

三叶青种质资源遗传多样性的 SSR 荧光标记分析

尹明华^{1*}, 徐文慧¹, 谢妮妮¹, 占学林¹, 廖玉¹, 万志庭¹, 蔡红², 陈荣华²

1. 上饶师范学院生命科学学院, 江西 上饶 334001

2. 上饶市红日农业开发有限公司, 江西 上饶 334700

摘要: **目的** 研究三叶青 64 个种质的遗传多样性和亲缘关系。**方法** 利用 SSR 荧光标记对其进行 PCR 扩增, 利用 POPGENE32 软件分析三叶青 64 个种质的遗传多样性和亲缘关系, 利用 UPGMA 法构建其亲缘关系树状图, 利用 NTSYS 软件构建其主成分分析二维图和三维散点图。**结果** 从 14 对引物中筛选出 8 对条带清晰、重复性好的引物, 对 64 份供试材料的基因组 DNA 进行扩增。8 个 SSR 标记的观察等位基因数 (N_a) 变化范围为 3~13, 均值为 7.875 0; 有效等位基因数 (N_e) 变化范围为 1.424 9~6.087 4, 均值 3.605 2; Shannon 信息指数 (I) 变化范围为 0.689 5~2.082 4, 均值 1.424 0; 观测杂合度 (H_o) 变化范围为 0.206 3~0.734 4, 均值 0.524 7; 期望杂合度 (H_e) 变化范围为 0.300 6~0.842 4, 均值 0.658 4; Nei's 基因多样性 (H) 0.298 2~0.835 7, 均值 0.653 2; 多态信息含量 (PIC) 变化范围为 0.288 0~0.817 5, 均值 0.614 5, 遗传相似系数变化范围为 0.115 4~0.954 5, 遗传距离变化范围为 0.000 0~3.218 1, 说明 64 份三叶青种质亲缘关系较远, 遗传分化程度较大。在遗传距离 1.018 9 处, 64 份三叶青种质可分为 5 大组。**结论** 地理差异与种质遗传差异无必然联系。三叶青种质资源具有丰富的遗传多样性, SSR 荧光标记分析结果可为三叶青种质资源的利用和品种选育提供一定的参考。

关键词: 三叶青; 种质资源; 遗传多样性; SSR 荧光标记分析; PCR 扩增

中图分类号: S567.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)23-5649-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.026

Genetic diversity analysis of *Tetrastigma hemsleyanum* germplasm resources based on fluorescently labeled SSR markers

YIN Ming-hua¹, XU Wen-hui¹, XIE Ni-ni¹, ZHAN Xue-lin¹, LIAO Yu¹, WAN Zhi-ting¹, CAI Hong², CHEN Rong-hua²

1. College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China

2. Shangrao Red Sun Agricultural Development Co., Ltd., Shangrao 334700, China

Abstract: Objective To understand the genetic diversity and genetic relationship of 64 samples of *Tetrastigma hemsleyanum* germplasm resources. **Methods** Fluorescently labeled SSR were used for PCR amplification, POPGENE32 software was used to analyze genetic diversity and genetic relationship of 64 samples of *T. hemsleyanum* germplasm resources, UPGMA method was used to construct their genetic tree map, NTSYS software was used to construct their two-dimensional principal component analysis map and three-dimensional scatter map. **Result** Eight pairs of primers with clear and reproducible bands were screened from 14 pairs of primers and used for genomic DNA amplification of 64 sample materials. The observed number of alleles (N_a) ranged from 3 to 13, and the mean value was 7.875 0; The effective number of alleles (N_e) ranged from 1.424 9 to 6.087 4, and the mean value was 3.605 2; The Shannon information index (I) ranged from 0.689 5 to 2.082 4, and the mean value was 1.424 0; The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.206 3 to 0.734 4, and the mean value was 0.524 7; The expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.300 6 to 0.842 4, and the mean value was 0.658 4; The Nei's gene diversity (H) ranged from 0.298 2 to 0.835 7, and the mean value was 0.653 2; The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.288 0 to 0.817 5, and the mean value was 0.614 5; The genetic similarity coefficient ranged from 0.115 4 to 0.954 5; The genetic distance ranged from 0.000 0 to 3.218 1. It was indicated that the genetic relationship of 64 *T. hemsleyanum* germplasm resources was far, and the degree of genetic differentiation was high. At the genetic distance of 1.018 9, 64 *T. hemsleyanum* germplasm resources could be divided into five groups. **Conclusion** There was no necessary connection between geographical difference and genetic difference of germplasm. *T.*

收稿日期: 2018-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31860084)

通信作者: 尹明华 (1973—), 女, 江西永新人, 副教授, 硕士, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: 864035356@qq.com

hemsleyanum germplasm resources are rich in genetic diversity. The results of fluorescently labeled SSR analysis can provide some references for the utilization and variety breeding of *T. hemsleyanum* germplasm resources.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; germplasm resources; genetic diversity; fluorescently labeled SSR analysis

三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 为葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤，其块根名为蛇附子，俗名为金丝吊葫芦，是中国特有的传统药用植物^[1]。三叶青主要以块根入药，具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛的功能^[2]，现代药理研究表明三叶青具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、调节免疫等作用^[3-4]。近年来由于经济利益的驱使，人类大量采挖三叶青野生资源，三叶青生境受到破坏，致使种群数量迅速减少，已被浙江省和江西省列为珍稀濒危保护植物。因此，很有必要进行三叶青遗传多样性研究，探讨其濒危机制。

有关三叶青遗传多样性研究，先前的工作仅在农艺性状^[5]和同工酶^[6-7]方面进行了研究，然而，农艺性状和同工酶研究观察到的植物信息量非常有限，要想更深入地了解三叶青的遗传多样性，必须对其进行更深层次（如 DNA 水平）的遗传多样性研究。目前，这方面的研究在国内外鲜见报道。朱波等^[8]利用 ISSR 分子标记技术对三叶青全国主分布区 24 份种质资源的遗传多样性 ISSR 分析进行了研究；Peng 等^[9]也对三叶青全国主分布区 27 份种质进行了遗传多样性的 ISSR 分析和 SRAP 分析，但两者研究均存在样本数量和样本选取地偏少的问题，且由于其标记本身揭示的遗传信息量有限，说服力有限。

为了进一步提高结果的准确性和可靠性，应在大量收集三叶青种质资源的基础上继续深入研究其遗传多样性，以保护我国特有的珍稀药用植物种质资源。简单重复序列（simple sequence repeats, SSR）分子标记因其两侧位点是相对保守的单拷贝序列，可根据两端序列设计特异性引物，通过 PCR 扩增、电泳来构建 DNA 指纹^[10]，因此，SSR 分子标记具有多态性强、共显性、覆盖整个基因组的编码区和非编码区、通用性高、稳定性好、操作简单等特点，成为一种新兴分子标记现广泛应用于植物遗传多样性分析、基因定位、遗传作图、品种鉴定等方面，同时，SSR 标记，还可作为联系遗传图谱、序列信息以及最终的表型差异三者之间的重要纽带^[11]。常规 SSR 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测由于不同批次的扩增条件、电泳时间和染色条件不一致，无法准确识别等位变异，基因分型结果准确性差，

而自动荧光 SSR（正链引物 5' 端标记有荧光染料）检测系统能准确读出基因片段大小、定量扩增产物、分析通量大、费用低^[12]，已经在植物遗传多样性的分析中大量运用^[13]。

上饶市红日农业开发有限公司近年来从国内各地收集引种了 64 份三叶青种质资源，为加快我国三叶青种质资源的开发和利用，本研究拟以全国 64 个三叶青品种为研究对象，使用 SSR 荧光分子标记技术对其亲缘关系进行分析，从分子水平上揭示其遗传多样性和亲缘关系，为三叶青种质资源的保护和开发利用提供依据。

1 材料

64 份三叶青样本由上饶师范学院生命科学学院王艾平教授鉴定，均为三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg，见表 1。样本取自于上饶市红日农业开发有限公司位于怀玉山的三叶青种质资源库和三叶青品种园。所有供试植株每个样本随机选取 3 株，每株采集 2 枚健康的幼叶，置于 -80 °C 超低温冰箱中保存、备用。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[10]。

2.2 PCR 扩增

SSR-PCR 荧光引物体系(共 20 μ L)包含 ddH₂O 14.8 μ L、dNTP 0.4 μ L、Buffer 2 μ L、F 0.3 μ L (20 μ mol/L)、R 0.3 μ L (20 μ mol/L)、DNA 模板 2 μ L 和 Taq 0.2 μ L。SSR-PCR 扩增程序：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，54 °C（退火温度在 54 °C 上下波动）复性 35 s，72 °C 延伸 40 s，共 35 个循环；最终 72 °C 延伸 3 min。引物信息见表 2。

2.3 毛细管电泳方法

将甲酰胺与相对分子质量内标按 100 : 1 的体积比混匀后，取 9 μ L 加入上样板中，再加入 1 μ L 稀释 10 倍的 PCR 产物。然后使用 3730XL 测序仪进行毛细管电泳，利用 Genemarker 中的 Fragment (Plant) 片段分析软件对测序仪得到的原始数据进行分析，将各泳道内相对分子质量内标的位置与各样品峰值的位置做比较分析，得到片段大小。

2.4 数据分析

一个引物为一个等位基因位点，将每个样品在

表 1 三叶青 64 份样本信息

Table 1 Information of 64 samples of *T. hemsleyanum*

样本编号	种源地	海拔/m	样本编号	种源地	海拔/m
1	江西怀玉山太阳坑	315	33	江西德兴暖水	328
2	湖南永州黄田铺	364	34	浙江景宁大漈	894
3	重庆药用植物园	1 048	35	福建蒲城县笏杯岩	394
4	湖南吉首德夯	318	36	浙江遂昌白马山	396
5	湖南张家界森林公园	1 110	37	浙江淳安大市花石源	310
6	重庆潼南县上和镇	1 128	38	浙江宁波天童寺南山	362
7	湖南怀化绥宁县党坪	612	39	江西弋阳三县岭	569
8	湖南沅陵清水坪	356	40	江西怀玉山金刚峰	457
9	重庆彭水	589	41	江西玉山横街清溪	465
10	重庆金佛山山泉镇	1 172	42	安徽黄山玉屏景区	835
11	湖南凤凰南华植物园	658	43	江西玉山必姆坳村	368
12	四川峨眉山清音阁	1 426	44	浙江宁波天童寺钟乐海	558
13	湖北星斗山	687	45	浙江丽水莲都东西岩	446
14	浙江温州永嘉四海山	386	46	浙江富阳新登外官	332
15	湖南张家界金鞭溪	603	47	福建武夷山天心永乐寺	563
16	广西乐业龙角山	996	48	浙江台州三门县花桥	563
17	广西百色富宁	1 586	49	福建三明三元吉口	550
18	广西乐业龙角山	996	50	宁波市天童寺小天童	467
19	广西桂林植物研究所	370	51	江西丰城市玉华山	752
20	贵州黄果树景区	518	52	江西婺源段莘乡五龙山	518
21	广西龙胜银水侗寨	970	53	安徽黄山凤凰源景区	648
22	广西崇仁明仁	784	54	江西贵溪樟坪畲族乡	756
23	广西龙胜花坪红毛冲	870	55	浙江舟山白泉镇	328
24	云南麻栗坡中寨村	1 700	56	福建光泽	581
25	广西桂林龙胜粗江	930	57	江西安远老鼠嘴	580
26	云南文山县古木镇	1 863	58	江西鹰潭龙虎山	386
27	贵州湄潭茅坪	1 060	59	浙江开化洪源	481
28	广东始兴都亨乡	319	60	江西南丰泰和镇果村	346
29	广东韶光仁化县	462	61	江西南昌梅岭梅谷	469
30	台湾阿里山	1 175	62	浙江金华武义柳城	324
31	海南尖峰岭森林公园	520	63	江西宜黄徐坊镇邓家	565
32	江西井冈山	672	64	福建建阳华家山林场	725

表 2 引物信息

Table 2 Information of primers

序号	引物名称	正向序列 (5'→3')	反向序列 (5'→3')
P1	Tehe158	TCTCTCTCTCACACACACAC	GGCACTGGCACATTATTT
P2	Tehe220	ACACACACACACAGAGAGAGAG	ATGAATAAGCCCAGACTACAC
P3	Tehe272	ACACACACACACAGAGAGAGAG	GGAGGACCTGTTATTTGGA
P4	Tehe17	TCTCTCTCTCTCACACACACAC	ATCATCCAACCAGACCCT
P5	Tehe135	TCTCTCTCTCTCACACACACAC	ATCACAGACGCATAAGGG
P6	Tehe153	TCTCTCTCTCTCACACACACAC	AGCCGTCTAAGAATAAGTTG
P7	Tehe44	ACACACACACACAGAGAGAGAG	TACAGTCACCACGGCAAT
P8	Tehe10	TCTCTCTCTCTCACACACACAC	CTTCTCAATGGCATCCTG
P9	Tehe234	TCTCTCTCTCTCACACACACAC	AGCAGAAAAGGCTGGAAA
P10	Tehe187	TCTCTCTCTCTCACACACACAC	CTCTGGTGAGGAGGTTGG
P11	Tehe166	TCTCTCTCTCTCACACACACAC	GCCCAAAGTCATCAATCA
P12	Tehe82	ACACACACACACAGAGAGAGAG	CTAAGGGCATGGACAAGA
P13	Tehe63	ACACACACACACAGAGAGAGAG	AGTAGAAGACCGTATGTTAGC
P14	Tehe5	ACACACACACACAGAGAGAGAG	GGTCATTGCCTGTGCTAA

各个等位基因位点的片段大小，即其表现型，按照 Convert 1.31 软件要求的格式录入到 EXCEL 中，然后用 Convert 1.31 软件转化成 POPGENE 软件所要求格式。使用 POPGENE32 软件进行统计分析。用 POPGENE32 软件计算以下参数：多态位点百分率 (percent of polymorphic loci, PPL); 有效等位基因数 (effective number of alleles per loci, N_e); 期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e); 观察杂合度 (observed heterozygosity, H_o); 多态信息含量 (PIC) 先通过 POPGENE32 计算出群体的基因型频率再通过 PIC 小软件计算; 用 Nei 的遗传一致度 (genetic identity, I) 和遗传距离 (genetic distance, D) 来衡量各种群之间的遗传分化大小。基于遗传距离, 采用 UPGMA 法进行聚类分析。

3 结果与分析

3.1 DNA 检测结果

64 份三叶青种质材料经 CTAB 方法提取 DNA, 经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其完整性良好 (图 1), 并用核酸测定仪测定其质量, 结果表明, 提取的 DNA 质量较好, 其 A_{260}/A_{280} 值 1.73~2.00, 可以作为进行 SSR-PCR 扩增的模板。

3.2 PAGE 引物筛选结果

用部分三叶青资源对 SSR 引物进行筛选。筛选的依据是 SSR 引物的扩增谱带清晰且重复性好。根据 PAGE 检测结果 (图 2), 选择引物 P1~14 这 14 对引物进行 64 个样品批量实验。

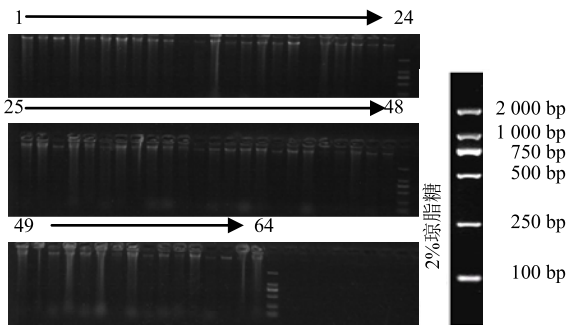


图 1 DNA 凝胶电泳检测图

Fig. 1 DNA detection diagram

3.3 毛细管检测结果

利用 64 份三叶青种质的总 DNA 为模板检验 8 对 SSR 标记的多态性情况。8 个 SSR 标记的观察 N_a 变化范围为 3~13, 均值为 7.875 0; N_e 变化范围为 1.424 9~6.087 4, 均值 3.605 2; I 变化范围为 0.689 5~2.082 4, 均值 1.424 0; H_o 变化范围为 0.206 3~0.734 4, 均值 0.524 7; H_e 变化范围为 0.300 6~

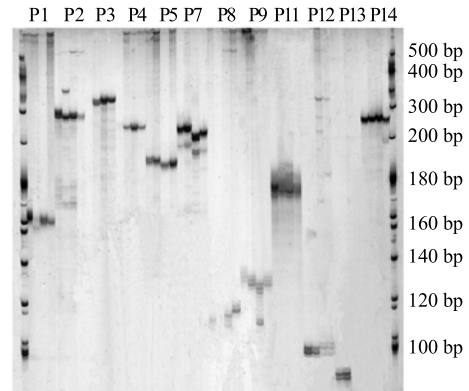


图 2 PAGE 检测结果

Fig. 2 PAGE detection results

0.842 4, 均值 0.658 4; H 为 0.298 2~0.835 7, 均值 0.653 2; PIC 变化范围为 0.288 0~0.817 5, 均值 0.614 5, 标记 Tehe44 的 PIC 最高, 为 0.817 5, 标记 Tehe272 最低, 为 0.288 0 (表 3)。Tehe10 标记在 10 号和 11 号三叶青样本的基因分型结果见图 3。

3.4 遗传距离和遗传相似系数

遗传相似系数和遗传距离是衡量居群间物种种源变异水平的重要指标, 反映品种间的遗传分化程度和亲缘关系的远近。64 份三叶青种质的遗传相似系数在 0.115 4~0.954 5, 遗传距离在 0~3.218 1。说明 64 份三叶青种质亲缘关系较远, 遗传分化程度较大。

3.5 聚类分析

利用软件 NTsys2.10e 进行主坐标分析显示, 并根据第 1 和第 2 主成分构建主成分分析二维图 (图 4) 和三维散点图 (图 5), 图中材料间位置相互靠近者表示亲缘关系较近, 远离者表示亲缘关系较远。根据材料在图中的位置分布特征可知, 64 份三叶青种质遗传分化程度较高。

为进一步探讨 64 份三叶青种质的遗传关系, 对 64 份三叶青种质的遗传距离进行 UPGMA 聚类分析 (图 6)。在遗传距离为 1.273 5 处, 64 份三叶青种质可分为 2 大组: 第一组包括 1 (江西怀玉山太阳坑)、44 (浙江宁波天童寺钟乐海)、19 (广西桂林植物研究所)、59 (浙江开化洪源)、55 (浙江舟山白泉镇)、32 (江西井冈山)、50 (宁波市天童寺小天童)、45 (浙江丽水莲都东西岩)、7 (湖南怀化绥宁县党坪)、37 (浙江淳安大市花石源)、18 (广西乐业龙角山)、36 (浙江遂昌白马山)、4 (湖南吉首德夯)、25 (广西桂林龙胜粗江)、23 (广西龙胜花坪红毛冲)、24 (云南麻栗坡中寨村); 剩下

表 3 8 对 SSR 标记在 64 份三叶青种质中的多态性检测

Table 3 Polymorphisms of eight pairs of SSRs in 64 *T. hemsleyanum* germplasm resources

位点	样本数量	N_a	N_e	I	H_o	H_e	H	PIC
Tehe10	128	8	4.628 2	1.734 0	0.734 4	0.790 1	0.783 9	0.754 8
Tehe44	126	13	6.087 4	2.082 4	0.587 3	0.842 4	0.835 7	0.817 5
Tehe82	128	3	2.050 1	0.792 3	0.640 6	0.516 2	0.512 2	0.409 2
Tehe135	126	6	2.590 7	1.195 3	0.460 3	0.618 9	0.614 0	0.554 2
Tehe158	120	8	4.074 7	1.620 3	0.233 3	0.760 9	0.754 6	0.723 7
Tehe220	124	7	2.574 7	1.254 0	0.725 8	0.616 6	0.611 6	0.570 1
Tehe234	128	12	5.410 8	2.024 0	0.609 4	0.821 6	0.815 2	0.798 2
Tehe272	126	6	1.424 9	0.689 5	0.206 3	0.300 6	0.298 2	0.288 0
均值	126	7.875 0	3.605 2	1.424 0	0.524 7	0.658 4	0.653 2	0.614 5

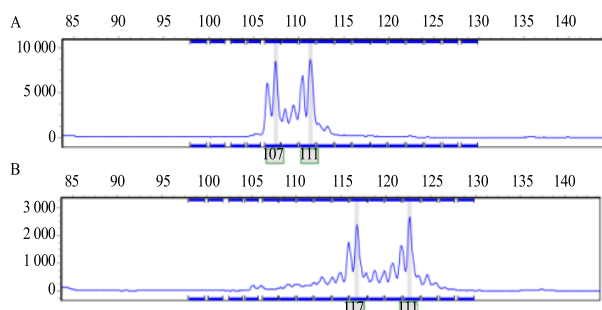


图 3 Tehe10 标记在 10 号 (A) 和 11 号 (B) 三叶青样本的基因分型

Fig. 3 Genotyping by Tehe10 marker for No.10 (A) and No.11 (B) samples of *T. hemsleyanum*

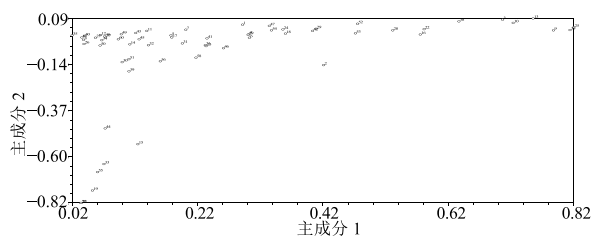


图 4 64 份三叶青种质基于 8 对 SSR 引物的的主坐标分析

48 份三叶青种质均属于第 2 组。

在遗传距离为 1.018 9 处, 64 份三叶青种质可分为 5 大组: 第 1 组只包括 63 (江西宜黄徐坊镇邓家) 号样本; 第 2 组包括 23 (广西龙胜花坪红毛冲) 号样本和 24 (云南麻栗坡中寨村) 号样本; 第 3 组包括 4 (湖南吉首德夯) 和 25 (广西桂林龙胜粗江) 号样本; 第 4 组包括 1 (江西怀玉山太阳坑)、44 (浙江宁波天童寺钟乐海)、19 (广西桂林植物研究所)、59 (浙江开化洪源)、55

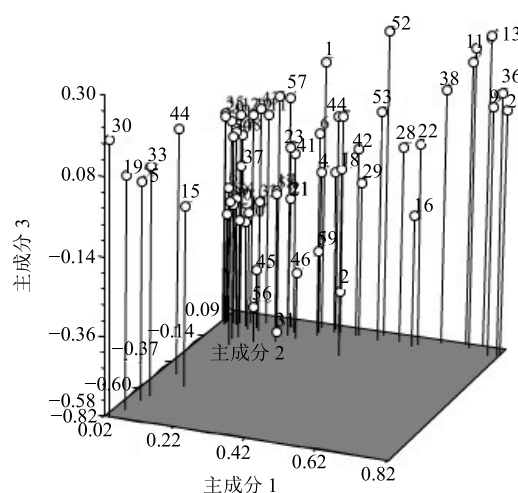


图 5 64 份三叶青种质的主成分分析三维散点图

Fig. 5 3D-scatterplot based on first, second, and third principal components of 64 *T. hemsleyanum* germplasm resources

(浙江舟山白泉镇)、32 (江西井冈山)、50 (宁波市天童寺小天童)、45 (浙江丽水莲都东西岩)、7 (湖南怀化绥宁县党坪)、37 (浙江淳安大市花石源)、18 (广西乐业龙角山)、36 (浙江遂昌白马山) 号样本。剩下 47 份三叶青种质均属于第 5 组。

4 讨论

种质资源积累了自然和人工引起的遗传变异, 蕴藏着极其丰富的基因类型, 这些丰富的基因类型不仅是新品种选育的依据, 也是作物遗传、分类等基础生物学研究的重要材料^[14]。对于种质资源遗传多样性的研究可以揭示和评估种质的遗传特性, 提高种质资源利用的效率。三叶青是中国特有珍稀高山药用植物, 开发利用三叶青资源是高山地区脱贫

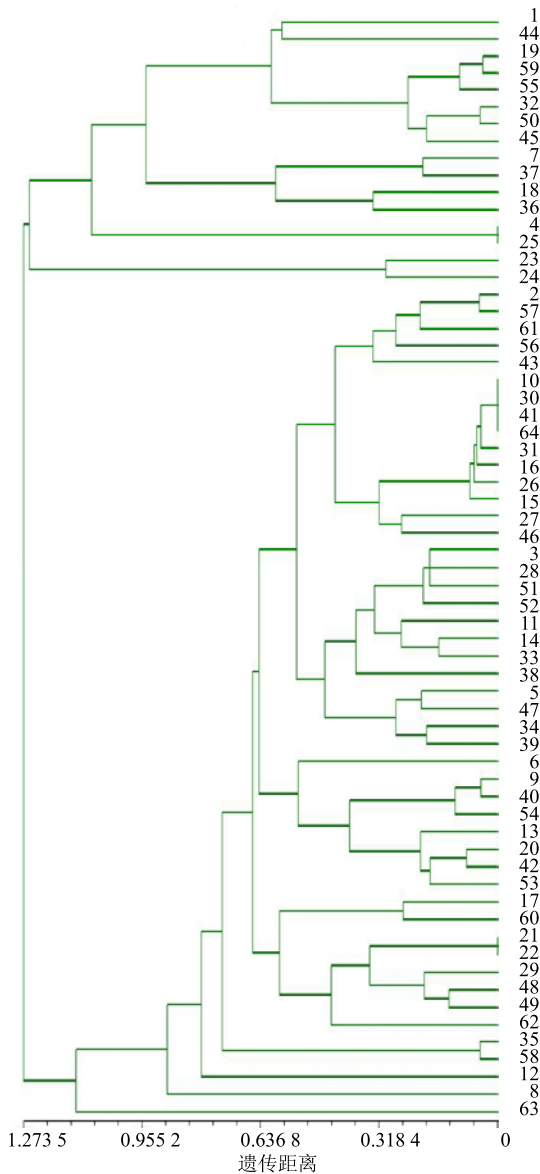


图 6 64 份三叶青种质的聚类分析 (UPGMA)

Fig. 6 Cluster analysis of 64 *T. hemsleyanum* germplasm resources based on genetic distance (UPGMA)

致富的重要途径之一。三叶青具有丰富的多样性变异, 不同三叶青品种在产量和抗病性方面有较大差异, 但其分类比较混乱, 目前有关三叶青种质遗传多样性和分类研究鲜见报道。因此, 选择适宜的技术手段对三叶青种质资源进行遗传多样性分析, 为提高三叶青种质的利用效率和品种选育具有重要意义。

目前对三叶青种质的分类鉴定主要集中在基于农艺性状的分类^[5], 后有学者从同工酶^[6-7]等生理生化的角度寻求新的分类方法, 但生理生化的方法易受环境和实验条件影响, 结果存在一定的局限

性。近年来, 随着分子生物学的不断发展, 从 DNA 水平上对植物遗传多样性进行快速、准确、不受环境影响的鉴定成为可能。三叶青遗传多样性 DNA 分子标记的研究近几年得到了关注。朱波等^[8]和 Peng 等^[9]利用 ISSR 和 SRAP 分子标记技术分别对三叶青全国主分布区 24 份种质资源和 27 种质资源的遗传多样性进行了研究, 但样本数量和样本选取地偏少, 导致群体内遗传相似性高于群体间, 且栽培群体间的遗传相似性远高于野生群体。

荧光 SSR 毛细管电泳基因分型技术相比较传统的高分辨率琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳易操作、耗时少、通量大、价格低, 且准确率高、重复性好^[15-16]。在参试个体数量较多的情况下, 甚至可以采用多重 PCR, 更加节约成本、增大通量^[17]。在利用银染法聚丙烯酰胺凝胶电泳检测时, 同一胶板上所有样品带谱间相对位置的识别以及不同胶板得到的 SSR 数据的整合会给数据收集和分析带来很大的困难^[18]。SSR 荧光标记毛细管电泳法是基于高通量测序仪为平台的检测方法^[19], 采用不同颜色的荧光染料标记 SSR 引物, 扩增的 PCR 产物和标准分子量样品 (内标) 在同一毛细管泳道中电泳^[20], 利用软件进行图像收集和分析扩增片段的大小, 实现了数据收集和处理的自动化, 克服了银染法的不足, 被认为是目前遗传多样性分析或种质资源鉴定和评价最为有效的工具之一^[21-23]。

Hamrick 等^[24]认为, 寿命长、地理分布广的物种大多有较高的遗传多样性。Nybom^[25]也认为, 多年生、广布种在植物种群水平 H 和 I 的平均值分别为 0.25 和 0.22, 若为双子叶植物, 其居群水平的 H 的平均值为 0.19^[26]。在本研究中, 64 个三叶青种质观察 N_a 均值为 7.875 0, N_e 均值 3.605 2, I 均值 1.424 0, H_o 均值 0.524 7, H_e 均值 0.658 4, H 均值 0.653 2, 遗传相似系数在 0.115 4~0.954 5, 遗传距离在 0~3.218 1, 表明三叶青 64 个品种资源基因组 DNA 的多态性较高, 遗传分化程度较高。PIC 还是用来衡量某个基因位点等位变异程度高低的指标。本研究筛选的 8 对 SSR 引物, PIC 均值为 0.614 5, 具有较高的多态性, 究其原因, 一方面可能是由于本研究的 SSR 引物多态性好, 区分性高; 另一方面可能是与供试三叶青种质的丰富程度和广泛来源有关。庞广昌等^[27]认为, 物种居群间的遗传多样性水平越高, 表明该物种适应的环境就越广。在本研究中, 64 份三叶青种质的 SSR 能够很好地反映品

种间的亲缘关系,遗传多样性水平较高,表明三叶青适应高山环境的能力较强,利用 SSR 分子标记对 64 份三叶青种质进行划分是有效的。

有研究表明,紫藤三叶青分布于江西、浙江山区,青色藤三叶青分布于福建、湖南、四川、广东、广西、云南的部分地区,二者生长地域界限分明,不混合生长^[28]。但朱波等^[8]对三叶青遗传多样性的 ISSR 分析结果表明,24 份样品被分为 4 大类,浙江种质全部聚在第一类,第 2 类以江西、广西、湖北、湖南等种质为主,湖南怀化与广西钟山为第 3 类,贵州种质单独聚为第 4 类。在本研究中,在遗传距离为 1.018 9 处,64 份三叶青种质可分为 5 大组:第 1 组只包括 63 (江西宜黄徐坊镇邓家) 号样本;第 2 组包括 23 (广西龙胜花坪红毛冲) 和 24 (云南麻栗坡中寨村) 号样本;第 3 组包括 4 (湖南吉首德夯) 和 25 (广西桂林龙胜粗江) 号样本;第 4 组包括 1 (江西怀玉山太阳坑)、44 (浙江宁波天童寺钟乐海)、19 (广西桂林植物研究所)、59 (浙江开化洪源)、55 (浙江舟山白泉镇)、32 (江西井冈山)、50 (宁波市天童寺小天童)、45 (浙江丽水莲都东西岩)、7 (湖南怀化绥宁县党坪)、37 (浙江淳安大市花石源)、18 (广西乐业龙角山)、36 (浙江遂昌白马山)。剩下 47 份三叶青种质均属于第 5 组。其中,江西、广西、湖南的三叶青种质归为第 4 组,这与朱波等^[8]的研究结果一致,说明聚类结果与地理区域具有一定相关性。但 63 (江西宜黄徐坊镇邓家) 单独属于第一组,39 (江西弋阳三县岭)、33 (江西德兴暖水)、40 (江西怀玉山金刚峰)、41 (江西玉山横街清溪)、43 (江西玉山必姆坳村)、51 (江西丰城市玉华山)、52 (江西婺源段莘乡五龙山)、54 (江西贵溪樟坪畲族乡)、57 (江西安远老鼠嘴)、58 (江西鹰潭龙虎山)、60 (江西南丰泰和镇果村) 号样本则与湖北、湖南、福建、浙江部分种质归为第 5 组。这表明,聚类结果与地理区域还是存在一定的偏差性,研究结果显示地理差异与种质遗传差异没有必然的联系,这与不同地域芝麻种质资源的遗传多样性研究结果相一致^[29]。在江西三叶青种质中,既可与湖北、湖南、福建、广西等地三叶青种质聚为一类,也可与浙江三叶青种质聚为一类。这种现象说明,江西有可能是三叶青遗传多样性的起源中心或是三叶青各类种源的过渡区。

参考文献

[1] 刘崑艳,周以飞,李 清,等. 三叶青的蒸腾作用与气

孔结构研究 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2610-2617.

- [2] 李朝奎. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 许 文,傅志勤,林 婧,等. UPLC-MS/MS 法同时测定三叶青中 10 种黄酮类成分 [J]. 药学学报, 2014, 49(12): 1711-1717.
- [4] 许 文,傅志勤,林 婧,等. HPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-QqQ-MS 的三叶青主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4365-4372.
- [5] 朱 波,华金渭,程文亮,等. 不同种源三叶青农艺性状比较 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(10): 1752-1756.
- [6] 袁带秀,吕江明. 不同种源地三叶青的 POD 同工酶比较 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38(7): 50-51.
- [7] 袁带秀,侯 娟. 3 个不同种源地三叶青酯酶同工酶比较研究 [J]. 湖南农业科学, 2010(21): 34-36.
- [8] 朱 波,华金渭,刘 昆,等. 珍稀药材三叶青种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(5): 914-919.
- [9] Peng X, Ji Q Y, Fan S W, et al. Genetic diversity in populations of the endangered medicinal plant *Tetrastigma hemsleyanum* revealed by ISSR and SRAP markers: implications for conservation [J]. *Genet Resources Crop Evol*, 2015, 62(7): 1069-1078.
- [10] 左力辉,韩志校,梁海永,等. 不同产地中国李资源遗传多样性 SSR 分析 [J]. 园艺学报, 2015, 42(1): 111-118.
- [11] 宪立杰,刘兴菊,李雪雁,等. 葡萄种质遗传多样性的 SSR 分析及指纹库构建 [J]. 北方园艺, 2013(1): 87-90.
- [12] 刘晓鑫,谢传晓,赵 琦,等. 基于 SSR 荧光标记技术的玉米群体混合样本基因频率分析方法 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 3991-3998.
- [13] 王瑞云,季 煦,陆 平,等. 利用荧光 SSR 分析中国糜子遗传多样性 [J]. 作物学报, 2017, 43(4): 530-548.
- [14] 陈 斐,魏臻武,李伟民,等. 基于 SSR 标记的首蓿种质资源遗传多样性与群体结构分析 [J]. 草地学报, 2013, 21(4): 759-768.
- [15] Liesebach H, Schneck V, Ewald E. Clonal fingerprinting in the genus *Populus* L. by nuclear microsatellite loci regarding differences between sections, species and hybrids [J]. *Tree Genet Genom*, 2010, 6(2): 259-269.
- [16] Faria D A, Mamani E M C, Jr G J P, et al. Genotyping systems for *Eucalyptus* based on tetra-, penta-, and hexanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests [J]. *Tree Genet Genom*, 2011, 7(1): 63-77.
- [17] Drašnarová A, Krak K, Vít P, et al. Cross-amplification and multiplexing of SSR markers for *Alnus glutinosa* and *A. incana* [J]. *Tree Genet Genom*, 2014, 10(4): 865-873.

- [18] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 等. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析 [J]. 作物学报, 2005, 31(2): 144-149.
- [19] Kong Q S, Zhang, G P, Chen W C, *et al.* Identification and development of polymorphic EST-SSR markers by sequence alignment in pepper, *Capsicum annuum* (Solanaceae) [J]. *Am J Bot*, 2012, 99(2): 59-61.
- [20] Wayne P, Gordon C M, Jim P. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. *Trends Plant Sci*, 1996, 1(7): 215-222.
- [21] 王 瑞, 张福耀, 程庆军, 等. 利用 SSR 荧光标记构建 20 个高粱品种指纹图谱 [J]. 作物学报, 2015, 41(4): 658-665.
- [22] 郑永胜, 张 晗, 王东建, 等. 基于荧光检测技术的小麦品种 SSR 鉴定体系的建立 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(19): 3725-3735.
- [23] 张明泽, 姚玉仙, 陈世军. 黔南 60 份茶树种质资源遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(6): 1117-1124.
- [24] Hamrick J L, Godt M J W. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1990.
- [25] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. *Mol Ecol*, 2004, 13(5): 1143-1155.
- [26] Nybom H, Bartish I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Persp Plant Ecol Evol Syst*, 2000, 3(2): 93-114.
- [27] 庞广昌, 姜冬梅. 群体遗传多样性和数据分析 [J]. 林业科学, 1995, 31(11): 543-549.
- [28] 钱丽华, 戴丹丽, 姜慧燕, 等. 濒危药用植物三叶青研究进展 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(7): 1301-1308.
- [29] 岳文娣, 魏利斌, 张体德, 等. 芝麻种质资源 SSR 标记遗传多样性与群体结构分析 [J]. 作物学报, 2012, 38(12): 2286-2296.