很多应用, 如建立指纹图谱, 能有效区别金银花和山银花, 而且还能有效区分河北、山东、河南等地的金银花品种^[25]; 筛选出的 EST-SSR 标记对麦冬近缘沿阶草属和山麦冬属植物进行遗传多样性分析, 发现杭麦冬和川麦冬之间存在明显差异^[26]。

本实验采用 EST-SSR 标记对不同地区、不同居群金铁锁进行分析, 目的是阐明金铁锁不同居群的遗传变异状况及其亲缘关系的远近。研究结果可为金铁锁种质资源的现状评估以及杂交育种亲本的选配提供理论依据。

1 材料

采集金铁锁自然群体时使用 GPS 定位仪 (中国台湾 Garmin 公司) 记录下每个金铁锁自然群体的地理信息 (表 1)。所采集材料, 均由西南林业大学林学院曾觉民教授为金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu。采集完后的样品鲜叶用硅胶干燥, 现存于西南林业大学, 根茎则种植在西南林业大学温室大棚中。

表 1 金铁锁 17 个自然群体的地理位置信息及样本数

Table 1 Geographical information and sample number of 17 natural populations of *P. tunicoides*

编号	群体编号	采集地	样本数	地理坐标		
				经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m
1	XS	贵州省威宁县雪山乡	10	104°09'	26°57'	2 207
2	YWX	贵州省威宁县迤那五星村采石场	17	103°52'	27°06'	2 295
3	MWS	贵州省威宁县麻窝山村	10	103°50'	27°10'	2 384
4	TD	云南省昆明市倘甸乡	15	102°49'	25°55'	2 467
5	SM	云南省昆明市嵩明县	11	103°12'	25°21'	2 057
6	XW	云南省宣威市	20	103°52'	26°14'	2 037
7	KP	云南省迪庆州维西县康普乡	3	99°02'	27°36'	2 750
8	NX	云南省迪庆州香格里拉市尼西乡	13	99°25'	28°01'	3 153
9	FLS	云南省迪庆州德钦县飞来寺	9	98°52'	28°25'	3 416
10	YBT	云南省迪庆州德钦县迎宾台	12	98°55'	28°26'	3 560
11	TA	云南省丽江市太安乡	9	100°04'	26°46'	2 777
12	NL	云南省丽江市宁蒗	7	100°51'	27°21'	2 530
13	JS	云南省丽江市金山乡	10	100°17'	26°54'	2 466
14	HQ	云南省大理州鹤庆县	9	100°08'	26°29'	2 776
15	JC	云南省大理州剑川县	9	99°51'	26°16'	2 290
16	EY	云南省大理州洱源县	10	99°53'	26°10'	2 880
17	DC	云南省昆明市东川区	10	103°11'	25°58'	2 338

2 方法

2.1 转录组测序

选用采自云南省昆明市倘甸乡样品 (TD) 进行转录组测序, 采集 2 年生金铁锁的新鲜幼嫩叶片后用锡箔纸包裹放入液氮中备用。样品总 RNA 的提取采用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, 美国)。提取的 RNA 样品用 DNase I 在 37 °C 条件下消化 30 min, 以除去可能的基因组 DNA 污染, 最终 RNA 浓度与质量由 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, Palo Alto, 美国) 测定。用带有 Oligo (dT) 的磁珠从总 RNA 中富集 Poly (A) mRNA, 加入包含二价阳离子的 mRNA 破碎缓冲液在混匀仪 (Eppendorf, Hamburg, 德国) 中及室温条件下将 mRNA 打断成短片段, 以打断后的这些 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物合成第一条 cDNA 链, 然后添加二链合成反应体系, 将 dTTP 碱基替换为 dUTP, 进行二链反转录, 再使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, California, 美国) 纯化回收这些 cDNA 片段, 接着对 cDNA 片段黏性末端修复, 在加 “A” 反应体系中, 使末端修复的产物 cDNA 的 3' 末端加上 A 碱基, 为接下来的接头连接做准备; 在连接酶反应体系中, 使 cDNA 5' 接头与 A 碱基连接, 回收连接产物; 使用 UDG 酶降解 cDNA 二链; 用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择, 最后进行 PCR 扩增, 构建高质量 cDNA 测序文库。

构建好的 cDNA 文库使用 Illumina HiSeq™

2000 (Illumina, 美国) 测序平台进行双末端测序, 测序工作由华诺公司 (北京) 完成。通过对原始测序图像经 Base Calling 数据转化处理, 获得原始序列 (raw reads), 进一步去除 raw reads 中含有测序接头序列, 摒弃包含未知核苷酸超过 5% reads 和整条 reads 中质量值低于 10 的碱基数超过 20% 的低质量 reads, 从而获得高质量 clean reads, 然后用短 reads 组装软件 Trinity 对这些 clean reads 进行组装, 最终获得具有可变剪接的全长转录子序列。

2.2 群体遗传多样性分析

2.2.1 金铁锁基因组 DNA 提取和检测 选用金铁锁幼嫩叶片, 用试剂盒法 (上海生工生物工程股份有限公司) 提取金铁锁基因组 DNA。金铁锁基因组 DNA 浓度和纯度的检测利用 1% 的琼脂糖电泳凝胶和超微量紫外分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司, NanoDrop 2000)。提取的金铁锁的 DNA 样品稀释到 50 ng/μL 左右后放于 -4 °C 冰箱保存。

2.2.2 EST-SSR 引物合成与筛选 根据转录组测序结果, 筛选出符合条件的 SSR 标记 300 对。将合成 (金唯智公司合成) 的引物干粉离心 30 min, 加入相应体积的 ddH₂O 稀释至 100 μmol/L。

选取来自 4 个地方金铁锁样品 (表 1), 贵州省威宁县雪山乡 (XS)、云南省昆明市嵩明县 (SM)、云南省迪庆州德钦县迎宾台 (YBT)、云南省大理州鹤庆县 (HQ), 每个地方取 2 个样品进行初筛试验。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变

性 45 s, 退火温度因引物而异, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 然后 4 °C 保存。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

将聚丙烯酰胺凝胶筛选出的具有多态性的引物核对编号后送往上海生工生物工程股份有限公司进行荧光引物合成, 在 EST-SSR 引物的端用 6-FAM 进行标记。PCR 产物由上海生工生物工程股份有限公司进行毛细管电泳分析。最终采用软件 GeneMapper V2.2.0 多态性位点分析。

2.2.3 数据分析 利用软件 POPGEN1.32 分析 Hardy-weinberg 平衡, 计算金铁锁群体等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、多态位点百分率 (PPB)、观察杂合度 (H_o)、预期杂合度 (H_e)、Shannon 多样指数 (I)、Nei's 基因多样性指数 (H) 和基因流 (N_m) 等; 利用软件 CERVUS 分析每个位点的多态性信息量 (PIC); 利用软件 NTSYS 2.10 遗传一致度构建 UPGMA 聚类图; 使用加载宏 GenAlEx6.41, 根据每个群体的遗传距离和相对地理距离, 进行 mantel 检测, 进行 PCoA 分析, 检测群体的地理分布是否会导致金铁锁遗传多样性的降低和群体间的分化; 利用 MCMC^[27] 方法评估多态位点的基因数据并建模聚类, 估计最佳群体组群数 (K 值), 采用 Structure 2.3.1 Harvester 进行分析得到数据后, 进一步用 Clumpp 1.1.2 进行数据的整理和分析, 参照 Evanno 等^[28] 的方法确定最佳 K 值, 聚类图通过 Distruct 1.1^[29] 行绘制。

3 结果与分析

3.1 De novo 组装和 Illumina 测序质量评估

通过转录组测序结果分析, 一共获得了 124 465 413 Mb 原始数据, 移除掉冗余和质量较低的序列后, 产生了 94 061 260 Mb 的纯净序列, 利用 Trinity 软件进行无参考基因组拼接并用 CD-HIT 软件进行聚类来获取无冗余高质量的参考基因组, 得到了 77 942 条 Unigenes。利用微卫星识别工具 MISA Perl 脚本对 Unigenes 进行检测, 识别出 21 758 个满足条件的微卫星位点。

3.2 金铁锁 EST-SSR 分布、频率和特点

从 77 942 条, 总长 2.551 Gb 的 Unigenes 序列中发现有 17 530 条含有微卫星位点的 EST 序列, 共检测到 21 758 个微卫星位点, 平均每 100 条 Unigene 序列中出现 27.92 个 SSR, 而且有 3 385 条 EST 序列中含 1 个及以上 SSR 位点。这些数据均表明金铁锁 EST 序列中含有数量丰富的 SSR 位点。这些 SSR

位点中出现频率最高的重复基序类型为三核苷酸 (67.99%), 其次是二核苷酸 (25.42%), 接下来依次为四核苷酸 (2.74%)、六核苷酸 (2.35%) 以及五核苷酸 (1.49%)。

3.3 EST-SSR 标记筛选

本研究用合成的 300 对 SSR 对来自 4 个不同地方的 8 个金铁锁样品进行标记分析, 结果有 84 对标记能扩增出清晰且单一谱带。对 84 对引物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳复筛发现其中 20 对具有多态性。将具有多态性的 20 对 SSR 标记合成荧光引物后对受试材料 (4 个自然群体共 16 份样品) 进行标记分析, 其中 14 对 SSR 标记 (表 2) 的 N_a 为 2~5 个; H_o 平均值为 0.063~1.000; 位点的 H_e 平均值为 0.203~0.586 (表 3); 表明这 14 对标记具有丰富的多态性。

3.4 云贵地区金铁锁群体遗传多样性

应用 14 对 SSR 标记对 184 个样品进行标记分析, 结果如表 4 所示。样品的 N_a 为 3 (J168、J179、J251、J284)~12 个 (J255、J263), 17 个群体在 14 个微卫星位点上共发现 85 个 N_a , 平均每个位点有 6.071 4 个 N_a , 表现出较高的多态性。 N_e 为 1.589 2 (J168)~5.509 1 个 (J255), 平均值为 6.071 4 个。 I 为 0.764 5 (J168)~1.94 55 (J255), 平均值为 1.158 0 个。金铁锁 14 个位点的 I 有 7 个大于 1 (J190、J196、J255、J263、J265、J274、J281), 表明这些引物很适合检查群体的遗传多样性。

金铁锁的 H_o 的范围为 0.081 5 (J168)~1.000 0 (J196), 平均值为 0.276 5。 H_e 为 0.371 8 (J168)~0.820 7 (J255), 平均值为 0.596 3。除了位点 J196, 其他均存在杂合子缺失的情况。金铁锁的群体多样性水平的高低与 H_o 呈正相关关系, 属于遗传多样性高的水平。

H 为 0.370 8 (J168)~0.818 5 (J255), 平均值为 0.540 7。PIC 的范围为 0.350 0~0.795 0, 表明金铁锁群体内个体间变异较大, 具有丰富的遗传性。其中有 7 个位点 (J190、J196、J255、J263、J265、J278、J281) 的多态性较高 ($PIC > 0.5$), 7 个位点 (J103、J168、J179、J217、J251、J266、J284) 的多态性中等 ($0.25 < PIC < 0.5$), 表明在位点水平上, 金铁锁群体的多态性较高。

金铁锁 17 个群体遗传多样性的参数见表 5, 17 个群体的 N_a 范围从 1.857 1 (太安乡)~3.000 0 个 (洱源), 平均数为 2.441 2 个。 N_e 的范围为 1.293 1 (金山

表 2 金铁锁 14 对 EST-SSR 引物信息

Table 2 Fourteen pairs of EST-SSR primer information in *P. tunicoides*

编号		引物序列 (5'→3')	重复碱基	等位基因大小/bp	退火温度/℃
J103	F	AAAATGGGTGAAGAGGAGCC	(TCT) ₇	211	60
	R	GACTAGGGGTTTCAAGGCAA			
J168	F	AGCCACCATATTCATACGCC	(CAA) ₈	238	60
	R	TTCGAGAGACGAAAGACGGT			
J179	F	ATCATTTGCACAAAACGCG	(GGT) ₈	213	60
	R	CCGTCAAAGAATGACTGGCT			
J190	F	ATTCTTCAATTCAATGCGGC	(CAA) ₆	228	60
	R	GGGGATGAAGTTGCTGAAAA			
J196	F	CAAAAACATGGCAATGATGC	(TCA) ₈	207	60
	R	GGCCTGGAATTACCAAAAGA			
J217	F	CAGCACTAGGGTGGACACAA	(ACC) ₅	219	60
	R	TGAAGGGCTGGGTAGATGAC			
J251	F	CCCATACCACCACTTGATCC	(CAC) ₅	206	60
	R	TCCGAACCTAAAACCATCGG			
J255	F	CCCCGAATACATTGTGAAGC	(TC) ₁₄	244	60
	R	TTCAAATTCGGGACCCATA			
J263	F	CCCTGCGACAAATGTTACCT	(AT) ₇	209	60
	R	AGCTGCTGTCTTGATTATGGA			
J265	F	CCGAGAACGCTTCGTAATTC	(TC) ₈	220	60
	R	CAAGCATGCGCAACCTATAA			
J266	F	CCGTACTTATTAGGGCCACG	(CT) ₆	221	59
	R	TGGATGTTGAGACGACGAAG			
J271	F	CCTCCACATTTTCTCCCTTTC	(AACA) ₆	220	60
	R	TCATGAGGTGGTTGTGCTTC			
J281	F	CGAGAATCTTCGAAAACGAG	(TGA) ₈	245	60
	R	TTCTTTCAGCAGCTACACCA			
J284	F	CGCAGAAAAGCTTCATTTCC	(TCT) ₅	243	60
	R	TGATGAACAGGCTTCTCACG			

表 3 金铁锁 4 个群体与 14 对 EST-SSR 引物遗传多样性统计

Table 3 Genetic diversity of four populations and 14 pairs of EST-SSR primers in *P. tunicoides*

位点	XS (n=4)			SM (n=4)			YBT (n=4)			HQ (n=4)			<i>N_a</i> 总计	平均值	
	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>		<i>H_o</i>	<i>H_e</i>
J103	2	0.250	0.219	2	0.500	0.375	2	0.500	0.375	2	0.250	0.219	2	0.375	0.297
J168	2	0.250	0.219	1	0.000	0.000	2	0.250	0.219	2	0.000	0.375	2	0.125	0.203
J179	2	0.250	0.219	2	0.250	0.219	2	0.500	0.375	2	0.000	0.500	2	0.250	0.328
J190	2	0.000	0.375	2	0.000	0.375	3	0.250	0.594	3	0.250	0.594	3	0.125	0.484
J196	3	1.000	0.594	2	1.000	0.500	4	1.000	0.656	3	1.000	0.594	4	1.000	0.586
J217	2	1.000	0.500	2	1.000	0.500	3	0.500	0.406	1	0.000	0.000	3	0.625	0.352
J251	2	0.250	0.219	1	0.000	0.000	2	0.500	0.375	2	0.250	0.219	2	0.250	0.203
J255	2	0.250	0.219	1	0.000	0.000	5	0.500	0.781	2	0.250	0.219	5	0.250	0.305
J263	1	0.000	0.000	3	0.250	0.531	2	0.250	0.219	2	0.000	0.375	3	0.125	0.281
J265	2	0.000	0.375	1	0.000	0.000	2	0.250	0.469	2	0.250	0.219	2	0.125	0.266
J266	2	0.000	0.375	2	0.250	0.219	2	0.250	0.219	2	0.250	0.219	2	0.188	0.258
J271	2	0.250	0.219	2	0.250	0.219	3	0.500	0.594	2	0.250	0.219	3	0.313	0.313
J281	2	0.250	0.219	1	0.000	0.000	2	0.000	0.375	3	0.000	0.625	2	0.063	0.305
J284	1	0.000	0.000	2	0.250	0.219	2	0.250	0.219	2	0.000	0.375	2	0.125	0.203

表 4 金铁锁 14 个位点多样性信息

Table 4 Fourteen locus diversity information of *P. tunicoides*

位点	样本数	N_a	N_e	I	H_o	H_e	H	PIC
J103	366	5	2.129 7	0.814 0	0.163 9	0.531 9	0.530 4	0.420 0
J168	368	3	1.589 2	0.764 5	0.081 5	0.371 8	0.370 8	0.350 0
J179	364	3	2.319 4	0.938 9	0.175 8	0.570 4	0.568 8	0.490 0
J190	366	9	3.961 1	1.595 4	0.229 5	0.749 6	0.747 5	0.711 0
J196	368	9	3.249 1	1.523 6	1.000 0	0.694 1	0.692 2	0.661 0
J217	366	4	1.894 0	0.854 9	0.628 4	0.473 3	0.472 0	0.417 0
J251	368	3	2.036 0	0.871 6	0.233 7	0.510 2	0.508 8	0.451 0
J255	368	12	5.509 1	1.945 5	0.337 0	0.820 7	0.818 5	0.795 0
J263	350	12	2.476 6	1.278 7	0.200 0	0.597 9	0.596 2	0.552 0
J265	368	5	2.818 4	1.270 3	0.168 5	0.646 9	0.645 2	0.602 0
J266	368	6	1.897 2	0.904 8	0.146 7	0.474 2	0.472 9	0.421 0
J271	368	6	3.046 0	1.338 9	0.222 8	0.673 5	0.671 7	0.628 0
J281	368	5	3.364 4	1.278 1	0.119 6	0.704 7	0.702 8	0.644 0
J284	366	3	2.116 1	0.832 2	0.163 9	0.528 9	0.527 4	0.429 0
平均值	366	6.071 4	2.743 3	1.158 0	0.276 5	0.596 3	0.540 7	0.420 0

表 5 金铁锁自然群体的遗传多样性信息 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Genetic diversity information of natural populations of *P. tunicoides* ($\bar{x} \pm s$)

居群	样本数	N_a	N_e	I	H_o	H_e	H	多态位点数	PPB/%
XS	10	2.428 6 $\pm$ 0.137 3	1.524 4 $\pm$ 0.118 7	0.506 3 $\pm$ 0.067 6	0.272 2 $\pm$ 0.084 0	0.298 8 $\pm$ 0.046 0	0.298 0 $\pm$ 0.172 0	14	100.00
YWX	17	2.428 6 $\pm$ 0.172 7	1.775 4 $\pm$ 0.116 9	0.646 8 $\pm$ 0.060 5	0.235 3 $\pm$ 0.090 0	0.405 8 $\pm$ 0.037 1	0.405 8 $\pm$ 0.138 8	14	100.00
MWS	10	2.857 1 $\pm$ 0.205 9	1.762 5 $\pm$ 0.113 6	0.703 2 $\pm$ 0.059 2	0.400 0 $\pm$ 0.074 1	0.405 4 $\pm$ 0.033 1	0.405 4 $\pm$ 0.124 0	14	100.00
TD	15	2.428 6 $\pm$ 0.388 2	1.428 5 $\pm$ 0.132 5	0.413 3 $\pm$ 0.105 2	0.272 6 $\pm$ 0.094 5	0.229 8 $\pm$ 0.059 2	0.229 8 $\pm$ 0.221 7	10	71.43
SM	11	2.071 4 $\pm$ 0.221 5	1.397 1 $\pm$ 0.112 9	0.383 9 $\pm$ 0.085 5	0.257 6 $\pm$ 0.088 1	0.228 7 $\pm$ 0.053 8	0.228 7 $\pm$ 0.201 3	11	78.57
XW	20	2.428 6 $\pm$ 0.250 6	1.423 7 $\pm$ 0.101 1	0.444 6 $\pm$ 0.068 9	0.253 6 $\pm$ 0.082	0.257 6 $\pm$ 0.044 3	0.257 6 $\pm$ 0.165 9	14	100.00
KP	3	1.928 6 $\pm$ 0.164 6	1.504 6 $\pm$ 0.119 1	0.454 5 $\pm$ 0.080 9	0.333 3 $\pm$ 0.085 6	0.285 7 $\pm$ 0.050 7	0.285 7 $\pm$ 0.189 8	11	78.57
NX	13	2.428 6 $\pm$ 0.271 6	1.635 5 $\pm$ 0.176 1	0.526 6 $\pm$ 0.101 9	0.291 2 $\pm$ 0.073 1	0.308 5 $\pm$ 0.059 9	0.305 8 $\pm$ 0.224 1	13	92.86
FLS	9	2.285 7 $\pm$ 0.163 4	1.629 5 $\pm$ 0.156 1	0.528 6 $\pm$ 0.089 7	0.333 3 $\pm$ 0.074 6	0.317 5 $\pm$ 0.057 1	0.317 5 $\pm$ 0.213 5	13	92.86
YBT	12	2.785 7 $\pm$ 0.317 6	1.838 6 $\pm$ 0.226 3	0.632 0 $\pm$ 0.118 6	0.297 6 $\pm$ 0.072 4	0.357 1 $\pm$ 0.065 0	0.357 1 $\pm$ 0.243 2	13	92.86
TA	9	1.857 1 $\pm$ 0.231 0	1.427 6 $\pm$ 0.160 9	0.362 7 $\pm$ 0.102 7	0.095 2 $\pm$ 0.070 7	0.215 6 $\pm$ 0.060 2	0.215 6 $\pm$ 0.225 3	9	64.29
NL	7	2.357 1 $\pm$ 0.225 0	1.689 3 $\pm$ 0.137 4	0.590 2 $\pm$ 0.088 9	0.295 9 $\pm$ 0.089 2	0.355 0 $\pm$ 0.052 6	0.355 0 $\pm$ 0.196 8	12	85.71
JS	10	2.142 9 $\pm$ 0.142 9	1.293 1 $\pm$ 0.096 4	0.337 9 $\pm$ 0.062 7	0.157 1 $\pm$ 0.066 9	0.188 2 $\pm$ 0.041 0	0.188 2 $\pm$ 0.153 2	13	92.86
HQ	9	2.357 1 $\pm$ 0.132 9	1.626 4 $\pm$ 0.133 9	0.541 8 $\pm$ 0.079 9	0.175 6 $\pm$ 0.070 5	0.328 8 $\pm$ 0.053 5	0.328 8 $\pm$ 0.200 0	14	100.00
JC	9	2.857 1 $\pm$ 0.274 5	2.056 5 $\pm$ 0.161 8	0.799 5 $\pm$ 0.076 2	0.411 7 $\pm$ 0.063 5	0.477 7 $\pm$ 0.037 5	0.477 7 $\pm$ 0.140 2	14	100.00
EY	10	3.000 0 $\pm$ 0.363 1	2.114 5 $\pm$ 0.267 9	0.765 5 $\pm$ 0.120 4	0.419 0 $\pm$ 0.087 8	0.435 8 $\pm$ 0.063 9	0.435 8 $\pm$ 0.239 1	12	85.71
DC	10	2.857 1 $\pm$ 0.231 0	1.748 2 $\pm$ 0.106 6	0.692 2 $\pm$ 0.060 3	0.285 7 $\pm$ 0.061 0	0.402 5 $\pm$ 0.033 0	0.402 5 $\pm$ 0.123 3	14	100.00
平均值	10.823	2.441 2 $\pm$ 0.060 2	1.637 9 $\pm$ 0.038 0	0.548 8 $\pm$ 0.022 1	0.281 6 $\pm$ 0.091 2	0.323 4 $\pm$ 0.013 0	0.323 2 $\pm$ 0.186 6	13	90.34

乡)~2.114 5 个(洱源),平均数为 1.637 9 个。 I 的范围从 0.337 9(金山乡)~0.799 5(洱源),平均数为 0.548 8,所有群体的多样性指数均小于 1。 H_o 的范围 0.157 1(金山)~0.419 0(洱源),平均数为 0.286 1。 H_e 的范围为 0.188 2(金山乡)~0.477 7(洱源),平均数为 0.323 4;其中倘甸、康普、飞来寺 3 个居群的 H_o 大于 H_e 。 H 的范围为 0.188 2~0.477 7,

平均数为 0.323 2。 H 结果表明金铁锁各居群的遗传多样性低。PPB 在 64.29%~100.00%,其中雪山乡、采钢厂、麻窝山村、宣威、鹤庆、剑川、东川群体的 PPB 较高,为 100.00%,倘甸、嵩明、康普乡、尼西、飞来寺、迎宾台、太安、宁蒗、金山乡、洱源的 PPB 一般为 $0.5 < \text{PPB} < 1$ 。不同居群间的遗传参数差异明显,在居群水平上,金铁锁各居群存在一

定遗传多样性, 且不同居群水平不同。

利用 POPGENE 对金铁锁 17 个群体的 14 个 SSR 位点进行 Hardy-Weinberg 平衡的 χ^2 检验 (P 值), 结果显示 (表 6), 在金铁锁 17 个群体的 14 个 SSR 位点共 238 个组合中, 有 52 个组合 $P < 0.01$, 有 23 个组合 $P < 0.05$, 共占比 31.51%, 显著偏离哈温平衡;

还有 163 个组合符合哈温平衡, 占比 68.49%, 表明金铁锁群体基本符合 Hardy-Weinberg 平衡。居群水平上, 各居群间偏离 Hardy-Weinberg 平衡的位点存在差异 ($P < 0.05$), 最少 1 个, 最多 12 个, 其中采石场 (YWX) 居群最多 (12 个), 康普乡 (KP) 的金铁锁居群最少, 出现了 1 个。

表 6 金铁锁 17 个群体的 14 个位点 Hardy-Weinberg 检验
Table 6 Hardy-Weinberg test of 14 loci in 17 populations of *P. tunicoides*

位点	P 值																
	XS	YWX	MWS	TD	SM	XW	KP	NX	FLS	YBT	TA	NL	JS	HQ	JC	EY	DC
J103	0.808 4	0.000 0	0.502 3	—	—	0.769 9	1.000 0	0.834 8	0.796 3	1.000 0	—	0.567 3	1.000 0	1.000 0	0.325 1	0.900 6	0.009 5
J168	1.000 0	0.001 5	0.029 3	0.000 0	—	0.003 2	—	1.000 0	—	—	—	—	—	0.000 7	0.000 7	—	0.309 0
J179	0.977 8	0.111 1	0.007 5	—	0.044 2	0.869 4	1.000 0	—	1.000 0	0.984 2	0.001 2	0.000 7	0.000 0	0.002 3	0.572 7	0.931 3	0.808 4
J190	0.005 1	0.009 0	0.813 4	1.000 0	0.345 6	0.869 4	1.000 0	0.128 6	0.796 3	0.064 3	0.000 0	0.179 9	0.000 3	0.027 5	0.104 7	0.132 6	0.005 1
J196	0.029 3	0.001 1	0.532 1	0.002 9	0.018 6	0.004 2	0.572 4	0.285 1	0.046 0	0.357 5	0.238 1	0.111 6	0.029 3	0.046 0	0.046 0	0.532 1	0.173 6
J217	0.029 3	0.001 1	0.029 3	0.000 2	0.001 6	0.000 4	0.157 3	0.957 8	0.311 2	0.637 3	—	0.014 3	0.996 3	1.000 0	0.796 3	—	0.655 9
J251	1.000 0	0.000 3	0.655 9	—	—	0.869 4	1.000 0	0.576 6	0.464 5	0.827 3	1.000 0	0.954 8	0.808 4	0.796 3	0.302 9	0.435 9	0.745 3
J255	0.996 3	0.000 0	0.977 8	0.008 7	0.096 2	0.000 0	1.000 0	0.042 6	0.182 5	0.000 1	0.000 7	0.030 8	1.000 0	0.912 8	0.960 7	0.670 4	0.171 4
J263	1.000 0	0.000 0	0.571 7	1.000 0	0.071 4	0.000 0	—	0.586 0	0.009 4	0.984 2	0.000 0	0.000 3	0.017 5	0.000 0	0.877 4	0.000 7	0.146 1
J265	0.007 0	0.000 0	0.121 6	1.000 0	1.000 0	0.002 8	0.020 9	0.834 8	0.857 3	0.014 9	—	—	1.000 0	1.000 0	0.631 1	0.404 7	0.198 7
J266	0.009 5	0.000 0	0.000 3	0.058 3	0.818 5	0.769 9	1.000 0	0.834 8	0.796 3	0.827 3	0.000 0	0.000 0	1.000 0	1.000 0	0.632 6	0.000 9	0.029 3
J271	0.808 4	0.000 3	0.253 4	—	0.818 5	0.769 9	0.149 0	0.566 3	0.383 3	0.685 6	0.000 0	0.763 0	1.000 0	1.000 0	0.641 5	0.929 7	0.000 2
J281	0.068 8	0.034 5	0.128 5	0.967 6	1.000 0	0.000 1	1.000 0	0.000 1	1.000 0	0.000 3	—	0.763 0	0.000 6	0.000 0	0.001 2	0.171 4	0.000 3
J284	0.025 7	0.748 0	0.655 9	0.194 3	1.000 0	0.869 4	—	1.000 0	1.000 0	0.827 3	0.025 7	0.056 5	1.000 0	0.011 9	0.912 8	0.179 4	0.009 5

3.5 聚类分析

根据金铁锁群体的遗传距离和遗传相似系数显示 (表 7), 金铁锁的遗传相似系数处于 0.369 0~0.934 7, 遗传距离处于 0.067 6~0.997; 其中 MWS 和 YWX 之间的遗传相似系数最大, 遗传距离最小, 表明麻窝山 (MWS) 和五星村 (YWX) 之间的遗传差异较小; 飞来寺 (FLS) 和麻窝山 (MWS) 之间的遗传相似系数最小, 遗传距离最大, 表明飞来寺 (FLS) 和麻窝山 (MWS) 之间的遗传差异较大。根据遗传一致度构建根据聚类分析结果 (图 1), 以 0.618 为阈值, 大致将 17 个居群分为 3 类, 倘甸 (TD)、宣威 (XW)、嵩明 (SM) 距离较近, 归为一类; 雪山乡 (XS)、五星村 (YWX)、麻窝山 (MWS) 归为一类; 居群康普 (KP)、尼西 (NX)、飞来寺 (FLS)、迎宾台 (YBT)、太安 (TA)、宁蒗 (NL)、金山乡 (JS)、鹤庆 (HQ)、洱源 (EY) 归为一类;

剑川 (JC) 单归为一类。

根据金铁锁自然分布的地理距离和遗传距离进行主相关的 PCoA 分析, 结果见图 2, 其中主坐标 1 和 2 的贡献率分别为 32.68% 和 18.06%, 由此得到主坐标散点图, 将金铁锁的 17 个群体大致分为 3 类, 其中 XS、YWX、MWS、DC 的亲缘关系较近, 归为一类; TD、SM、XW 的亲缘关系较近, 归为一类; 而 KP、NX、FLS、YBT、TA、NL、JS、HQ、JC、EY 的亲缘关系较近, 也归为一类。PCoA 聚类图与利用 NTSYS 软件和 UPGMA 遗传相似, 与 Structure 2.3.1 根据材料所划分的 3 个居群基本一致。

根据聚类的结果发现, 地理位置靠近的群体之间的遗传距离也比较近, 计算采样点的经纬度, 利用 GPSCACL 软件, 得出了采样点间两两之间的相对距离, 做出相对距离矩阵。得到群体之间的地理

表 7 金铁锁 17 个群体间 Nei's 遗传相似系数 (对角线上方) 和遗传距离 (对角线下方)

Table 7 Nei's genetic similarity coefficient (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among 17 populations of *P. tunicoides*

群体	XS	YWX	MWS	TD	SM	XW	KP	NX	FLS	YBT	TA	NL	JS	HQ	JC	EY	DC
XS	****	0.900 6	0.822 3	0.517 4	0.429 7	0.441 4	0.471 8	0.407 6	0.412 3	0.413 2	0.451 3	0.483 0	0.390 5	0.417 4	0.391 0	0.394 7	0.716 0
YWX	0.104 7	****	0.934 7	0.532 0	0.534 4	0.437 9	0.464 9	0.382 2	0.395 9	0.431 4	0.482 6	0.468 5	0.510 6	0.504 3	0.411 6	0.417 3	0.708 9
MWS	0.195 6	0.067 6	****	0.568 4	0.533 8	0.482 7	0.484 1	0.385 6	0.382 1	0.450 3	0.452 9	0.399 1	0.498 1	0.462 5	0.382 3	0.377 7	0.676 8
TD	0.659 0	0.631 0	0.565 0	****	0.681 0	0.725 5	0.590 4	0.475 6	0.520 4	0.603 5	0.531 3	0.467 3	0.652 0	0.612 3	0.369 0	0.470 2	0.421 7
SM	0.844 6	0.626 6	0.627 8	0.384 2	****	0.741 1	0.576 0	0.556 7	0.520 9	0.632 1	0.535 7	0.493 6	0.742 6	0.739 2	0.440 8	0.587 2	0.447 9
XW	0.817 8	0.825 7	0.728 4	0.320 9	0.299 6	****	0.624 5	0.537 5	0.547 4	0.640 4	0.494 7	0.414 7	0.618 6	0.632 8	0.412 9	0.463 1	0.397 6
KP	0.751 1	0.765 9	0.725 5	0.527 0	0.551 7	0.470 8	****	0.840 5	0.891 3	0.899 6	0.709 5	0.578 8	0.711 3	0.745 2	0.470 3	0.679 7	0.431 9
NX	0.897 6	0.961 8	0.953 0	0.743 2	0.585 8	0.620 9	0.173 8	****	0.843 6	0.908 9	0.761 2	0.632	0.684 8	0.776 6	0.517 6	0.762 0	0.459 0
FLS	0.886 0	0.926 7	0.962 0	0.653 1	0.652 2	0.602 5	0.115 0	0.170 1	****	0.897 4	0.704 4	0.633 9	0.742 9	0.741 0	0.532 2	0.733 7	0.394 9
YBT	0.883 8	0.840 7	0.797 8	0.504 9	0.458 7	0.445 7	0.105 8	0.095 5	0.108 3	****	0.776 3	0.634 2	0.748 6	0.863 4	0.486 6	0.755 0	0.434 6
TA	0.795 6	0.728 5	0.792 0	0.632 4	0.624 2	0.703 9	0.343 2	0.272 9	0.350 4	0.253 2	****	0.718 9	0.745 7	0.774 3	0.426 8	0.730 3	0.462 0
NL	0.727 8	0.758 1	0.918 5	0.760 9	0.706 0	0.880 2	0.546 9	0.458 8	0.455 8	0.455 4	0.330 1	****	0.604 9	0.705 8	0.477 2	0.648 8	0.439 3
JS	0.940 3	0.672 1	0.697 0	0.427 7	0.297 7	0.480 2	0.340 6	0.378 7	0.297 2	0.289 6	0.293 4	0.502 6	****	0.833 1	0.553 9	0.710 5	0.540 5
HQ	0.873 8	0.684 7	0.771 0	0.490 5	0.302 2	0.457 6	0.294 1	0.252 8	0.299 7	0.146 9	0.255 7	0.348 4	0.182 7	****	0.529 8	0.766 8	0.535 3
JC	0.939 0	0.887 6	0.961 5	0.997 0	0.819 1	0.884 7	0.754 3	0.658 6	0.630 8	0.720 3	0.851 4	0.739 9	0.590 8	0.635 3	****	0.680 0	0.468 1
EY	0.929 7	0.873 9	0.973 8	0.754 7	0.532 3	0.769 7	0.386 1	0.271 8	0.309 7	0.281 0	0.314 4	0.432 6	0.341 9	0.265 5	0.385 7	****	0.505 3
DC	0.334 1	0.344 1	0.390 4	0.863 4	0.803 3	0.922 3	0.839 6	0.778 6	0.929 1	0.833 3	0.772 2	0.822 6	0.615 3	0.624 9	0.759 1	0.682 6	***

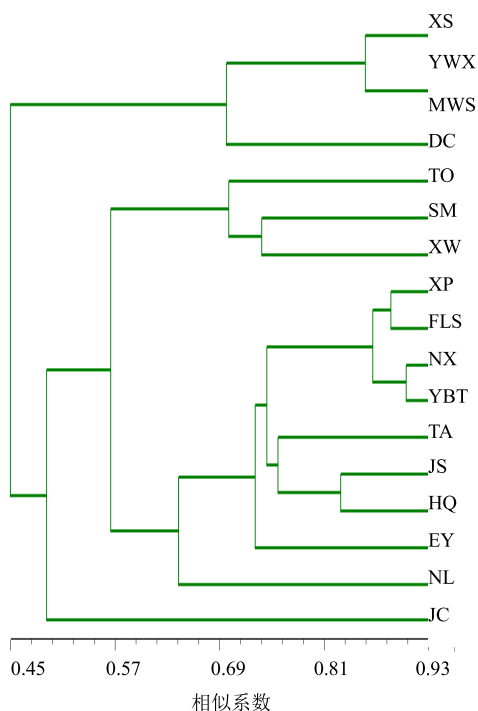


图 1 金铁锁 17 个自然群体聚类分析

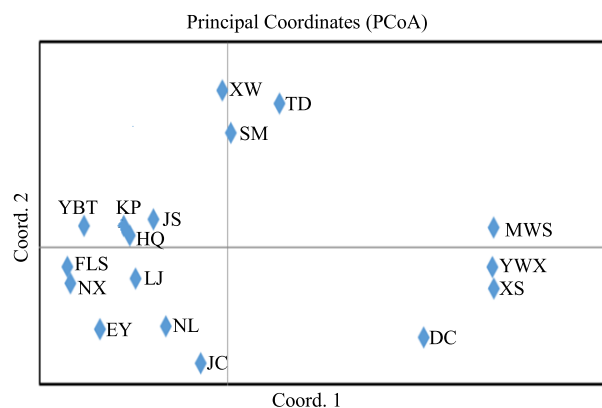
Fig. 1 Cluster analysis of 17 natural populations in *P. tunicoides*

图 2 基于地理距离和遗传距离的二维聚类图

Fig. 2 Two-dimensional clustering based on geographical distance and genetic distance

距离和遗传距离后, 利用 GenAlEx 进行 Mantel 检验, 结果如图 3 所示, $r=0.336$, $P<0.001$, 17 个群体之间的遗传距离和地理距离呈正相关, 金铁锁的遗传距离受到地理距离的影响, 地理距离较近的群体之间的遗传距离较近, 反之, 地理距离较远的群体之间的遗传距离较远。

3.6 群体遗传结构

对金铁锁的群体结构进行分析(表 8),亚群体内固定系数(F_{is})表示在群体内非随机配对的情况下,杂合度偏离哈温平衡理论值的程度。在金铁锁的群体中平均值 $F_{is}=0.132\ 6$ ($F_{is}>0$),说明杂合子不足。只有 3 个位点(J196、J217、J251)出现

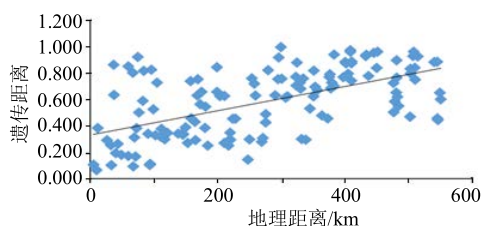


图 3 Mantel 检测距离和遗传地理距离的相关性

Fig. 3 Correlation of Mantel detection distance and genetic geographic distance

杂合子过剩的情况($F_{is}<0$)。亚总群体内固定系数(F_{it})在 $-0.459\ 1\sim0.811\ 5$,均值为 $0.525\ 4$ 。

群体间遗传分化系数(F_{st})均值为 $0.452\ 9$,范围在 $0.121\ 5\sim0.590\ 3$,当 $F_{st}>0.25$ 时,群体间存在显著遗传分化,在金铁锁 14 个位点中,只有一个为高度分化位点 J217 ($0.15\sim0.25$),一个为中度分化的位点 J196 ($0.05\sim0.15$),其他的均为极高分化位点。

群体内的遗传分化大于群体间的遗传分化,金铁锁的 N_m 平均值为 $0.302\ 0$ ($N_m<1$)说明群体间的基因流较小,低水平的基因流可能是导致金铁锁群体间产生较大遗传分化的原因,不过出现了一个位点 J196 的 N_m 值大于 1 的状况。

在图 4 中,利用 Structure 2.3.1 软件,基于数学模型分析由 184 份材料构成的自然群体的遗传结

表 8 F 统计检验

Table 8 F -statistic analysis

位点	样本大小	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
J103	366	0.092 9	0.628 3	0.590 3	0.173 5
J168	368	0.656 2	0.775 8	0.347 9	0.468 5
J179	364	0.356 0	0.678 1	0.500 1	0.249 9
J190	366	0.398 7	0.678 6	0.465 5	0.287 0
J196	368	-0.649 4	-0.449 1	0.121 5	1.808 4
J217	366	-0.684 7	-0.297 8	0.229 7	0.838 5
J251	368	-0.020 6	0.501 3	0.511 4	0.238 9
J255	368	0.211 7	0.584 9	0.473 4	0.278 1
J263	350	0.394 2	0.700 0	0.504 8	0.245 2
J265	368	0.437 0	0.717 2	0.497 7	0.252 3
J266	368	0.485 6	0.684 6	0.386 8	0.396 3
J271	368	0.231 2	0.650 3	0.545 2	0.208 5
J281	368	0.572 1	0.811 5	0.559 5	0.196 8
J284	366	0.320 9	0.696 2	0.552 6	0.202 4
平均值	366	0.132 6	0.525 4	0.452 9	0.302 0

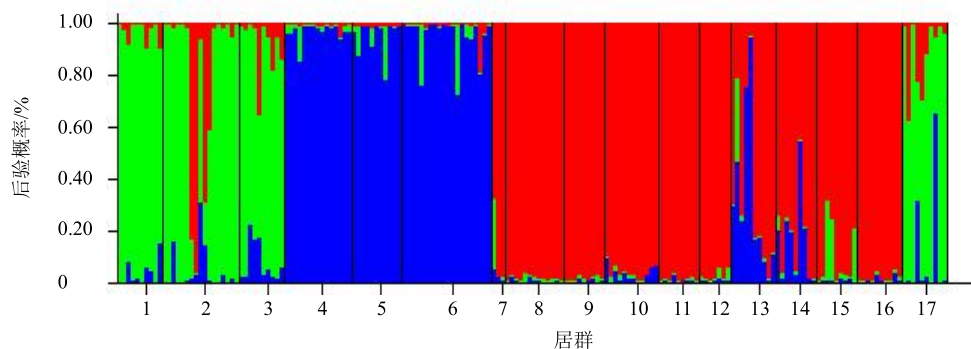


图 4 样品材料划分群组遗传结构

Fig. 4 Genetic structure of division group in sample material

构,发现样本的聚类数值(K)呈持续增大趋势,当 $K=3$ 时, $\ln P(D)$ 出现了第一个转折点,此时的 ΔK 为最大值。根据似然值最大的原则,将 17 个金铁锁自然群体分为 3 个遗传群体,分别包含 4、10 和 3 个群体,其中第 1 组群体包括雪山乡(XS)、采石场(WX)、麻窝山村(MWS)、东川区(DC),第 2 组群体包括倘甸(TD)、嵩明(SM)、宣威(XW),第 3 组群体包括康普(KP)、尼西(NX)、飞来寺(FLS)、迎宾台(YBT)、太安(TA)、宁蒗(NL)、金山(JS)、鹤庆(HQ)、剑川(JC)、洱源(EY)。除了群体 3 和 13 外,金铁锁群体间的基因渗透较少。

4 讨论

遗传多样性和遗传结构是一个物种的重要特征,同时反映了适应进化和环境变迁及自然选择的效应^[30]。对金铁锁遗传多样性和遗传结构的研究可以帮助了解金铁锁的进化历史,有助于采取保护措施及后续种质资源的开发和利用。

在杨耀文等^[8]利用 RAPD 对来自昆明、鹤庆、中甸 3 个群体各 19 个样品进行了分析,发现群体间具有较大的分化。屈燕^[31]利用 DALP 分子标记对金铁锁主要分布区 17 个群体 194 份材料进行分析,发现金铁锁在位点水平上具有相当高的 PPB,但在群体水平上 PPB 值却偏低, $G_{st}=0.789\ 9$ 。这与本研究的结果相同,本研究中金铁锁在位点水平上 PPB 为 90.336%,其中 PPB 有 7 个为 100%,占了所有引物的一半,从位点水平来看,金铁锁群体处于遗传多样性高的水平。而从金铁锁各群体的遗传多样性分析表明,相对于位点水平而言,各群体内的遗传多样性一般(平均 N_a 为 2.441 2,平均 N_e 为 1.637 9,平均 I 为 0.548 8, H_o 的平均数为 0.286 1, H_e 的平均数 0.323 4, H 的平均数 0.323 2,PPB 的平均值为 90.336%)。对于植物来说,植物的生殖方式、遗传漂变、自然选择、基因突变和基因流及环境变化和人类活动导致的物种灭绝、生境片段化等是能确定对遗传多样性造成改变的因素^[32]。而其中植物的繁殖方式是影响植物群体内和群体间遗传多样性的主要因素^[33]。本实验金铁锁为常异交植物^[34],金铁锁的繁殖方式使得群体内的纯合性增加,降低了群体内的遗传多样性;另外金铁锁的分布范围窄,生境片段化且遭到破坏^[35],使得群体内的遗传多样性降低;再加上金铁锁由于自然群体的野外采挖严重,使得部分地区金铁锁濒临灭绝,个

体数量的减少易使群体内发生近交和遗传漂变,进而降低了群体内的遗传多样性。

N_m 的大小可以反映群体结构的大小,一般认为,当 N_m 较大时,种间遗传分化小,植物群体间相似性就会越大,群体也就越均匀,大的 N_m 可以阻止群体间的遗传分化;而当 N_m 较小时,自然界的群体常常处于不是很理想的状态。 N_m 的大小和有效群体数为正比,而与遗传漂变和群体分化程度成反比^[33]。一般认为当 N_m 大于 1 时^[36],可以克服遗传漂变对群体产生的影响。根据表 10 中, F_{st} 均值为 0.452 9,当 $F_{st}>0.25$ 时,群体间存在显著遗传分化^[29];金铁锁的 N_m 值为 0.302 0($N_m<1$)说明群体间的 N_m 较小,结果与朱常成^[35]在对金铁锁生物地理学与传粉生物学研究中的结果相似,基因流为 0.300 8^[37],但群体间遗传分化则结果存在差异,该研究中群体间的基因分化系数为 62.44%,虽然均存在显著遗传分化,但还是有一定差距,可能与采集的样本有关,朱常成^[35]的研究样本来自 7 个群体共 3 对引物,与本研究结果存在数据上的差异。这可能与金铁锁的繁殖方式有关,金铁锁为常异交植物,Hamrick 等^[38]的研究中,各种繁殖类型的植物中, N_m 越大的种类,分化系数越小;金铁锁为常异交植物, N_m 水平和分化程度处于自交和杂交之间,和研究结果相符合。而低水平的 N_m 可能是导致金铁锁群体间产生较大遗传分化的原因;在小种群中,遗传漂变在种群分化中起较大作用^[39],可能是金铁锁遗传分化系数较高的原因。值得注意的是,本研究的采样地与朱常成^[35]研究中的采样地存在差别,且采摘年限相隔 12 年,但是 N_m 数据相差不大, N_m 在这段期间对金铁锁种群的影响不大;这与研究中采样地的实际情况有所出入,本研究的部分采样地自然植株一株难求;造成 N_m 值无变化的原因表明近些年金铁锁在经济条件较好的地区如丽江等保护措施得当,使得自然群体得到了良好的保护,而在部分经济落后地区如倘甸、康普等地则需因地制宜,采取迁地保护等措施来进行保护。

哈温平衡用来检验微卫星基因型是否处于平衡状态,由于在许多因素的影响下如人类活动,群体中的哈温平衡往往受到破坏,本研究中(表 8),共 238 个组合中,75 个组合 $P<0.05$,共占比 31.51%,为显著偏离哈温平衡,其中贵州省威宁县迤那五星村(YWX)、贵州省威宁县雪山乡(XS)、

云南宣威(XW)、云南省丽江市太安乡(TA)、云南省大理州鹤庆县(HQ)、云南省昆明市东川区(DC)群体的金铁锁有 6 个位点处于显著不平衡状态,而打破群体平衡的因素有很多,比如群体内的近交,选择作用和外来种群的冲击^[40]。由于金铁锁繁殖特性,种子散布范围狭窄,可能是存在哈温不平衡的原因。

根据金铁锁群体的遗传距离和遗传相似系数,利用遗传一致度,通过 NTSYS 软件对金铁锁群体进行聚类,根据聚类分析结果,以 0.618 为阈值,大致将 17 个群体分为 3 类,倘甸(TD)、宣威(XW)、嵩明(SM)距离较近,归为一类;雪山乡(XS)、五星村(YWX)、麻窝山(MWS)、东川(DC)归为一类;群体康普(KP)、尼西(NX)、飞来寺(FLS)、迎宾台(YBT)、太安(TA)、宁蒗(NL)、金山乡(JS)、鹤庆(HQ)、洱源(EY)归为一类;剑川(JC)单归为一类,这个结果与 Structure 2.3.1 软件根据 K 值所划群体的结果除了剑川外大致相同,同时,根据 PCoA 结果,将这些群体的地理数据放在地理分布图上,也可以发现,剑川(JC)群体虽然大致和康普(KP)等 10 个群体归为一类,但也是游离在周围,同东川一样;根据 Mantel 检测遗传距离和地理距离的结果可知,地理距离和遗传距离为正相关。刘文志等^[41]在分析采自云南、四川、西藏等地的共 12 个群体的金铁锁遗传多样性时,将 12 个群体分成了 3 类,并分析了可能的起源,表明金铁锁可能是由于在历史上随着古金沙江流域进行扩张,而西藏的则为喜马拉雅山脉隆起后分化出的一只。杨耀文等^[6]在研究了中甸、鹤庆和昆明等 3 个群体的金铁锁,认为间断分布在云南、贵州、西藏和四川等地的金铁锁可能是来源于同一个古老的原始类群,而群体间的较大分化来自于长期演化中的地理阻隔。因此,可能原因是由于剑川采集地独特的地理位置所造成的,剑川群体所在采集地位于一个四面环山的沙溪镇,地理隔离导致了剑川群体与其他地方的金铁锁群体产生了分化。

金铁锁基于 Structure 分组的结果,将 17 个群体按分为 3 组不同的基因型组,即在 17 个群体中大概存在 3 个基因库,而这 3 个基因库中出现了少量的基因渗透,将 Structure 所得结果分为 3 组反映到 17 个群体的自然地理分布图中,结果显示第 3 组群的 10 个群体均分布在云南西北部,形成了独特的基因型族群;第 1 组和第 2 组分布在云南东北

部,其中第一组的 3 个群体位于贵州西南部和云南东北部接壤的位置,第 1 组中的东川(DC)群体位于云南东北部和贵州靠近的位置;第三组的群体倘甸(TD)、宣威(XW)、嵩明(SM)均靠近东川附近,且在第 1 组和第 2 组中,第 1 组的群体东川(DC)在地理位置上更靠近第 2 组群体所在地理位置,3 个组中均存在少量相互的基因流。出现这种情况的可能因为东川群体采样时只采集了一个地方的 10 个样品有关,采集的样本量少,且采集的样本可能为一颗植株繁殖的后代,使得有效样本少,造成了一定的数据偏差;另外,该地区有种植金铁锁的情况,种子来源复杂,导致存在自然种群来源不明的情况发生,前面 PCoA 分析也印证了这一点,东川地区的金铁锁游离在这 3 个群体外。

参考文献

- [1] 王特文,师晶丽,王用平,等.西南特有药用植物—金铁锁[J].重庆中草药研究,1999,40(2):32-34.
- [2] 钟雁,赵承友,王用平,等.金铁锁生物学特性及保护研究[J].中华中医药杂志,2007,22(12):848-850.
- [3] 傅立国.中国植物红皮书—稀有濒危植物(第一册)[M].北京:科学出版社,1992.
- [4] 张庆滢,刘小炷,毛常丽.药用植物金铁锁的研究进展[J].云南农业大学学报:自然科学版,2009,24(1):139-143.
- [5] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001.
- [6] 杨耀文,钱子刚,王晓佳,等.金铁锁不同群体培养物生长量比较[J].中药材,2006,29(2):110-111.
- [7] 梁南熙.金铁锁的 HPLC 指纹图谱及特定成分在群体中的分布格局研究[D].昆明:云南大学,2006.
- [8] 杨耀文,谢晖,普春霞,等.金铁锁三个群体的随机扩增多态性 DNA 分析[J].云南中医学院学报,2003,26(3):21-23.
- [9] 戴住波,朱常成.金铁锁种质资源的遗传多样性分析[J].中草药,2007,38(7):1070-1074.
- [10] 王艳梅.利用 SSR 研究榛属种间亲缘关系及平榛群体遗传多样性[D].北京:北京林业大学,2008.
- [11] 赵香娜.国内外甜高粱品种资源遗传多样性研究[D].北京:中国农业科学院,2008.
- [12] 杨维泽,金航,崔秀明,等.三种人参属植物的 EST-SSR 信息分析及其在三七中的应用[J].基因组学与应用生物学,2011,30(1):62-71.
- [13] 邓科君,张勇,熊丙全,等.药用植物丹参 EST-SSR 标记的鉴定[J].药学学报,2009,44(10):1165-1172.
- [14] 陈国庆.番红花 EST 资源的 SSR 信息分析[J].广西植物,2011,31(1):43-46.

- [15] 李广平, 曹福亮. 银杏 EST-SSR 引物开发 [J]. 西北农业学报, 2012, 21(12): 149-152.
- [16] 王 娟, 韦素娟, 李丽云, 等. 罗汉果 EST-SSR 引物开发 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(12): 3449-3452.
- [17] 王美蓉. 青叶胆生物学特性研究及 EST-SSR 优化体系的建立 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2015.
- [18] 何仁锋. 基于 SCoT 和 SSR 标记的药用菊花种质资源遗传多样性研究 [D]. 杭州: 杭州师范大学, 2015.
- [19] 郭冠瑛. 地黄大容量转录组文库的构建及 EST-SSR 标记的开发与鉴定 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- [20] 胡伟明. 四种药用植物的分子标记开发和利用 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2015.
- [21] Liu X B, Ma L, Zhang A H, *et al.* High-throughput analysis and characterization of *Astragalus membranaceus* transcriptome using 454 GS FLX [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e95831.
- [22] Jain A, Chaudhary S, Sharma P C. Mining of microsatellites using next generation sequencing of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome [J]. *Mol Biol Plants*, 2014, 20(1): 115.
- [23] 孟令芝. 基于高通量测序技术的连翘转录组分析及 SSR 分子标记的开发 [D]. 太原: 山西农业大学, 2014.
- [24] 杨 云, 张 争, 陈 波, 等. 基于白木香 ESTs 的沉香属 SSR 分子标记引物筛选 [J]. 江西农业学报, 2014, 26(5): 76-79.
- [25] 徐石勇. 基于 DNA 分子标记的金银花掺伪鉴定方法研究 [D]. 天津: 天津大学, 2015.
- [26] 王玉霞. 麦冬药材质量评价及道地性初步研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [27] 李 巍. 生物信息学导论 [J]. 遗传学报, 2005, 32(1): 103.
- [28] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [29] Rosenberg N A. Distruct: A program for the graphical display of population structure [J]. *Mol Ecol Res*, 2004, 4(1): 137-138.
- [30] Sokal R R, Jacquez G M, Wooten M C. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection [J]. *Genetics*, 1989, 121(4): 845-855.
- [31] 屈 燕. 金铁锁群体生物学研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2009.
- [32] 文亚峰, 韩文军, 吴 顺. 植物遗传多样性及其影响因素 [J]. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 2010, 30(12): 80-87.
- [33] 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护 [J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 92-96.
- [34] 尹子丽. 金铁锁繁殖生物学及种质资源标准化初步研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2008.
- [35] 朱常成. 药用植物金铁锁的生物地理学与传粉生物学初步研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2006.
- [36] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. *Science*, 1987, 236(4803): 787-792.
- [37] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plantspecies. [A]. // Brown A H D, Clegg M T. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [M]. Sunderland: Sinauer, 1990.
- [38] Hamrick J L, Godt M J W. *Conservation Genetics of Endemic Plant Species* [M]. Berlin: Springer, 1996.
- [39] 陈小勇. 植物的基因流及其在濒危植物保护中的作用 [J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 97-102.
- [40] 柏 丽. 中国 6 个双峰驼群体微卫星遗传多样性分析 [D]. 银川: 宁夏大学, 2014.
- [41] 刘文志, 戴住波, 钱子刚. 金铁锁不同群体 rDNA ITS 序列分析 [J]. 中药材, 2008, 31(2): 192-195.