

广西地不容 SSR 标记开发及遗传多样性研究

上官琰¹, 赵渤旻², 谢 晖¹, 汪亚勤¹, 康 云^{1*}, 黄建明^{1*}

1. 复旦大学药学院, 上海 201203

2. 华盛顿大学, 美国 西雅图 98105

摘要: **目的** 基于广西地不容转录组序列开发 SSR 引物, 并用于该物种自然居群遗传多样性的研究。**方法** 从广西地不容转录组测序获得的 unigene 序列中挖掘 SSR 位点, 采用 Oligo 7.0 软件设计引物, 通过电泳法筛选得到多态性高的 SSR 引物用于遗传多样性研究。**结果** 从广西地不容转录组 20 637 条 unigene 序列中, 搜索到 6 833 个 SSR 位点, 出现频率为 33.11%。基于转录组序列设计 50 对引物, 筛选得到 10 对多态性高的引物。10 对引物在 5 个居群 63 个样本中共扩增得到 83 个条带, 有效条带百分率为 100%, 多态性信息量 (PIC) 为 0.688 9。在物种水平和居群水平上, Nei 基因多样性指数 (H) 分别为 0.725 2 和 0.613 4, Shannon 多样性指数 (I) 分别为 1.576 6 和 1.220 3, 观察杂合度 (H_o) 分别为 0.584 5 和 0.558 4, 期望杂合度 (H_e) 分别为 0.731 2 和 0.643 5。居群的遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.146 5, 基因流 (N_m) 为 1.456 9。UPGMA 聚类分析表明, 5 个居群可分为 3 支系。**结论** 开发的 SSR 标记适用于广西地不容的遗传多样性分析。广西地不容在物种和居群水平上均具有较高的遗传多样性, 遗传分化主要存在于居群内部。

关键词: 广西地不容; 转录组; SSR; 遗传多样性; 多态性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)24-5910-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.026

SSR marker development and genetic diversity analysis of *Stephania kwangsiensis*

SHANGGUAN Yan¹, ZHAO Bo-yang², XIE Hui¹, WANG Ya-qin¹, KANG Yun¹, HUANG Jian-ming¹

1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

2. University of Washington, Seattle, Washington 98105, United States

Abstract: Objective To develop simple sequence repeat (SSR) molecular markers based on *Stephania kwangsiensis* transcriptome and to evaluate genetic diversity of *S. kwangsiensis* in natural populations. **Methods** The unigenes from *S. kwangsiensis* transcriptome were used to explore SSR loci. SSR primers were designed by oligo 7.0. Polymorphic primers were selected by electrophoresis and were applied to the investigation of the genetic diversity of *S. kwangsiensis*. **Results** A total of 6 833 SSR loci (33.11%) were obtained from 20 637 unigenes in the *S. kwangsiensis* transcriptome. Of the 50 SSR markers tested, ten pairs of highly polymorphic primers were selected to analyze the genetic polymorphisms of 63 individuals from five populations. Ten primers produced 83 band loci, all (100%) of which were polymorphic, and the polymorphism information content (PIC) was 0.688 9. At the species level and population level, the Nei's gene diversity (H) was 0.725 2 and 0.613 4, respectively; the Shannon's Information index (I) was 1.576 6 and 1.220 3, respectively; The observed heterozygosity (H_o) was 0.584 5 and 0.558 4, respectively; The expected heterozygosity (H_e) was 0.731 2 and 0.643 5, respectively. The genetic differentiation coefficient (F_{st}) was 0.146 5 and the gene flow (N_m) was 1.456 9. Based on UPGMA cluster analysis, the five populations of *S. kwangsiensis* were divided into three clusters. **Conclusion** The developed SSR markers were applicable to the genetic diversity evaluation of *S. kwangsiensis*. The genetic diversity of this plant was relatively high at both species level and population level. The genetic differentiation mainly existed within populations.

Key words: *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo; transcriptome; SSR; genetic diversity; polymorphism

收稿日期: 2018-05-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31100238)

作者简介: 上官琰 (1991—), 女, 硕士, 研究方向为中草药资源品质评价与群体遗传学。E-mail: 14211030024@fudan.edu.cn

*通信作者 康 云, 男, 讲师, 研究方向为药用植物分类学与群体遗传学。Tel: (021)51980131 E-mail: ykang123@fudan.edu.cn

黄建明, 女, 副教授, 研究方向为中草药资源品质评价及活性成分。Tel: (021)51980132 E-mail: jmhuang@shmu.edu.cn

广西地不容 *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo 系防己科 (Menispermaceae) 千金藤属 *Stephania* L. 植物, 主要分布于广西壮族自治区和云南省^[1]。广西地不容的块根称为“金不换”, 作为广西壮族等少数民族的常用草药沿用已久, 已收载入《广西中药材标准》, 具有清热解毒、散瘀消肿、健胃止痛等功效^[2], 也是生产镇痛药颠痛定的主要原料^[3-4]。广西地不容主要来源于野生资源, 块根生长缓慢, 近几十年的过度采挖和生境破坏使其资源受到了严重威胁, 已属濒危物种^[5]。根据本课题组多年的跟踪调查, 该种的资源蕴藏量仍在持续衰减。因而, 有必要研究广西地不容的遗传多样性, 为其种质资源的保护和利用提供科学依据。

目前, 应用于广西地不容遗传多样性研究的分子标记有 RAPD 和 ISSR^[5-6], 这 2 种分子标记法都为显性遗传, 所呈现的遗传差异性有限, 扩增产物是非特异的, 且重现性不佳。简单重复序列分子标记 (simple sequence repeat, SSR), 又称为微卫星 DNA, 具有多态性丰富, 在基因组中分布广泛, 呈共显性遗传, 特异性较强, 重现性好, 数据可进行交流和比较等优点, 已被应用于遗传多样性分析、品种鉴定和亲缘关系研究等领域^[7]。但传统 SSR 标记也因开发难度大、周期长而受到一定的应用限制。近年来, 转录组测序技术的发展得以高通量获得大量的分子标记信息, 为高效、准确地开发 SSR 标记提供了有利条件, 因而基于转录组开发 SSR 的方法近年备受青睐^[8-11]。

本研究根据广西地不容转录组测序的结果开发 SSR 引物, 在此基础上对广西地不容 5 个居群的 63 个样品进行遗传分析, 以揭示广西地不容在物种水平和居群水平的遗传多样性以及居群间的遗传关系, 为其野生资源的保护和分子标记辅助育种等方面提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 样品采集

于 2014 年和 2016 年在广西省采集 5 个居群的 63 份样品 (表 1), 经复旦大学药学院康云讲师鉴定为广西地不容 *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo。转录组测序用的样品为新鲜嫩叶, 于干冰中冷冻保存。其他样品在野外采集后用变色硅胶快速干燥。

1.2 仪器与试剂

MLS-3020CH 型高压蒸汽灭菌器 (Sanyo); 高通量组织研磨仪 (上海必横生物技术有限公司);

表 1 广西地不容样品来源

Table 1 Sample sources of *S. kwangsiensis*

居群	样品号	采集地点	样本数量
JS	1~11	广西靖西县金山	11
FHS	12~24	广西靖西县凤凰山	13
PM	25~42	广西那坡县平孟镇	18
NM	43~58	广西那坡县弄民村	16
DJ	59~63	广西田阳县洞靖镇	5

台式高速冷冻离心机 (Eppendorf Centrifuge 5417R); Tanon 4500SF 型凝胶成像系统 (上海天能科学仪器生产商); DY-501B 型电泳仪 (上海琪特分析仪器有限公司); DYCZ-28D 型电泳槽 (北京市六一仪器厂); 微量核酸蛋白测定仪 (赛默飞有限公司); AG22331PCR 仪 (Eppendorf, 德国); 水浴锅 (上海羌强实业发展有限公司)。

Axygen DNA 提取试剂盒购于上海必横生物技术有限公司; rTaq 酶, dNTP Mixture, 10×PCR Buffer, 琼脂糖 (大连 TaKaRa 技术有限公司); TAE、PBS 缓冲液购于上海双螺旋生物科技有限公司。

2 方法

2.1 转录组测序与 SSR 位点查找

由上海嘉甄生物科技有限公司对广西地不容新鲜嫩叶进行转录组测序。采用 Illumina Hiseq 4000 测序平台进行测序, 原始测序数据过滤后, 采用软件 Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>) 对滤过的高质量数据进行组装, 共获得 20 637 条 unigenes。

2.2 转录组 SSR 位点筛选

利用 Msatcommander 软件对广西地不容的 unigene 序列进行 SSR 位点搜索。筛选标准: 单碱基重复不予统计, 二碱基至少重复 6 次、三至四碱基至少重复 5 次、五至六碱基至少重复 3 次。

2.3 引物设计与筛选

采用 Oligo 7.0 软件设计引物。针对 SSR 位点查找的结果, 在二、三、四、五、六重复单元的位点中分别设计出 10 对引物, 共设计出 50 对引物, 委托上海生工生物工程股份有限公司进行合成。通过琼脂糖凝胶电泳和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选出具有多态性的引物。筛选获得的多态引物将在其 5'端添加羟基荧光素标记 (FAM), 进行荧光引物的合成。

2.4 DNA 提取与 PCR 扩增

采用 Axygen DNA 提取试剂盒提取广西地不容

叶片的总 DNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪检测 DNA 的质量和纯度。

优化的 PCR 反应体系为 25 μ L, 包括: 统一稀释到 20 ng/L 的 DNA 模板 2 μ L, 5 U/ μ L 的 rTaq 酶 0.2 μ L, 10 μ mol/L 的正、反相引物各 0.75 μ L, 每种 2.5 mmol/L 的 dNTP Mixture 2 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, 超纯水 ddH₂O 16.8 μ L。

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 退火 (50~58 $^{\circ}$ C 因引物而异) 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 持续 10 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。利用荧光引物获得的 PCR 产物送往上海生工有限公司, 运用毛细管电泳检测产物的等位基因片段。

2.5 数据分析

采用 Popgene 32 软件计算遗传参数, PIC_CALC 0.6 软件分析多态性含量, 利用 NTSYS-pc (2.10e) 软件, 用 SAHN (sequential agglomerative hierarchical nested cluster analysis) 功能, 对遗传一致度矩阵按照非加权配对算数平均法 (unweighted pair group with arithmetic average, UPGMA) 进行聚类分析。

3 结果与分析

3.1 广西地不容转录组 SSR 的分布与特征

利用 Msatcommander 软件对广西地不容中 20 637 条 unigene 序列进行搜索, 共在 4 792 条 unigene 中找到符合条件的 SSR 位点信息, SSR 发

生频率为 23.22%; 检索到的 SSR 位点数量为 6 833 个, 其出现频率为 33.11%。广西地不容转录组 SSR 种类丰富, 二至六核苷酸重复均有分布。其中三核苷酸的数量最多, 占到总数量的 42.40%; 四核苷酸的分布最少, 仅为总量的 2.74% (表 2)。在广西地不容转录组 6 833 个 SSR 位点中, 共观察到 910 种重复基元, 其中六核苷酸重复基元数量最多, 有 506 种; 其次为五核苷酸重复基元, 有 242 种; 二、三、四核苷酸重复基元数量分别为 12、60、90 种。

3.2 引物筛选

设计的 50 对 SSR 引物利用琼脂糖凝胶电泳筛选出 21 对能稳定扩增出清晰主条带的引物, 再经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选得到 10 对多态性高的引物。引物信息见表 3。

表 2 广西地不容转录组 SSR 重复基元特征

Table 2 Sequence features of SSR motifs in *S. kwangsiensis* transcriptome

重复类型	数目	比例/%	总长度/bp	平均长度/bp
二核苷酸	1 664	24.35	26 152	16
三核苷酸	2 897	42.40	50 919	18
四核苷酸	187	2.74	3 896	21
五核苷酸	494	7.23	8 230	17
六核苷酸	879	12.86	16 974	19
复合型	712	10.42	16 380	23

表 3 广西地不容的 10 对多态性 SSR 引物

Table 3 Characteristics of ten polymorphic SSR primers for *S. kwangsiensis*

编号	重复基元	引物序列 (5'→3')	退火温度/ $^{\circ}$ C
P23	(ATGA) ₆	F: CATTGATCCATCCTTTCAGGGTT R: CACGTCCCTCTTCTATGAGACC	53
P29	(GGCT) ₆	F: CCCTTGAAGGCTTGTACAGA R: TGGGCTATACACAAACAACAGA	52
P34	(ACCAG) ₅	F: AGAGCACAACAAGTATCCAGT R: AGCAGTTGTTCTTCTCTCCAC	52
P39	(AAAAT) ₅	F: ACTCAGATTACATCCAAATGCG R: TTTTCTTCCGAGTCTTGACA	50
P40	(TGTGA) ₅	F: GAAGAAGCCATTCCCGACCTG R: TTCACGAACGCGAATCCAACC	58
P42	(GGAGGT) ₄	F: TTGCGCTCGATCAGGAAGGTCTC R: CTCTCATTACGCTCCTCACACA	58
P47	(TGTGCG) ₄	F: TTTCTTCACTGCAAGCGCAAC R: CTCCCACTCCGTACAACACC	51
P48	(AGAGCC) ₄	F: TAAATGCATCGAACCCGCCTTG R: CGGAACCAACTGCTGCTAC	55
P49	(TGCTGA) ₄	F: AAAGAAAGATGAGACCTCGT R: GAAAATCCGCCAAGTCGAAG	53
P50	(GCATTG) ₄	F: CCCCAAATATCTCCTTACCAC R: CACGAGTTCTCCGATACCTC	58

3.3 遗传多样性分析

通过 10 对多态性引物,对广西地不容 5 个居群的 63 个样本进行遗传多样性分析。

从位点的多态性来看,共扩增出 83 个等位位点,均具有多态性,多态性位点百分比为 100%,不同引物扩增得到的等位位点从 5 个(P48)到 13 个(P29)不等,每对引物平均扩增等位位点为 8.3 个。从 10 个标记位点的等位基因来看,观测等位基因数(A)、有效等位基因数(A_e)的范围分别为 5~13、1.727 2~7.249 3,两者的平均值分别为 8.300 0、4.307 5。 A 和 A_e 的变化规律一致,最高的位点均为 P29,最低的位点都是 P48。从各位点的群体遗传学参数上看,Nei 基因多样性指数(H)、Shannon 多样性指数(I)、

观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态性信息量(PIC)的平均值分别为 0.725 2、1.576 6、0.584 5、0.731 2、0.688 9(表 4)。以上数据表明,各 SSR 位点的多态性水平较高,广西地不容物种水平的遗传多样性较高。

从群体的角度来看(表 5),根据 A 、 H 、 I 得到的居群遗传变异由高向低的顺序均为 NM>PM>FHS>JS>DJ; A_e 的评价结果稍有差异,依次为 PM>NM>FHS>JS>DJ。广西地不容不同居群内遗传多样性水平较高,居群之间遗传多样性水平存在差异。除洞靖居群外,其余居群间的遗传多样性水平差异较小,洞靖居群的遗传数据偏低可能与样本量较少有关。

表 4 不同位点的广西地不容遗传多样性分析

Table 4 Analysis on genetic diversity of *S. kwangsiensis* at different locus

位点	A	A_e	I	H_o	H_e	H	PIC
P23	7.000 0	3.022 0	1.308 6	1.000 0	0.674 5	0.669 1	0.613 6
P29	13.000 0	7.249 3	2.211 6	0.492 1	0.869 0	0.862 1	0.847 9
P34	6.000 0	3.789 1	1.433 8	0.451 6	0.742 1	0.736 1	0.692 1
P39	11.000 0	4.215 1	1.729 6	0.375 0	0.769 6	0.762 8	0.733 1
P40	7.000 0	4.307 1	1.613 2	0.619 0	0.774 0	0.767 8	0.733 2
P42	7.000 0	5.132 5	1.732 7	0.688 5	0.811 8	0.805 2	0.776 7
P47	8.000 0	5.274 3	1.789 8	0.508 2	0.817 1	0.810 4	0.784 3
P48	5.000 0	1.727 2	0.706 4	0.365 1	0.424 4	0.421 0	0.350 7
P49	9.000 0	2.413 1	1.253 1	0.645 2	0.590 3	0.585 6	0.543 3
P50	10.000 0	5.945 5	1.987 5	0.700 0	0.838 8	0.831 8	0.814 4
平均值	8.300 0	4.307 5	1.576 6	0.584 5	0.731 2	0.725 2	0.688 9

表 5 广西地不容不同居群的遗传多样性分析

Table 5 Analysis on genetic diversity of *S. kwangsiensis* populations

居群	A	A_e	I	H_o	H_e	H
JS	4.800 0	3.189 4	1.272 5	0.564 9	0.689 1	0.655 9
FHS	5.400 0	3.407 6	1.329 9	0.601 1	0.687 5	0.659 2
PM	5.700 0	3.834 9	1.377 4	0.622 5	0.687 5	0.669 3
NM	6.100 0	3.789 9	1.429 7	0.603 6	0.704 7	0.680 8
DJ	2.700 0	1.840 2	0.692 4	0.400 0	0.448 8	0.401 9

3.4 居群的遗传分化和基因流

F 统计量和基因流(N_m)见表 6。 F_{is} 有 3 个位点(P23、P48、P49)为负值,其余各位点均为正值,范围为 0.082 2~0.315 6,平均值为 0.094 8, F_{is} 出现了负值,说明杂合子过剩; F_{it} 在 P23 和 P48 位点处表现为负值,其余位点均为正值,范围为 0.198 0~0.434 9,平均值 0.227 4。 F_{it} 和 F_{is} 的结果提示,广西地不容在总群体和亚群体水平上均存在

一定的近交现象。

广西地不容居群的遗传分化系数(F_{st}) 在 0.053 9~0.264 2,平均值为 0.146 5,表明其有中等程度的遗传分化,85.35%的遗传变异来自居群内部,14.65%的遗传变异来自居群之间,遗传分化主要存在于居群内部。广西地不容居群的 N_m 在 0.696 1~4.390 6,平均值为 1.456 9,说明居群间存在着一定的基因交流。

表 6 广西地不容群体 F_{st} 及 N_m Table 6 Genetic differentiation coefficient and gene flow among *S. kwangsiensis* populations

位点	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
P23	-0.511 3	-0.429 9	0.053 9	4.390 6
P29	0.314 0	0.401 2	0.127 1	1.716 5
P34	0.299 6	0.411 0	0.159 1	1.321 5
P39	0.315 6	0.434 9	0.174 4	1.183 5
P40	0.135 5	0.297 5	0.187 4	1.084 2
P42	0.082 2	0.224 3	0.154 8	1.365 2
P47	0.279 4	0.410 9	0.182 4	1.120 8
P48	-0.049 3	0.227 9	0.264 2	0.696 1
P49	-0.172 4	-0.078 6	0.079 9	2.877 7
P50	0.098 2	0.198 0	0.110 6	2.010 0
平均值	0.094 8	0.227 4	0.146 5	1.456 9

3.5 居群遗传距离和遗传一致度分析

根据 Nei 的计算方法对 5 个广西地不容居群进行遗传距离和遗传一致度的统计分析。居群间遗传距离的范围为 0.076 0~0.686 1, 其中遗传距离最近的是平孟 (PM) 和弄民 (NM) 居群, 遗传距离最远的是平孟 (PM) 和洞靖 (DJ) 居群。遗传一致度的范围是 0.556 5~0.926 8, 其中遗传相似度最高的为 PM 和 NM 居群, 最低的为 PM 和 DJ 居群。遗传距离分析和遗传一致度分析得出的结论一致。

3.6 聚类分析

根据 Nei's 遗传一致度对广西地不容各居群进行 UPGMA 聚类分析, 结果见图 1。遗传相似度较大的平孟和弄民居群首先聚为一支, 遗传相似度为 0.93; 遗传相似度在 0.84 时, 金山与凤凰山居群聚为一支, 2 支在遗传相似度为 0.76 附近汇聚; 洞靖居群单独为一支。以遗传距离的聚类结果与以遗传一致度的结果基本一致。

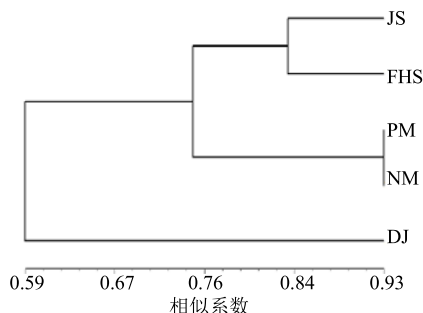


图 1 广西地不容居群的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of *S. kwangsiensis* populations

4 讨论

SSR 分子标记研究的必要前提和技术难点是引物开发。本研究基于广西地不容转录组测序数据开发 SSR 引物, 比传统 SSR 标记开发和从全基因组开发引物成本低、周期短、难度低, 又较 EST-SSR 可提供更多的信息。但是, 由于真核生物转录本中存在内含子剪切, 导致 SSR 引物无法结合上全基因组 DNA, 因而需对引物进行严格的筛选和检验。本研究中从设计的 50 对引物中最终筛选得到 10 对多态性较高的引物。

广西地不容为濒危物种, 狭域分布^[5]。2012—2016 年连续 5 年, 本课题组对文献和标本馆查询到的广西地不容分布区进行了实地调研, 结果表明该物种资源仍进一步衰减; 原有的一些产区已经很难寻到野生样品或者只有零星的个体, 难以在群体水平上进行采样, 比如广西凌云县、田林县、田东县和德保县。因此, 对于广西地不容, 在较大区域范围采集到群体水平的样品已十分困难, 本实验以个体数量相对较多的 5 个居群评价其遗传多样性。

采用 10 对 SSR 引物对广西地不容 5 个居群 63 个样品进行了遗传多样性研究。有效条带百分率为 100%。在物种水平上, 广西地不容的 H 为 0.725 2, I 为 1.576 6, 显示出较高的遗传多样性。此外, 与覃艳^[6]用 ISSR 和 RAPD 法获得的广西地不容遗传多样性数据比对, RAPD 法得到的 H 与 I 值分别为 0.328 4 和 0.491 2, ISSR 法测得的 H 和 I 值分别为 0.337 9 和 0.505 5, 都显著低于 SSR 法的测得值, 反映出 SSR 分子标记法可以检测出更多的遗传多样性。

虽然在一般情况下认为, 物种遗传多样性水平的高低与其濒危程度存在一定的负相关, 但是也存在一些濒危植物呈现较高的遗传多样性水平的现象。Zhang 等^[12]认为大部分遗传多样性反映的不是群体的适应性, 而是其群体的历史动态。因此, 广西地不容资源匮乏与其具有较高的遗传多样性并不矛盾。分析广西地不容的生长特性及繁育系统, 该植物多分布在石灰岩地区, 长势非常缓慢, 个体寿命长; 为雌雄异株植物, 主要通过有性生殖繁育后代; 植株种子结实量较大。这些特征有利于遗传变异的积累和传承, 从而具有较高水平的遗传多样性。

遗传分化是反映遗传结构的重要指标。本实验以 SSR 法得到广西地不容居群的 F_{st} 为 0.146 5, N_m 为 1.456 9, 揭示居群具中等程度的遗传分化, 遗传

变异主要分布在居群内个体间,居群间具有中等程度的分化。这与覃艳采用 ISSR 和 RAPD 研究得到的结论一致^[6]。

影响遗传结构的因素很多,如突变、基因流、选择和遗传漂变,以及繁育系统、进化历史、种子传播机制、习性、物候、演替阶段、分布范围、和环境等。广西地不容主要借助昆虫、鸟、风力等进行花粉传播,造成了居群间相对较大的基因流动($N_m=1.4569$),阻止了居群间遗传分化的发生。广西地不容的居群较小,居群内的个体数量也较少,基因流可以减轻小居群间近交衰退和遗传变异的减少,对于濒危植物的保护非常有利。但是在某些情况下,基因流会通过远交衰退降低适合度,阻止居群的适应性分化,也会对小居群带来不利的影响。因此,应特别关注基因流在广西地不容居群保护中的作用,一旦发现基因流在世代间的变化较大时要引起注意。

广西地不容居群遗传多样性较高,说明广西地不容资源受到威胁的主要原因不在于遗传变异上。导致某些物种濒危的主要原因是生境的破坏以及资源的过度利用,而遗传多样性水平属于次要原因^[13-15]。但是从长远来看,生境的破坏造成居群隔离和个体数量锐减,必将造成物种遗传多样性的减少,最终导致物种趋于灭亡。因此,对于广西地不容的种质资源保护应实行就地保护,注意其生境的维护,防止过度采挖。广西地不容的遗传变异主要来自居群内部,因而在实施就地保护时可以从重点保护单元入手,如弄民(NM)居群的遗传多样性最高,可考虑作为优先保护单元。小范围的就地保存将更有效率地达到物种保护目的。此外,在维持居群的自然更新能力的同时也可采取适当的人为干预,如辅助种子流和花粉流来减少群体自交,以促进其遗传多样性的保持。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第30卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 (第2册) [M]. 广西: 广西科学技术出版社, 1996.
- [3] 罗昱澜, 李江, 毛柳琚, 等. 广西地不容生物碱化学成分、药理及质量控制研究进展 [J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(2): 304-306.
- [4] 邓业成, 徐汉虹. 广西地不容块根生物碱成分研究 [J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2004, 22(4): 73-77.
- [5] 覃艳, 黄宁珍, 赵志国, 等. 广西地不容种质资源的 ISSR 分析 [J]. 广西植物, 2007, 27(3): 406-409.
- [6] 覃艳. 广西地不容种质资源遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 的分析 [D]. 南宁: 广西师范大学, 2006.
- [7] Semagn K, Rnstad B, Ndjiondjop M N. An overview of molecular marker methods for plants [J]. *Afr J Biotechnol*, 2006, 25(5): 2540-2568.
- [8] 王丽鹭. 基于 EST 数据库和转录组测序的茶树 DNA 分子标记开发与应用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [9] Yan L P, Liu C L, Wu D J, et al. De novo transcriptome analysis of *Fraxinus velutina* using illumina platform and development of EST-SSR markers [J]. *Biol Plantarum*, 2017, 61(2): 210-218.
- [10] Chahota R K, Shikha D, Rana M, et al. Development and characterization of SSR markers to study genetic diversity and population structure of horsegram germplasm (*Macrotyloma uniflorum*) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2017, 35(5): 550-561.
- [11] 陈中苏直, 田波, 蔡传涛. 基于 SSR 分子标记的滇重楼遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1834-1838.
- [12] Zhang Y P, Ge S. Molecular evolution study in China: Progress and future promise [J]. *Philos T R Soc B*, 2007, 362(1482): 973-986.
- [13] 孙圣. 基于 SSR 标记的血皮槭天然群体遗传变异研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [14] 谢凤瑞, 杜凡, 王娟, 等. 澜沧江自然保护区珍稀濒危保护植物研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(26): 14562-14565.
- [15] 杨继红. 中国濒危物种野生玫瑰的遗传多样性及其影响因素研究 [D]. 济南: 山东大学, 2009.