

云南草果种质资源的遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析

胡一凡¹, 张雪梅¹, 徐绍忠^{1,3}, 杨生超^{2,3}, 杨志清^{1,2,3,4*}

1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201

2. 云南农业大学 云南省药用植物生物学重点实验室, 云南 昆明 650201

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

4. 云南省芳香生物工程技术研究中心, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 评价云南草果居群的遗传多样性及亲缘关系。方法 运用 7 对微卫星引物对 24 个草果居群进行分析; 首先应用 GenALEx 计算遗传多样性参数, 并进行 PCoA 和 AMOVA 分析; 采用 NTsys 软件绘制居群聚类图; 最后利用 Structure 软件计算出最佳的 K 值。结果 24 个草果居群的 Shannon 多样性指数 (H) 的平均值为 0.49, 期望杂合度 (H_e) 的平均值为 0.32; 遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.090, 基因流 (N_m) 为 2.930。24 个草果居群的遗传分化有 81% 存在于居群内, 仅有 19% 存在于居群间; 黄花草果 23 个居群的遗传一致度 (I) 为 0.631 8~0.982 4, 遗传距离 (D) 的范围为 0.017 7~0.459 2, 而白花草果居群 (MG5) 与其他 23 个黄花草果居群一致度均较小, 为 0.369 7~0.609 0; 而居群聚类分析, 在遗传距离 0.49 处, 明显地把白花草果与黄花草果分开; Structure 聚类得出 $K=4$ 时, 209 份黄花草果资源可被分为 4 个类群。结论 云南黄花草果居群的遗传多样性水平平均偏高; 遗传变异主要存在于居群内, 而非居群间。根据基因型, 黄花草果和白花草果被明显地划分成 2 类, 遗传距离很远; 而黄花草果大致被分为 4 个类群。

关键词: 草果; 简单重复序列分子标记; 遗传多样性; 亲缘关系; 聚类分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)22-5388-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.025

Analysis of genetic diversity and genetic relationship of *Amomum tsao-ko* germplasm resources in Yunnan by SSR markers

HU Yi-fan¹, ZHANG Xue-mei¹, XU Shao-zhong^{1,3}, YANG Sheng-chao^{2,3}, YANG Zhi-qing^{1,2,3,4}

1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2. Key Laboratory of Medicinal Plant Biology of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

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

4. Yunnan Engineering Technology Research Center for Aromatic Biology, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To evaluate the genetic diversity and phylogenetic relationships of *Amomum tsao-ko* populations in Yunnan. **Methods** Seven pairs of microsatellite (SSR) primers were used to analyze 24 *A. tsao-ko* populations; First, GenALEx was used to calculate genetic diversity parameters, PCoA and AMOVA analysis was carried out; NTsys software was then used to draw population clusters map; And finally, the Structure software was used to calculate the best K value. **Results** The average of Shannon's diversity index (H) of the 24 *A. tsao-ko* populations was 0.49, the average of heterozygosity (H_e) was 0.32, the genetic differentiation coefficient (F_{st}) was 0.090, and the gene flow (N_m) was 2.930. Eighty-one percent of the genetic differentiation among the 24 populations of *A. tsao-ko* existed within the population, and only 19% existed among the populations. The genetic identity (I) of the 23 *A. tsao-ko* populations of yellow flowers was 0.631 8—0.982 4. The genetic distance (D) was in the range of 0.017 7—0.459 2, while the consistency degree of the *A. tsao-ko* population of white flower (MG5) and 23 other yellow flowers was 0.369 7—0.609 0. However,

收稿日期: 2018-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目“草果居群的分子鉴定及种质资源评价”(81560615); 云南省社会发展科技计划项目“云南草果种植加工关键技术研究及示范”(2011CG015); 云南省科技惠民计划项目“富宁石漠化区域中药材种植关键技术研究及应用示范”(2015RA083) 云南省科技计划项目“云南省芳香生物工程技术研究中心建设”(2018DH010)

作者简介: 胡一凡(1994—), 女, 河北承德人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源分子鉴定。Tel: 13187708818 E-mail: huyisarah@163.com

***通信作者** 杨志清, 硕士生导师, 副教授, 主要从事药用植物栽培与资源评价研究。E-mail: yzq1468@126.com

cluster analysis showed that *A. tsao-ko* population of the white flowers and yellow flowers were clearly separated at the genetic distance of 0.49. Structure clustering showed 209 *A. tsao-ko* resources can be divided into four groups when *K* value was 4. **Conclusion** The genetic diversity of *A. tsao-ko* populations of yellow flowers of Yunnan is higher on average, and the genetic variation is mainly found in population rather than among populations. According to the genotypes, *A. tsao-ko* of yellow flower and white flower are clearly divided into two categories, and the genetic distance is very far; and the yellow flower of *A. tsao-ko* is roughly divided into four groups.

Key words: *Amomun tsao-ko* Crevost et Lemaire; SSR; genetic diversity; genetic relationship; clustering analysis

草果 *Amomun tsao-ko* Crevost et Lemaire 为药食两用的中药材大宗品种之一,是姜科豆蔻属多年生宿根草本植物^[1]。因草果全株皆有辛香气味,可作为调味香料,且果实可入药;常用于寒湿内阻、脘腹胀痛、痞满呕吐、疟疾寒热之症^[2-3]。草果生长在热带、亚热带 1 300~1 800 m 海拔荫蔽潮湿的林下地带,是典型的高原林下经济作物。主要分布于我国云南省东南部 and 广西壮族自治区的西部,以及越南、老挝北部的部分地区^[4-7]。目前云南省草果种植面积达 11.98 万公顷左右,分布在红河州、文山州、西双版纳州、怒江州、德宏州、保山地区、思茅地区、临沧 8 个地(州)区,种植面积和产量均占全国 90% 以上^[8-10]。

其经济价值高、用途广、需求量大,在国内外市场上供不应求,因此市场前景极为看好^[11-13]。但目前云南草果产业发展存在着种质、病虫、传粉等问题,导致品种类型混杂、单产低下等问题^[9],严重地制约着云南草果产业的健康可持续发展。近年来,草果栽培技术与种植情况、挥发油的提取、化学成分的鉴定、药理作用方面均有研究,但草果基因水平遗传方面的研究极其稀少,仅有严美荣^[14]用简单重复序列分子标记(SSR)技术对 5 个居群 35 个样本的草果进行遗传多样性分析,结果表明 5 个种群的遗传多样性不高。但采样地区不全面,样本稀少,分析方法单一,研究结果具有局限性。因此开展草果居群的分子鉴定及种质资源的综合评价研究,是实现草果产业发展的根本保证。

SSR 具有很高的多态性、数量丰富、重复性好、呈共显性、广泛分布于基因组^[15-17]、与其他分子标记相比更能揭示植物种质资源的遗传多样性,使之易于鉴别同一物种的不同基因型,甚至同一系谱来源的基因型等优点。因此本研究利用 SSR 分子标记技术,旨在揭示草果种质资源的遗传多样性,探索 24 个草果居群间以及各居群内的亲缘关系,为云南草果资源的分子鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2016—2017 年在云南省 10 个县市不同海拔

地区的 24 个居群(每个居群 5~12 份样品,共 214 份,编号 1~214)采集生长状况良好的草果叶片为材料,样品经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杨生超教授鉴定为草果 *Amomun tsao-ko* Crevost et Lemaire,置于变色硅胶中密封保存。采样地信息见表 1。

1.2 DNA 的提取

选取较鲜嫩叶片,用改良 CTAB 法提取叶片基因组 DNA。提取后,加入 40 μ L TE 溶液,随后放入冰箱 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 SSR 分析及检测

PCR 所用的引物参考文献报道^[14]的草果的 7 个引物,以及姜科其他植物的 SSR 引物 41 对^[18-19],共 48 对引物,后对 24 个居群各取 3 个材料进行 PCR 扩增,筛选出 7 个条带清晰、多态性好、重复性好的引物。引物序列见表 2。经预试验,最终确定 PCR 体系为 20 μ L PCR 反应体系(2 $\times$ taq PCR Starmix 10 μ L,正、反向引物各 1 μ L,DNA 模板 1 μ L,ddH₂O 7 μ L)。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,以 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。对 214 份材料进行扩增,后扩增产物利用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,银染。

1.4 数据统计分析

每对引物扩增出 1 对等位基因,每对等位基因有多种带型。无带记为“0”;有带按照其相对分子质量从大到小分别记作“1、2、3...”;再根据各软件要求来转化成相应格式。此种转换方式是根据 SSR 标记长于揭示等位基因的特点,配合相应统计软件对 SSR 原始数据格式特殊要求确定^[20-21]。首先应用 GenALEX^[20]计算平均等位基因数(N_a)、有效等位基因数目(N_e)、Shannon 多样性指数(H)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Nei'遗传相似性系数(D)、遗传距离(D)、遗传分化系数(F_{st})、基因流(N_m),并进行分子方差分析(AMOVA);采用 NTsys 软件进行主坐标分析(PCoA),并绘制出居群聚类图和个体聚类图;最后利用 Structure^[21]软件计

表 1 草果叶片样品信息

Table 1 Sample information of *A. tsao-ko* leaves

编号	种质名称	采集点	海拔/m	经度	纬度	样品数量
LC1	澜沧 1 号	澜沧南岭乡	2 267	99°55'56"E	22°50'26"N	11
MG4	马关 4 号	马关古林菁乡上村委会白木山村小组 (老基地)	1 247	103°58'26"E	22°51'44"N	10
MG3	马关 3 号	马关蔑厂乡蔑厂村委会小八寨村小组	1 542	103°59'41"E	22°52'14"N	10
JP2	金平 2 号	金平大寨乡	1 595	103°20'13"E	22°53'28"N	10
JP1	金平 1 号	金平大寨乡	1 742	103°20'8"E	22°53'49"N	10
MG1	马关 1 号	马关县仁和镇阿峨村委会新寨村小组 [新基地 (天然)]	1 450	104°18'17"E	22°55'12"N	5
MG2	马关 2 号	马关县仁和镇阿峨村委会新寨村小组 [新基地 (移栽)]	1 450	104°18'17"E	22°55'12"N	5
MG5	马关 5 号	马关县仁和镇阿峨村委会新寨村小组 [新基地 (天然白花)]	1 450	104°18'17"E	22°55'12"N	5
MG6	马关 6 号	马关夹寒蓍摩所村 (野生)	1 425	104°31'46"E	22°56'9"N	7
LCH1	绿春 1 号	绿春大兴镇汾水岭	1 781	102°27'29"E	22°58'36"N	10
LCH2	绿春 2 号	绿春戈奎乡三公里	1 911	102°29'39"E	22°59'25"N	7
LC2	澜沧 2 号	澜沧富东乡	1 800	99°99'56"E	23°12'81"N	10
XC1	西畴 1 号	西畴柏林乡三板桥村委会瓦厂村小组	1 324	104°44'21"E	23°14'30"N	5
XC2	西畴 2 号	畴柏林乡三板桥村委会瓦厂村小组	1 313	104°43'23"E	23°15'39"N	5
LL2	龙陵 2 号	龙陵龙山董华村	1 968	98°35'56"E	24°34'40"N	10
LL1	龙陵 1 号	龙陵龙山镇云山社区	1 630	98°39'16"E	24°35'33"N	12
TC1	腾冲 1 号	腾冲候桥镇	2 012	98°7'24"E	25°22'24"N	10
LS1	泸水 1 号	怒江泸水鲁掌镇滴水河源头	2 049	98°44'36"E	25°54'47"N	10
LS2	泸水 2 号	怒江泸水鲁掌镇滴水河桥头	1 570	98°45'42"E	25°54'59"N	10
LS3	泸水 3 号	怒江泸水三河村	1 350	98°46'42"E	25°55'13"N	10
FG1	福贡 1 号	福贡石月亮乡资古朵村施哭洛底小组	1 358	99°8'19"E	27°10'5"N	11
FG2	福贡 2 号	福贡石月亮乡资古朵村达谷小组	1 838	99°8'21"E	27°10'6"N	11
GS1	贡山 1 号	贡山普拉底乡	1 528	98°44'9"E	27°37'20"N	10
GS2	贡山 2 号	贡山独龙江	1 469	98°16'12"E	27°40'44"N	10

表 2 筛选后的 SSR 引物序列

Table 2 Screened SSR primer sequences

引物	FPr1 (5'→3')	RPr1 (5'→3')
SSRF	GCACCAT CCTTGCTATTC	TGTCCACCCCAGGTATTA
AT1	GCTTCACCTCCAGTTTCC	GTCTCCTTGTCCACCC
AT46	TAGAAACGCAAATGAACAG	TGCTGCCATGACCTCCT
AT56	AGTTTGAACCTCCCCATT	ATCTTGAGCTTCGTGCC
AT57	CTGAATCCAACCTCCCA	CTCTACCTCTCTCCTCCAT
AT4	CTTTACTCTGGTGGATGGA	TCATTATTTACAGCCCTC
AT29	GAGGAGGCGTGGACTTT	GGGCTGCTTCTATTTCAT

算出最佳的 K 值, 通过 ΔK 来确定 K 值。

2 结果与分析

2.1 SSR 位点多样性

7 对引物在 214 份草果种质资源中扩增出的 N_a 数目之和为 13.38。每对引物的 N_a 的平均值为 1.91; 其中 N_e 的平均值为 1.56; H_o 的平均值为 0.28; H_e 的平均值为 0.32; H 的平均值为 0.49。结果见表 3。

2.2 居群间遗传多样性分析

白花草果 MG5 居群的样本数 (N)、 N_a 、 N_e 、 H_o 、 H_e 均为最小值, 而黄花草果 N_a 的平均值为 1.97; N_e 的平均值为 1.60; LS1 的 N_e 最大, 达 1.83; 而 MG6 居群的 N_a 最小, 仅 1.286。 H_o 的平均值为 0.28; 而最大值和最小值分别为 XC1 居群和 LL2 居群。 H_e 的平均值为 0.32; H 平均值为 0.49。而 H_e 和 H 的最大值和最小值同样分别为 JP2 居群和 MG1 居群 (表 4)。

表 3 SSR 引物位点多样性

Table 3 Diversity of SSR primer site

引物	N	N_a	N_e	H	H_o	H_e
SSRF	8.000	1.792	1.525	0.477	0.249	0.324
AT1	8.625	2.500	1.903	0.680	0.400	0.416
AT46	8.042	1.917	1.587	0.495	0.524	0.334
AT56	8.125	1.875	1.346	0.401	0.253	0.252
AT57	6.750	1.625	1.193	0.258	0.138	0.155
AT4	6.458	1.792	1.654	0.534	0.104	0.375
AT29	6.625	1.875	1.704	0.578	0.268	0.404
平均值	7.518	1.911	1.559	0.489	0.276	0.323

表 4 草果居群的多样性信息

Table 4 Information of *A. tsao-ko* population diversity

居群	N	N_a	N_e	H	H_o	H_e	多态性位点百分率/%	F_{st}	N_m
LC1	9.429	2.000	1.679	0.549	0.251	0.364	85.71	0.067	3.3
LC2	9.571	2.143	1.553	0.527	0.263	0.333	100.00	0.044	5.3
XC1	5.000	2.000	1.759	0.56	0.514	0.371	85.71	0.163	1.3
XC2	5.000	2.000	1.727	0.573	0.343	0.394	100.00	0.070	3.3
GS1	7.857	2.143	1.813	0.623	0.323	0.423	100.00	0.068	3.3
GS2	9.714	2.143	1.770	0.611	0.376	0.398	100.00	0.066	3.5
LS1	9.286	2.000	1.834	0.606	0.363	0.410	85.71	0.074	3.0
LS2	8.286	2.143	1.522	0.497	0.230	0.308	85.71	0.097	2.3
LS3	8.286	2.000	1.534	0.465	0.311	0.300	85.71	0.099	2.3
LCH1	10.143	2.143	1.558	0.546	0.288	0.344	100.00	0.070	3.3
FG1	9.143	2.000	1.725	0.589	0.429	0.405	100.00	0.061	3.8
LCH2	5.857	1.857	1.576	0.484	0.304	0.329	85.71	0.069	3.3
FG2	10.000	2.000	1.447	0.428	0.213	0.274	85.71	0.082	2.8
JP1	9.429	2.143	1.753	0.603	0.368	0.395	100.00	0.044	5.3
JP2	8.429	2.143	1.817	0.648	0.297	0.431	100.00	0.051	4.5
MG3	9.571	2.143	1.709	0.566	0.206	0.366	100.00	0.067	3.3
MG4	7.571	1.714	1.464	0.371	0.198	0.252	71.43	0.113	1.8
MG1	4.571	1.714	1.277	0.292	0.121	0.180	71.43	0.114	1.8
MG2	4.571	2.000	1.653	0.535	0.217	0.350	85.71	0.098	2.3
LL2	6.571	1.714	1.331	0.324	0.071	0.208	71.43	0.126	1.5
LL1	9.857	2.143	1.599	0.543	0.386	0.353	100.00	0.062	3.7
TC1	6.286	1.714	1.512	0.420	0.231	0.288	71.43	0.133	1.5
MG6	5.571	1.286	1.229	0.278	0.187	0.196	42.86	0.235	0.8
MG5	0.429	0.571	0.571	0.099	0.143	0.071	14.29	0.575	0.2
平均值	7.518	1.911	1.559	0.489	0.276	0.323	84.52	0.110	2.8

草果 24 个居群的 F_{st} 为 0.110, N_m 为 2.8。白花草果 MG5 居群的 F_{st} 高达 0.575, 比 23 个黄花草果居群的 F_{st} 平均值 0.090 多了 0.485; 而黄花草果最大值为 XC1 居群, 为 0.163; 最小值为 0.044, 为 LC2 和 JP1 居群, 这 2 个居群与其他黄花居群的平均分化最小, 基因流最大。

采用 AMOVA 对草果 24 个居群的遗传分化程度及其在居群间和居群内的分布程度进行了检测; 结果表明, 草果的遗传分化有 81% 存在于居群内, 仅有 19% 存在于居群间; 居群内的遗传变异远大于居群间, 因此居群内变异是居群分化的主要来源

(表 5)。

2.3 居群间遗传距离、遗传一致度、主成分分析及 UPGMA 聚类分析

为了进一步分析草果各居群间的亲缘关系, 本实验采用居群间 I 和 D 矩阵, 来比较 24 个居群的遗传相似性。结果表明, 黄花草果 23 个居群的 I 为 0.631 8~0.982 4, D 的范围为 0.017 7~0.459 2, D 的范围不大, 见表 6。LL1 和 LC2 的 I 最高, 为 0.982 4, D 最小, 为 0.017 7; XC1 和 TC1 的 I 最低, 为 0.631 8, D 最大, 为 0.459 2。而 MG5 与其他 23 个黄花草果居群的 I 均较小, 为 0.369 7~

表 5 居群内及居群间的分子方差分析 (AMOVA)

Table 5 Analysis of molecular variance within populations and among populations (AMOVA)

来源	自由度	方差总和	平均方差	变异组分	变异百分率/%
居群内	23	335.875	14.603	1.109	19
居群间	190	900.849	4.741	4.741	81
总量	213	1 236.724	—	5.850	100

表 6 各居群 *I* 和 *D* 矩阵Table 6 Matrix of *I* and *D* of each population

居群	LC1	LC2	XC1	XC2	GS1	GS2	LS1	LS2	LS3	LCH1	FG1	LCH2	FG2	JP1	JP2	MG3	MG4	MG1	MG2	MG5	MG6	LL1	LL2	TC1
LC1	****	0.978 7	0.780 1	0.928 0	0.896 9	0.917 5	0.922 5	0.914 9	0.938 2	0.961 2	0.965 5	0.981 0	0.953 2	0.975 1	0.961 9	0.945 6	0.966 0	0.944 3	0.891 6	0.560 3	0.935 9	0.953 4	0.886 0	0.887 0
LC2	0.021 5	****	0.778 0	0.929 8	0.897 4	0.943 4	0.904 5	0.965 5	0.915 3	0.968 1	0.958 7	0.964 5	0.980 0	0.971 5	0.952 9	0.919 9	0.957 3	0.961 7	0.884 0	0.535 2	0.936 5	0.982 4	0.935 9	0.845 5
XC1	0.248 3	0.251 0	****	0.865 9	0.881 4	0.858 0	0.810 1	0.750 6	0.722 1	0.794 5	0.817 2	0.753 6	0.731 5	0.881 9	0.839 4	0.838 7	0.640 7	0.649 6	0.848 5	0.542 7	0.748 7	0.775 2	0.788 6	0.631 8
XC2	0.074 7	0.072 8	0.144 0	****	0.986 4	0.925 6	0.945 9	0.860 5	0.949 5	0.889 3	0.935 8	0.955 3	0.882 8	0.967 3	0.922 4	0.905 5	0.862 3	0.831 0	0.952 8	0.414 6	0.906 8	0.959 6	0.834 5	0.812 9
GS1	0.108 8	0.108 3	0.126 2	0.013 7	****	0.913 7	0.957 9	0.842 9	0.937 1	0.872 7	0.901 0	0.927 3	0.855 7	0.948 9	0.928 4	0.910 9	0.808 8	0.812 6	0.964 9	0.386 8	0.847 3	0.927 5	0.802 3	0.766 6
GS2	0.086 1	0.058 3	0.153 2	0.077 3	0.090 2	****	0.898 6	0.954 6	0.844 6	0.957 6	0.960 5	0.884 2	0.932 7	0.959 5	0.949 6	0.904 7	0.858 0	0.889 0	0.837 2	0.461 4	0.826 0	0.938 9	0.880 8	0.702 4
LS1	0.080 7	0.100 4	0.210 6	0.055 6	0.043 0	0.106 9	****	0.860 9	0.929 5	0.893 2	0.896 4	0.927 3	0.896 6	0.935 6	0.961 3	0.929 3	0.846 8	0.864 8	0.956 2	0.369 7	0.829 5	0.914 1	0.795 0	0.789 6
LS2	0.089 0	0.035 1	0.286 9	0.150 3	0.171 0	0.046 5	0.149 8	****	0.810 0	0.969 2	0.928 7	0.875 8	0.982 4	0.922 2	0.940 3	0.859 4	0.901 3	0.957 6	0.801 0	0.492 7	0.835 5	0.941 2	0.943 2	0.730 8
LS3	0.063 8	0.088 5	0.325 6	0.051 9	0.064 9	0.168 9	0.073 1	0.210 7	****	0.855 3	0.882 5	0.981 0	0.857 5	0.923 9	0.895 5	0.920 0	0.891 3	0.863 6	0.935 9	0.398 7	0.897 0	0.931 5	0.754 8	0.853 3
LCH1	0.039 6	0.032 4	0.230 1	0.117 3	0.136 1	0.043 3	0.113 0	0.031 3	0.156 3	****	0.967 3	0.918 4	0.976 8	0.964 3	0.975 2	0.912 3	0.918 5	0.963 1	0.833 5	0.550 2	0.849 5	0.927 3	0.923 1	0.789 3
FG1	0.035 1	0.042 1	0.201 9	0.066 3	0.104 3	0.040 3	0.109 4	0.074 0	0.125 0	0.033 2	****	0.939 3	0.944 0	0.970 6	0.948 4	0.886 8	0.937 1	0.900 9	0.838 9	0.515 5	0.896 1	0.950 8	0.897 2	0.821 4
LCH2	0.019 2	0.036 2	0.282 9	0.045 7	0.075 4	0.123 1	0.075 4	0.132 7	0.019 1	0.085 1	0.062 7	****	0.923 0	0.960 8	0.931 7	0.923 6	0.951 5	0.915 7	0.925 2	0.488 6	0.947 5	0.964 0	0.848 4	0.900 0
FG2	0.047 9	0.020 3	0.312 7	0.124 7	0.155 8	0.069 7	0.109 2	0.017 8	0.153 8	0.023 5	0.057 7	0.080 1	****	0.940 1	0.955 8	0.876 4	0.945 5	0.977 6	0.838 9	0.494 7	0.882 6	0.954 2	0.934 1	0.812 2
JP1	0.025 2	0.028 9	0.125 7	0.033 2	0.052 5	0.041 4	0.066 5	0.081 0	0.079 2	0.036 3	0.029 8	0.040 0	0.061 8	****	0.970 3	0.954 1	0.904 0	0.907 5	0.925 3	0.545 7	0.914 4	0.956 0	0.902 3	0.831 4
JP2	0.038 9	0.048 2	0.175 1	0.080 7	0.074 3	0.051 7	0.039 5	0.061 5	0.110 4	0.025 1	0.052 9	0.070 8	0.045 2	0.030 2	****	0.951 7	0.894 5	0.937 8	0.908 4	0.511 0	0.845 7	0.927 2	0.886 7	0.799 7
MG3	0.056 0	0.083 5	0.176 0	0.099 2	0.093 3	0.100 2	0.073 3	0.151 6	0.083 4	0.091 8	0.120 1	0.079 4	0.131 9	0.047 0	0.049 5	****	0.842 8	0.886 3	0.917 0	0.540 4	0.841 7	0.886 3	0.801 3	0.778 9
MG4	0.034 6	0.043 6	0.445 2	0.148 1	0.212 2	0.153 1	0.166 3	0.103 9	0.115 1	0.085 0	0.065 0	0.049 7	0.056 1	0.101 0	0.111 5	0.171 0	****	0.936 9	0.796 4	0.515 3	0.937 2	0.943 6	0.869 6	0.892 1
MG1	0.057 3	0.039 1	0.431 4	0.185 1	0.207 5	0.117 7	0.145 3	0.043 3	0.146 6	0.037 6	0.104 4	0.088 1	0.022 7	0.097 0	0.064 2	0.120 7	0.065 2	****	0.806 1	0.501 5	0.841 3	0.916 9	0.884 6	0.798 1
MG2	0.114 8	0.123 3	0.164 3	0.048 4	0.035 7	0.177 7	0.044 8	0.221 9	0.066 3	0.182 1	0.175 7	0.077 7	0.175 7	0.077 6	0.096 0	0.086 6	0.227 6	0.215 6	****	0.427 6	0.867 0	0.897 2	0.801 0	0.810 5
MG5	0.579 3	0.625 1	0.611 2	0.880 3	0.949 8	0.773 4	0.995 1	0.707 8	0.919 6	0.597 4	0.662 5	0.716 2	0.703 8	0.605 7	0.671 4	0.615 4	0.663 0	0.690 1	0.849 6	****	0.555 3	0.445 9	0.609 0	0.441 1
MG6	0.066 3	0.065 6	0.289 4	0.097 9	0.165 7	0.191 2	0.187 0	0.179 8	0.108 7	0.163 1	0.109 7	0.053 9	0.124 9	0.089 5	0.167 5	0.172 3	0.064 8	0.172 8	0.142 7	0.588 3	****	0.942 5	0.871 1	0.908 7
LL1	0.047 8	0.017 7	0.254 6	0.041 3	0.075 3	0.063 1	0.089 8	0.060 6	0.070 9	0.075 5	0.050 4	0.036 7	0.046 9	0.045 0	0.075 6	0.120 7	0.058 1	0.086 8	0.108 4	0.807 6	0.059 2	****	0.901 4	0.833 9
LL2	0.121 1	0.066 3	0.237 5	0.180 9	0.220 2	0.127 0	0.229 4	0.058 5	0.281 4	0.080 0	0.108 5	0.164 4	0.068 2	0.102 8	0.120 3	0.221 5	0.139 8	0.122 6	0.221 9	0.495 9	0.137 9	0.103 8	****	0.772 3
TC1	0.120 0	0.167 8	0.459 2	0.207 1	0.265 7	0.353 2	0.236 2	0.313 6	0.158 6	0.236 6	0.196 8	0.105 4	0.208 1	0.184 6	0.223 6	0.249 9	0.114 2	0.225 5	0.210 1	0.818 4	0.095 7	0.181 6	0.258 4	****

D-左下 *I*-右上*D*-on the lower left *I*-on the upper right

0.609 0; *D* 均较大, 为 0.495 9~0.995 1。而 *I* 最大和最小的分别为 TC1 和 MG5。

PCoA (图 1) 可更直观地看到每个居群之间的遗传距离, 用不同图形根据其所属的州市把 24 个居群分为文山州、红河州、怒江州、保山市和普洱市。结果表明, 相同州或市的居群并不一定会聚在一起, 所有居群无规律的穿插其中。

而居群聚类 (图 2) 分析, 在 *D*=0.49 处, 明显地把白花草果与黄花草果分开; 并且 XC1 和 MG6 与分别其他居群相聚稍远, 其他 21 个

居群在 *D*=0.93 处分为 3 部分, TC1 单独分为一类, 其他分为 2 类。

2.4 最佳 *K* 值聚类分析

群体聚类明显地分出了黄花草果和白花草果, 因此将通过计算最佳 *K* 值的方法, 对 209 份黄花草果材料进行聚类分析。 ΔK 在 *K*=4 时明显出现拐点, 由此判断 209 份黄花草果资源可被分为 4 个类群 (图 3), 并绘制种质材料群体结构图 (图 4、5)。结构图中, 直观地反映出每个居群都由不同颜色构成, 4 大类纷繁的穿插其中。

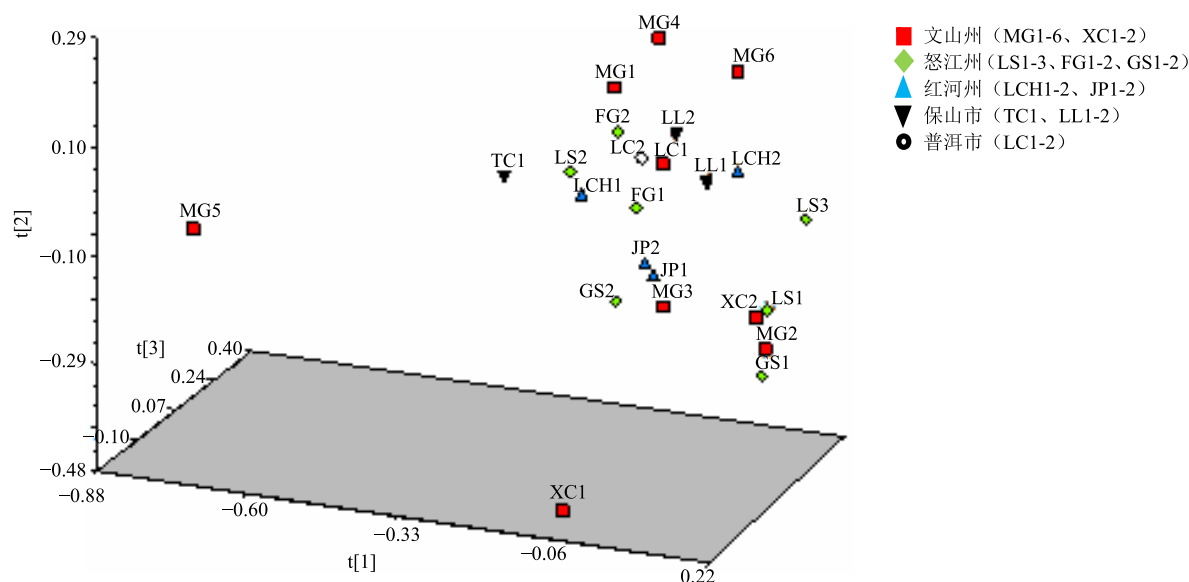


图 1 各居群的 PCoA

Fig. 1 PCoA of various populations

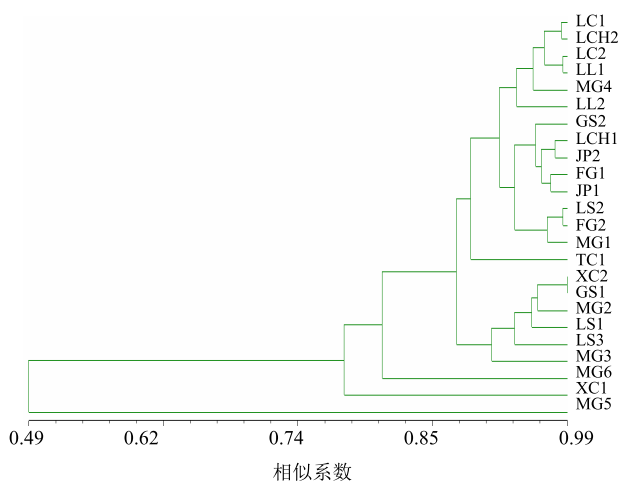


图 2 居群聚类图 (UPGMA)

Fig. 2 Population cluster (UPGMA)

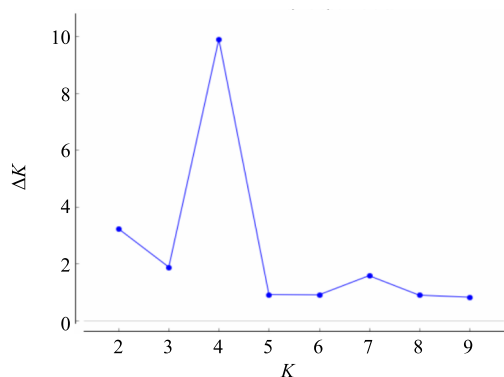


图 3 K 值与 ΔK 折线图

Fig. 3 Line graph of K value and delta K

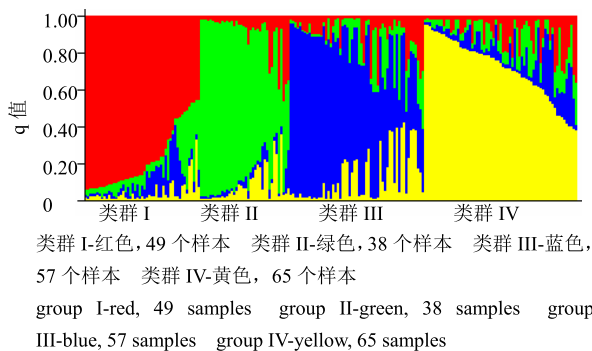


图 4 草果种质资源遗传结构

Fig. 4 Genetic structure of *A. tsao-ko* germplasm resources

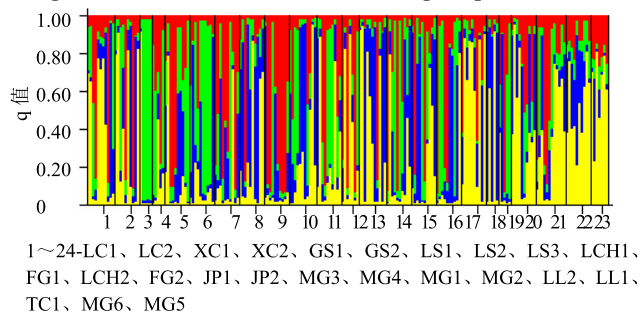


图 5 草果种质资源各居群遗传结构

Fig. 5 Genetic structure of various populations of *A. tsao-ko* germplasm resource

3 讨论

3.1 遗传多样性

H_e 被认为是衡量一个物种遗传多样性水平高低的标准^[11]。本研究表明草果的 H_e 为 0.323, 与 Nybom 的分子标记结果比较, 草果的 H_e 高于双子叶植物平均水平 ($H_e=0.191$), 表现较高的遗传多

样性。大多数居群的 H_e 水平较高, 差异不大, 19 个居群均保持在 $0.274 \sim 0.431$ 。最大值为 0.431 (JP2)。而 N_m 有助于提高植物群体的遗传多样性水平, 防止种群分化。而各居群间 N_m 的平均值为 2.9 , 最大值为 JP1 ($N_m = 5.30$)。金平作为我国草果种植的发源地之一, 在黄花草果中, JP1 与 JP2 的各项多样性参数和 F 变量均属于最高水平, 表现出最高的遗传多样性。

而马关同样作为发源地之一, MG1、MG3、MG5、MG6 多样性水平相对偏低。其中白花草果 MG5 的 H_e 最低, 由于白花品种较为稀有, 本研究仅采集到一个居群的 5 个样本, 具有局限性; 而 MG1、MG3、MG6 多是由于草果的栽培管理尚不规范, 农户没有规范意识, 草果是高度异花授粉植物, 也不具有自交不亲和系统, 植株和花都具有二型性, 使得居群内部杂合率高, 可长期保持高度的遗传多样性, 也有少量的纯合个体; 只有是草果二型性比例保持 $1:1$, 才能最大限度地发挥二型性的优势, 从而达到较高多样性水平, 而分株繁殖的居群, 打破了原有比例, 使其无法发挥二型性的优势, 多样性差, 且增加纯合子比例^[11]。

根据 Wright (1978) 对 F_{st} 与遗传分化关系进行的解释, 认为 F_{st} 为 $0 \sim 0.05$ 时, 遗传分化小; F_{st} 为 $0.05 \sim 0.15$ 时, 中等程度的遗传分化; F_{st} 为 $0.15 \sim 0.25$ 时, 遗传分化较大; F_{st} 为 0.25 以上时, 遗传分化很大。本研究黄花草果居群大部分在 0.15 以下, 唯独 XC1 和 MG6 的 F_{st} 偏大, 为 0.163 和 0.235 , 属于遗传分化较大, 它们的 N_m 分别仅有 1.3 和 0.8 。MG6 为偶然发现的无人栽培管理的草果, 据当地人介绍, MG6 号为野生草果, 但多个文献记载, 我国草果并不是乡土物种, 是 $300 \sim 400$ 年前, 由瑶族人自越南引种至文山州和红河州, 近年来又逐渐引种至云南省各地, 而马关县地处文山州^[22-24]。因此推断 MG6 是几百年前种植, 后被弃种, 多年无人管理, 一方面无新的种子和种苗, 另一方面草果是虫媒传粉, 因此基因流较为闭塞, 分化程度较大; 当然也不可排除野生的可能性。

而分子方差分析结果表明, 遗传变异主要存在于居群内, 而居群间只占一小部分, 是由于我国草果并不是乡土物种, 引入我国只有 $300 \sim 400$ 年的历史, 种质来源基本相同, 而开始大规模种植才仅几十年, 因此居群间的分化程度极小。

草果作为传统的药食两用植物, 多年来, 被用

来入药和调味。随着人们对副作用小的中成药的喜爱和对饮食口味的追求, 草果变得供不应求。于是, 经济作物草果作为云南西南部的扶贫项目被人们广泛种植, 而因种质混杂等原因, 产量通常不稳定。目前, 本课题组已筛选出多样性最强的 JP2, 为良种选育提供了丰富的实验材料。下一步, 本课题组可结合草果的结果率和草果质量等因素, 通过筛选与这些表型相关的分子标记, 进行育种提高选育质量。

3.2 亲缘关系

群体的遗传结构是遗传变异在群体内、群体间的分布以及在时间上的变化, 遗传变异是遗传结构的基础。基于不同地理来源的遗传距离的聚类分析发现草果群体大体上分为 2 个类群, 黄花草果和白花草果; 刘永国等^[25]对文山州 20 个组乡的草果进行性状和生境的调查, 结果发现文山州栽培种有白花和黄花 2 种, 黄花品种即草果普遍栽培, 白花品种即拟草果产量较低。但尚未求证本研究中的白花草果是否为拟草果。而 PCoA 和 I 与居群聚类结果相同, 均可明显地将白花及黄花草果分成 2 类。

根据 Structure 软件计算出的最佳 K 值, 黄花草果应被分为 4 个类群。黄花草果基于不同材料遗传距离的聚类, 结果发现不同的草果种质资源分布穿插于聚类图中, 没有明显的地理来源地分化(图 5), 但总体分为 4 个类群(图 4), 张薇等^[9]对云南草果主产区的种植情况进行调查, 结果发现草果种质资源按果形可分为纺锤形黄花草果、卵圆形黄花草果、近球形黄花草果和球形黄花草果 4 种类型, 它们的坐果率、产量、香味等均有明显的不同。因此推测 Structure 计算出的 4 个类群或可对应 4 种果形。居群聚类和最佳 K 值的居群结构图的结果也说明, 在基因角度, 同一个州市, 同一个县乡, 同一海拔, 甚至相邻的两株草果都有可能亲缘关系甚远, 而农民采收时同一居群的果形的明显差异较大也可侧面证明此推论。

由于草果的繁殖方法是种子繁殖和分株繁殖, 并且是虫媒传粉, 导致居群间的基因流无法提高; 由于我国草果并不是乡土物种, 是由瑶族人自越南引种至文山州和红河州, 近年来又逐渐引种至云南省各地, 种质来源基本相同; 又因种质资源混杂, 缺乏优质高产种质的筛选及品种的划分, 导致不同地区不同海拔的草果居群间没有较大的遗传距离, 并且种群的遗传分化主要存在于种群内, 高达 81% , 居群间并没有明显差距; 这些因素都会导致

种质材料被打乱,地理种源顺序重新划分。

4 种果型的草果各具特点,如球形草果果实结实率高,而卵圆型草果果实更饱满,而纺锤型草果果实香味更浓郁。可进行集中管理,在一块地只种植一种果型的草果,根据不同要求来采收、分类,并进行处理。

3.3 SSR 分子标记技术在草果遗传研究中的应用

SSR 分子标记技术因其快速、简便、多态性高的优点,在经济作物品种、野生近缘种以及药用资源的鉴定方面获得了广泛应用。在国内外,利用分子标记技术进行草果遗传方面的研究仅有2例,其研究同样利用 SSR 分子标记技术对草果遗传多样性进行研究,但讨论范围过于局限或取材范围过小,导致其研究不能涵盖整个云南省草果的遗传多样性。本研究针对云南省草果的多样性进行研究,因此范围涵盖了云南省主要种植区的5个州市的10个县乡。研究范围较广,说服力较强;并且在多个角度,利用多个软件对实验结果进行分析,分析结果更加全面。

云南黄花草果居群的遗传多样性水平平均偏高;白花草果多样性低,遗传分化程度很大,但不排除因取样较小,具有局限性。尤其 JP1 和 JP2 的多样性水平最高,可用于杂交育种,或其他方式培育新品种。遗传变异主要存在于居群内,而非居群间。根据基因型,黄花草果和白花草果被明显地划分成2类,遗传距离很远。而黄花草果大致被分为4个类群。

参考文献

- [1] 段书德,俞龙泉. 中国草果的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13443-13445.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [3] 徐国钧. 常用中药材品种整理和研究 (第3册) [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1997.
- [4] 张显努,马 钧,张文炳. 香料作物栽培新技术 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2009.
- [5] 明建鸿,胡耀华. 草果的产销动态分析 [J]. 中药材, 2004, 27(6): 499-451.
- [6] 吴德邻. 中国植物志 (第16卷第2册) [M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [7] 王正昆,杨延康. 草果栽培技术 [M]. 昆明: 云南农业科技, 2006.
- [8] 吴征镒,陈书坤. 云南植物志: 种子植物 [M]. 北京:

科学出版社, 1997.

- [9] 张 薇,杨生超,魏 翔,等. 云南草果种植发展现状及对策 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(5): 899-903.
- [10] 杨志清,胡一凡,依佩瑶,等. 云南草果种植区域调查及生态适宜性气候因素分析 [J]. 中国农业资源与区划, 2017, 38(12): 178-186.
- [11] 崔晓龙,魏蓉城. 草果遗传体系的初步研究 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1995, 17(3): 290-297.
- [12] 丁艳霞,崔秀明,戴 云. 草果的研究进展 [J]. 特产农业, 2005, 19(4): 60-63.
- [13] 郭靖琦,王慷林,刘广福,等. 草果种植对植物多样性的影响 [J]. 广西植物, 2010, 30(6): 844-849.
- [14] 严美荣. 草果遗传多样性分析及其混淆品的 ITS 序列差异比较研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2012.
- [15] Bhagwat A A, Cregan P B, Akkaya M S. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean [J]. *Genetics*, 1992, 132: 1131-1139.
- [16] Saghai-Marooof M A, Biyashev R M, Yang G P, *et al.* Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1994, 91: 5466-5470.
- [17] Wang Z, Weber J L, Zhong G, *et al.* Survey of plant short tandem DNA repeats [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 1-6.
- [18] 杨 妮,王 建. 利用 SSR 分子标记初步分析广西栽培种质资源的遗传多样性 [J]. 湖北农业科学, 2015, 54(10): 2408-2415.
- [19] 靳雅惠,苏伟敏,杨 妮,等. 桂郁金 EST 资源 SSR 信息分析及 EST-SSR 标记开发 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 37-42.
- [20] 李 欣. 居群遗传分析软件-GENALEX6 简介 [J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(4): 59-62.
- [21] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.
- [22] 刘凤玲. 红河州林下草果种植发展现状及建议 [J]. 现代园艺, 2015, 10(4): 17-18.
- [23] 付益剑,白春宏,祝建华. 云南怒江草果产业发展现状及对策 [J]. 热带农业科技, 2010, 34(1): 33-35.
- [24] 熊建秀,杨志清. 云南怒江草果产业现状及可持续发展对策 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(10): 236-237.
- [25] 刘永国,陈 宏,赵塘颀,等. 文山州草果种质资源及其生境调查 [J]. 西部林业科学, 2017, 46(5): 106-126.