

基于 ISSR 和 SRAP 标记的栀子种质遗传多样性研究

姜 武¹, 吴志刚¹, 陶正明^{1*}, 蔡胡敏²

1. 浙江省亚热带作物研究所, 浙江 温州 325005

2. 泰顺县林业局, 浙江 温州 325599

摘要: 目的 对栀子遗传多样性进行研究, 为栀子资源保护和新品种培育提供依据。方法 采用 12 条 ISSR 和 9 对 SRAP 分子标记, 以 3 个居群 21 份栀子种质资源为材料, 通过多态性检测水平、遗传多样性比较和聚类分析, 揭示栀子种质资源遗传多样性。结果 ISSR 引物和 SRAP 引物分别扩增出 125 和 80 条带数, 多态性条带数分别为 100 和 74, 多态性比率(PPB) 分别为 80.00%和 92.50%, 栀子居群的总体物种水平的等位基因观察数(N_a)分别为 1.461 3 和 1.579 2, 有效等位基因数(N_e) 分别为 1.307 7 和 1.342 1, Nei's 基因多样性指数(H) 分别为 0.173 1 和 0.197 4, Shannon's 指数(I) 分别为 0.254 5 和 0.295 9; 遗传多样性分析结果表明, ISSR 和 SRAP 标记中 3 个居群之间的遗传多样性(H_t) 分别为 0.239 1 和 0.289 9, 种间遗传多样性(H_s) 分别为 0.173 1 和 0.197 4, 基因分化系数(G_{st}) 分别为 0.276 2 和 0.318 9, 即 72.38%和 68.11%的遗传变异在种群内进行, 居群间基因流(N_m) 分别为 1.310 3 和 1.068 0, 证明居群间存在一定的基因流动($N_m > 1$); UPGMA 聚类分析表明, ISSR 和 SRAP 标记将栀子资源分为 2 个类群, 且以 SRAP 分析的聚类结果更符合实际居群。结论 取样栀子种质有丰富的遗传多样性, 遗传分化主要发生在居群内, SRAP 标记更适合用于栀子遗传多样性分析, 对栀子资源的保护和育种提供了参考。

关键词: 栀子; 分子标记; 遗传多样性; 育种; ISSR; SRAP

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)02-0510-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.033

Genetic diversity analysis of *Gardenia jasminoides* based on ISSR and SRAP molecular markers

JIANG Wu¹, WU Zhi-gang¹, TAO Zheng-ming¹, CAI Hu-min²

1. Zhejiang Institute of Subtropical Crops, Wenzhou 325005, China

2. Taishun Country Forestry Bureau, Wenzhou 325599, China

Abstract: Objective To analyze of genetic diversity of *Gardenia jasminoides* and provide the information for the conservation and new variety breeding of *G. jasminoides*. **Methods** 12 ISSR primers and 9 primer combinations of SRAP were used to assess the polymorphisms, genetic diversity, and cluster analysis within 21 *G. jasminoides* materials from three populations. **Results** The results showed that 100 (80.00%) of 125 and 74 (92.50%) of 80 bands were polymorphic by ISSR and SRAP primers amplification, respectively. In ISSR results, the populations of species level of observed number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Nei's gene diversity (H), Shannon's information index (I), total genetic diversity for species (H_t), and the mean heterozygosity with populations (H_s) were 1.461 3, 1.307 7, 0.173 1, 0.254 5, 0.239 1, and 0.173 1, respectively. Comparatively, for SRAP primers, the N_a , N_e , H , I , H_t , and H_s value was 1.579 2, 1.342 1, 0.197 4, 0.295 9, 0.289 9, and 0.197 4, respectively. The coefficient of gene differentiation (G_{st}) for population was 0.276 2 and 0.318 9, which indicated that the within-population component accounted for 73.38% and 68.11%, respectively. The average mean of gene flow ($N_m > 1$) suggested that there certainly gene flow among the populations. UPGMA analysis showed that 21 samples were clustered into 2 branches, and a hierarchical dendrogram based on SRAP was more consistent with actual populations. **Conclusion** The gene diversity of *G. jasminoides* populations was high. The characteristics of genetic structure included genetic differentiation that occurs mainly within populations, which provided a reference for conservation and breeding of *G. jasminoides* germplasm.

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; molecular markers; genetic diversity; breeding; ISSR; SRAP

收稿日期: 2018-06-09

基金项目: 浙江省农业(中药材)新品种选育重大科技专项(2016C02058-3); 温州市种子种苗科技创新专项(Z20160012)

作者简介: 姜 武(1987—), 男, 助理研究员, 研究方向为中药材新品种选育及质量控制。E-mail: jiangwu8888@163.com

*通信作者 陶正明(1970—), 男, 副研究员, 研究方向为中药材新品种选育及质量控制。Tel: (0577)88526876 E-mail: zmtao2002@aliyun.com.cn

梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 属常绿灌木, 性寒、味苦, 具泻火除烦、清热利湿、凉血解毒之功效^[1]。历代本草名著对其用途、生态分布、形态、产地均有记载, 近代梔子主要分布于我国东部、中部、西南部各省区, 且以四川、江西、湖南、浙江等省为主产区^[2]。梔子主要含有环烯醚萜类、色素、胆碱等活性成分, 现代药理学研究表明^[3], 以梔子苷、绿原酸、西红花苷类等为代表的药用成分具有抗炎、利胆、保肝、调节血脂等作用。梔子不仅是重要的中药资源, 也是化工、食品工业的重要原料, 其中天然梔子黄色素是我国传统染料, 因其着色力强、色泽鲜艳、色调自然柔和、稳定性好、安全性强、无毒副作用成为当前国际上流行的天然食品添加剂, 且需求量逐年增大, 具有较高的经济价值^[4-5]。

当前, 研究人员对梔子的化学成分、药理作用等方面有较多的研究^[6-8], 而梔子遗传多样性等相关领域的研究略显薄弱, 影响梔子种质资源的保护及新品种的选育。梔子在全国范围内栽培面积较大, 栽培类型多样, 其中以江西、湖南两省种植面积最大, 种植推广的梔子品种约有 10 个^[9]。然而, 不同产地的同种药材除遗传组成不同外, 生长地点的气候、土壤和地形等环境因素也会对药材产生影响^[10]。分子生物技术在种质鉴定及道地性鉴别有稳定可靠的优势, 近年来, 有少量利用 ISSR、RAPD、SCoT 技术对江西省^[11-12]、四川省^[13]、河南

省^[14]等地梔子遗传多样性的研究报道, 但未见有针对浙江产梔子相关分子标记研究的报道。本研究利用 ISSR 和 SRAP 技术对梔子 3 个居群 (浙南、华中、西南) 21 个样品的遗传多样性进行研究, 为梔子的道地性研究提供依据, 以更好的保护、开发及选育现有的种质资源。

1 材料

2017 年 7—8 月, 在江西、四川、湖南、福建、贵州、浙江省各采样点 (表 1) 采集生长良好的梔子 *G. jasminoides* Ellis 叶片, 采集幼嫩的叶片用于 DNA 提取, 一个 DNA 样品为同一采样地的 5 株不同植株叶片共同研磨提取所得。梔子样品经浙江省亚热带作物研究所陶正明副研究员鉴定后, 置于存有变色硅胶密封袋中干燥保存。样品来源 3 个居群: 浙南 (ZN) 13 个; 华中 (HZ) 4 个; 西南 (XN) 4 个。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取

采用 VWI 的 plant DNAzol 试剂进行基因组 DNA 提取, 按组织破碎、DNA 沉淀、DNA 清洗、DNA 溶解去杂步骤, 将每个梔子样品逐一提取 DNA, 核酸蛋白分析仪测定其质量浓度和质量分数, 统一稀释至 20 ng/ μ L, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后于 -20 °C 保存待用。

2.2 引物筛选

分别从 50 条 ISSR 引物和 88 对 SRAP 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性明显的 12 条 ISSR 引物和 9 对 SRAP 引物, 引物序列见表 2。

表 1 梔子种质样品信息

Table 1 Information of germplasm of *G. jasminoides*

编号	采样点	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m	居群
1	浙江省永嘉县桥下镇	120°33'59.70"	28°10'14.08"	101	浙南 (ZN)
2	浙江省永嘉县金溪镇	120°32'19.18"	28°17'19.18"	408	浙南 (ZN)
3	浙江省淳安县临岐镇	119°14'02.77"	29°56'12.87"	445	浙南 (ZN)
4	浙江省平阳县昆阳镇	120°29'46.33"	27°41'01.936"	404	浙南 (ZN)
5	浙江省苍南县五凤乡	120°17'41.43"	27°24'32.66"	312	浙南 (ZN)
6	浙江省温州市大罗山 (溪沟边野生)	120°45'42.77"	27°50'44.38"	62	浙南 (ZN)
7	浙江省温州市大罗山 (灌丛林野生)	120°46'58.20'	27°55'14.01"	194	浙南 (ZN)
8	浙江省泰顺县彭溪镇 (百年生)	120°13'46.91"	27°26'33.75"	446	浙南 (ZN)
9	浙江省泰顺县彭溪镇 (2 年生)	120°14'28.01"	27°26'24.97"	430	浙南 (ZN)
10	浙江省泰顺县百丈镇 (10 年生)	119°53'03.69"	27°37'35.43"	464	浙南 (ZN)
11	浙江省泰顺县彭溪镇 (20 年生)	120°13'15.24"	27°27'02.12"	305	浙南 (ZN)
12	浙江省文成县周壤镇	120°09'37.86"	27°50'28.60"	508	浙南 (ZN)
13	江西省婺源县清华镇	117°46'51.87"	29°25'52.55"	126	华中 (HZ)
14	江西省新干县界埠镇	115°18'47.47"	27°44'45.01"	122	华中 (HZ)
15	江西省金溪县双塘镇	116°42'39.07"	28°05'49.09"	159	华中 (HZ)
16	四川省资中县新桥镇	104°43'36.89"	29°45'09.91"	437	西南 (XN)
17	湖南省浏阳市柏加镇	113°15'30.24'	28°02'07.42'	76	华中 (HZ)
18	湖北省武汉市木兰乡	114°26'48.83"	31°06'46.89"	110	西南 (XN)
19	福建省福鼎市分水关	120°15'11.88"	27°25'39.31"	295	浙南 (ZN)
20	贵州省德江县青龙镇	108°10'08.65"	28°15'41.22"	710	西南 (XN)
21	贵州省丹寨县兴仁镇	107°48'42.63"	26°19'57.55"	828	西南 (XN)

表 2 ISSR 引物和 SRAP 引物组合的扩增结果

Table 2 Amplification results of ISSR primers and SRAP primers

ISSR 引物	序列 (5'→3')	扩增条带数	多态性条带数	PPB/%
UBC807	(AG) ₈ T	12	11	91.67
UBC808	(AG) ₈ C	11	7	63.64
UBC815	(CT) ₈ G	10	9	90.00
UBC817	(CA) ₈ A	13	9	69.23
UBC822	(TC) ₈ A	8	6	75.00
UBC825	(AC) ₈ T	9	4	44.44
UBC827	(AC) ₈ G	10	8	80.00
UBC844	(CT) ₈ RC	9	9	100.00
UBC847	(CA) ₈ RC	14	13	92.86
UBC850	(GT) ₈ YC	9	9	100.00
UBC856	(AC) ₈ YA	9	7	77.78
UBC868	(GAA) ₆	11	8	72.73
平均值		10.42	8.33	80.00
总计		125	100.00	

SRAP 引物	序列 (5'→3')	扩增条带数	多态性条带数	PPB/%
ME2+EM2	BAGC	8	8	100.00
	DTGC			
ME2+EM6	BAGC	9	8	88.89
	DGCA			
ME2+EM7	BAGC	8	7	87.50
	DCAA			
ME4+EM1	BACC	8	8	100.00
	DAAT			
ME4+EM4	BACC	12	10	83.33
	DTGA			
ME4+EM11	BACC	7	7	100.00
	DCCA			
ME5+EM3	BAAG	9	9	100.00
	DGAC			
ME5+EM7	BAAG	10	9	90.00
	DCAA			
ME8+EM11	BTGC	9	8	88.89
	DCCA			
平均值		8.89	8.22	92.50
总计		80	74	

R=(A, G) Y=(C, T) B=TGAGTCCAAACCGG D=GACTGCGTACGAATT

选取最佳退火温度为 52 °C。其 PCR 反应体系为 25 μL 体系: 12.5 μL 高效率的 2× 预混型 Taq 酶, 1 μL 浓度为 10 mmol/L 的引物, 模板 DNA 含量 40~60 ng, 补水至 25 μL。ISSR-PCR 以及 SRAP-PCR 的扩增程序为 94 °C、5 min; 94 °C、30 s, 52 °C、30 s, 72 °C、2 min, 共 35 个循环。最后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。反应产物 ISSR 和 SRAP 采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 5×TBE 缓冲液, 150 V 跑胶 1 h。电泳结束后紫外凝胶成像系统下观察拍摄, 并保存。

2.3 数据采集与分析

从凝胶成像系统得到电泳谱带中, 选取清晰可辨的电泳条带, 在同一位点有清晰谱带的记为“1”, 缺失的记为“0”, 组成 0/1 矩阵, 分别得到 ISSR、SRAP 和二者混合数据 (ISSR+SRAP) 形成的 3 个遗传数据 0/1 矩阵。采用 PopGen 1.32 软件计算

多态位点百分率 (PPB)、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) 和 Mantel 检验地理距离和遗传距离相关性, 采用 Ntsys 软件进行 UPGMA 和 PCoA 分析。

3 结果与分析

3.1 ISSR、SRAP 多态性分析

在 ISSR 研究中, 用筛选的 12 条引物 (表 2) 对 21 份栀子材料进行扩增, 共扩增出 125 条条带, 其

中多态性条带 100 条, 各引物检测到的 PPB 为 44.44%~100%, 平均为 80.00%, 其中以 UBC844 和 UBC850 扩增多态性比例最高。在 SRAP 研究中(表 2), 筛选出的 9 对引物扩增结果表明, 各引物检测到的 PPB 为 83.33%~100%, 21 个样品共检测到 80 条特异性条带, 其中多态性条带 74 个, 平均 PPB 为 92.50%, 且以 ME4+EM4 组合的多态性位点最多, 有 12 个。

12 条 ISSR 引物和 9 对 SRAP 引物对栀子叶片模板 DNA 进行了 PCR 扩增, 建立了相应的 DNA 指纹图谱, ISSR 中以引物 UBC847 分辨力最高, SRAP 中引物 ME4+EM4 扩增条带最清晰(图 1), 表明 ISSR 引物和 SRAP 引物建立的 DNA 指纹图谱可以清楚区分 3 个居群栀子药材。

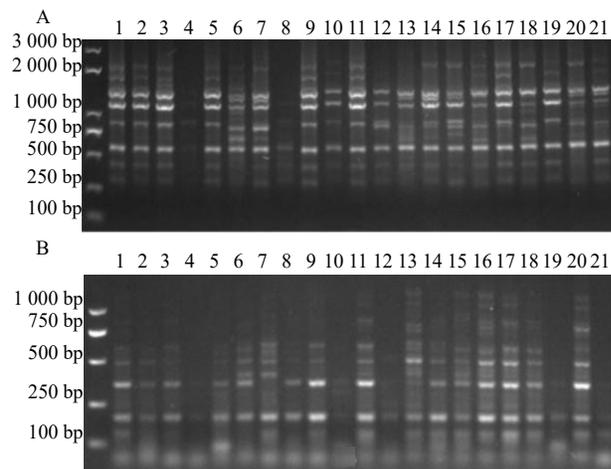


图 1 ISSR 引物 UBC847 (A) 和 SRAP 引物 ME4+EM4 (B) 对 21 份栀子总 DNA 的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of total DNA based on ISSR primer (A: UBC847) and SRAP primer (B: ME4 + EM4) from 21 types of *G. jasminoides*

3.2 ISSR、SRAP 遗传多样性分析

基于分子标记的栀子居群遗传多样性结果如表 3、4 所示, 在 ISSR 研究中, 21 个种源总体物种水平的 N_a 为 1.800 0, N_e 为 1.476 3, H 为 0.276 9, I 为 0.413 8, PPB 为 80.00%。将 21 个种源按分布地分 3 个居群, 各居群的 N_a 变化幅度 1.296 0~1.744 0, 平均 1.461 3; N_e 变化幅度 1.214 7~1.488 2, 平均 1.307 7; H 变化幅度 0.120 6~0.272 1, 平均 0.173 1; I 变化幅度 0.175 7~0.399 4, 平均 0.254 5; PPB 变化幅度 29.60%~74.40%, 平均 46.13%, 相对于群体而言, 小于 21 个种源间的变异水平; 3 个居群之间的遗传多样性 H_t 为 0.239 1, 种间遗传多样性 H_s 为 0.173 1, 基因分化系数 G_{st} 为 0.276 2, 即居群间遗传

变异占居群遗传变异的 27.62%, 72.38% 的遗传变异在种内进行; 种群间的 N_m 为 1.310 3, 证明居群间存在一定的基因流动。在 SRAP 研究中, 3 个居群 PPB 变化幅度 42.50%~72.50%, 平均 57.92%; G_{st} 为 0.318 9, 即 68.11% 的遗传变异发生在种内。基于 SRAP 的各遗传多样性参数与 ISSR 研究结果类似, 为揭示更精细的栀子基因遗传多样性, 本研究采用了 ISSR+SRAP 数据相结合为基础分析栀子的基因变异。将 2 种分子标记相结合的分析结果显示, 物种水平的 N_a 为 1.848 8, N_e 为 1.474 1, H 为 0.278 8, I 为 0.420 2, PPB 为 84.88%; 各居群的 N_a 变化幅度 1.375 6~1.736 6, 平均 1.507 3; N_e 变化幅度 1.236 7~1.430 2, 平均 1.321 1; H 变化幅度 0.137 2~0.244 8, 平均 0.182 6; I 变化幅度 0.204 6~0.365 7, 平均 0.270 6; 3 个居群之间的遗传多样性 H_t 为 0.258 9, 高于种间遗传多样性 H_s 为 0.182 6, 基因分化系数 G_{st} 为 0.294 8, 即居群间遗传变异占居群遗传变异的 29.48%, 70.52% 的遗传变异在种内进行, 验证了居群间存在一定的基因流动, 居群间的 N_m 为 1.195 8 ($N_m > 1$)。

3.3 聚类分析

利用分子标记扩增的条带矩阵得到栀子 3 个居群的 Nei's 遗传相似系数及遗传距离(表 5)和 UPGMA 聚类图(图 2)。ISSR 数据中居群之间的遗传距离为 0.042 2~0.150 5, 遗传相似系数为 0.860 3~0.958 6, 西南居群和华中居群相似系数最大, 表明这 2 个居群的亲缘关系较近, 遗传相似程度最高。利用 ISSR 矩阵数据得到的 UPGMA 聚类图(图 2)显示, 在相似系数 0.82 处, 西南居群中的资中种源、武汉种源、德江种源和凯里种源聚在一起, 和实际居群一致, 其余种源并不能有效聚类, 除了在相似系数 0.74 处, 浙南居群中的平阳种、泰顺(百年生)种、泰顺(10 年生)种和文成种被聚在一起; 类似结果在 ISSR+SRAP 聚类图(图 2)中显示, 在相似系数 0.76 处, 浙南居群中的平阳种、泰顺(百年生)种、泰顺(10 年生)种、福鼎种和文成种被聚在一起, 其余种源在相似系数 0.69 处被聚成一类; 与实际居群分类最接近的是基于 SRAP 矩阵数据得到的 UPGMA 聚类图(图 2), 在相似系数约 0.70 处, 3 个居群 21 个种源被分为 2 大类, I 类群为浙南居群, II 类群为西南居群和华中居群聚成一类; 通过对 SRAP 标记结果进行主坐标分析生成三维图(图 3), 其结果与 UPGMA 聚类分析结果一致。

表 3 梔子居群遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *G. jasminoides* populations

居群	N_a	N_e	H	I	PPB/%
ISSR					
浙南 (ZN)	1.744 0±0.438 2	1.488 2±0.407 4	0.272 1±0.208 2	0.399 4±0.286 7	74.40
华中 (HZ)	1.344 0±0.477 0	1.220 1±0.354 6	0.126 6±0.189 1	0.188 3±0.272 8	34.40
西南 (XN)	1.296 0±0.458 3	1.214 7±0.357 8	0.120 6±0.193 6	0.175 7±0.277 9	29.60
居群水平	1.461 3	1.307 7	0.173 1	0.254 5	46.13
物种水平	1.800 0±0.401 6	1.476 3±0.367 5	0.276 9±0.187 9	0.413 8±0.259 4	80.00
SRAP					
浙南 (ZN)	1.725 0±0.449 3	1.339 5±0.371 8	0.202 1±0.189 7	0.313 1±0.261 8	72.50
华中 (HZ)	1.425 0±0.497 5	1.262 6±0.360 4	0.153 8±0.194 8	0.230 1±0.282 0	42.50
西南 (XN)	1.587 5±0.495 4	1.424 2±0.416 4	0.236 4±0.215 6	0.344 6±0.304 8	58.75
居群水平	1.579 2	1.342 1	0.197 4	0.295 9	57.92
物种水平	1.925 0±0.265 1	1.470 7±0.341 6	0.281 7±0.169 8	0.430 1±0.224 4	92.50
ISSR+SRAP					
浙南 (ZN)	1.736 6±0.441 6	1.430 2±0.399 6	0.244 8±0.203 6	0.365 7±0.279 8	73.66
华中 (HZ)	1.375 6±0.493 0	1.236 7±0.356 6	0.137 2±0.191 3	0.204 6±0.276 5	37.56
西南 (XN)	1.409 8±0.493 0	1.296 5±0.394 3	0.165 8±0.209 7	0.241 6±0.299 6	40.98
居群水平	1.507 3	1.321 1	0.182 6	0.270 6	50.73
物种水平	1.848 8±0.359 1	1.474 1±0.356 8	0.278 8±0.180 6	0.420 2±0.245 9	84.88

表 4 梔子居群基因多样性

Table 4 Gene diversity of *G. jasminoides* populations

分子标记	H_t	H_s	G_{st}	N_m
ISSR	0.239 1	0.173 1	0.276 2	1.310 3
SRAP	0.289 9	0.197 4	0.318 9	1.068 0
ISSR+SRAP	0.258 9	0.182 6	0.294 8	1.195 8

表 5 基于 ISSR 和 SRAP 分子标记梔子 3 个居群的 Nei's 遗传相似系数 (右上角) 和遗传距离 (左下角)

Table 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of three *G. jasminoides* populations based on ISSR and SRAP molecular markers

居群	浙南 (ZN)	华中 (HZ)	西南 (XN)
ISSR			
浙南 (ZN)	****	0.873 2	0.860 3
华中 (HZ)	0.135 5	****	0.958 6
西南 (XN)	0.150 5	0.042 2	****
SRAP			
浙南 (ZN)	****	0.785 5	0.856 5
华中 (HZ)	0.241 4	****	0.912 3
西南 (XN)	0.154 9	0.091 8	****
ISSR+SRAP			
浙南 (ZN)	****	0.837 9	0.857 1
华中 (HZ)	0.176 8	****	0.941 2
西南 (XN)	0.154 2	0.060 6	****

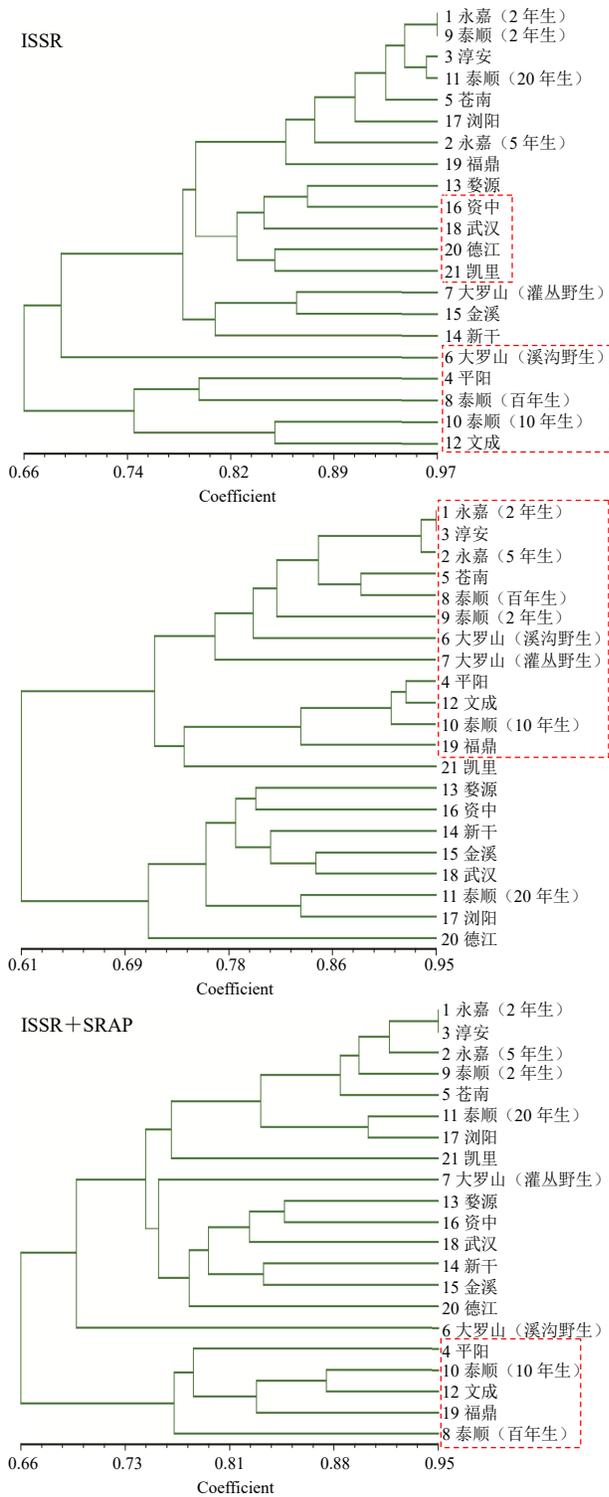


图 2 21 份栀子种质居群的 UPGMA 分析

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 21 types of *G. jasminoides* based on ISSR, SRAP, and combination of ISSR + SRAP

4 讨论

PPB 能一定程度上反映遗传多样性, 本研究筛选的 12 条 ISSR 引物和 9 对 SRAP 引物对 21 份不同来源的栀子种质材料进行 PCR 扩增, 共分别扩增

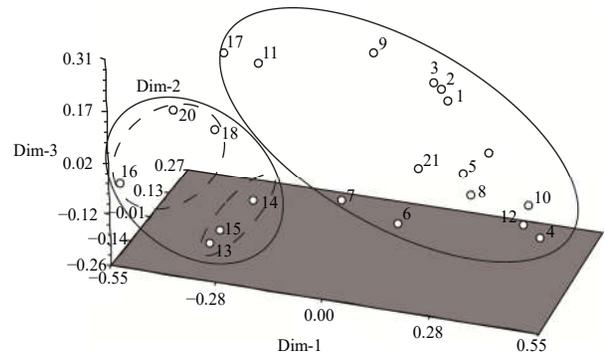


图 3 基于 SRAP 数据获得的 21 份栀子种质主坐标三维图
Fig. 3 Three-dimensional figure of three main coordinates based on SRAP data from 21 types of *G. jasminoides*

出 125 条和 80 条条带, 多态性条带分别为 100 条和 74 条, 多态性条带百分率分别为 80.00% 和 92.50%, 表明栀子个体间存在较大的遗传差异。综合 ISSR+SRAP 标记混合数据(表 3), 3 个居群中, 浙南居群 PPB 最高(73.66%), 而西南居群其次(40.98%), 华中居群最低(37.56%), 说明浙南居群遗传多样性变异水平最高, 适应环境能力较强, 浙南居群 PPB 值接近何峰等^[13]研究巴中、江津、纳溪产区居群的栀子 PPB 71.86% 和韩建萍等^[14]研究华中居群湖南、河南产区的栀子 PPB 73.02%; 本研究基于 SRAP 分子标记的西南居群 PPB 为 58.75%, 结果接近雷栗等^[12]研究华中居群樟树、丰城、新干居群 PPB 的 55.17% 和江西新干居群 PPB 的 59.17%。因此, 本研究遗传多样性指数 (PPB、*H*、*I*) 结果表明, 21 个种源栀子具有丰富的遗传多样性, ISSR 标记和 SRAP 标记均可揭示栀子基因组信息, 且从扩增的多态性位点上看, SRAP 标记要更优于 ISSR 标记。

遗传分化是指遗传多样性在居群内和居群间的分布, 种群间的遗传分化程度可根据遗传分化系数 G_{st} 判断, 当 $G_{st} > 0.25$ 时, 说明居群间分化程度非常高。本实验分析结果表明, 栀子 21 个种源在总的遗传变异中有接近 70.52% 的变异发生在居群间 (ISSR+SRAP 的 $G_{st} = 0.2948$), 29.48% 的遗传分化存在于居群内。然而, 一个物种居群内遗传多样性越高越有益于保护此物种的种质资源, 因此, 为更有效的管理和保护栀子种质资源, 应该在栀子分布区不同居群之间较多的选取栀子种质个体。而基因流是基因在种群内和种群间的运动, 基因流的强弱对种群分化具有重要影响, 当 $N_m > 1$ 时, 基因流可防止遗传漂流引起的种群之间的遗传分化, 本

研究栀子种质 $N_m=1.1958$ (ISSR+SRAP 混合数据), 表明遗传漂流等因素引起的物种遗传多样性下降被基因流有效抵制。

从聚类结果看, 取样栀子种质居群可分为 2 类, 基于 ISSR 和两标记混合数据 (ISSR+SRAP) 的聚类结果呈现出相互掺杂的现状, 并没有严格按照地理距离的分布格局而分类。ISSR 和 SRAP 的分子标记原理不同, 揭示的基因组范围也不同, 不同标记方法得到不同遗传距离, 产生的聚类图不完全一致, 而基于 SRAP 结果的 UPGMA、PCoA 结果显示栀子种质资源遗传距离聚类结果与不同地理位置分布基本一致, 呈现一定地域性分布规律, 但并不完全按照地理位置远近聚类。然而, 基于 ISSR、SRAP 及两标记混合数据的聚类图中均将浙南居群的平阳种源、泰顺百年生种源、泰顺十年生种源、文成种源紧密聚在一起, 表明这几个种源之间遗传差异较小。据温州市志等相关古籍记载, 温州地区栽培栀子记载始于东晋时期, 且规模化栽培已有 400 多年历史, 习称“温栀子”, 平阳、泰顺一带为“温栀子”种源地。本研究结果证实了这一说法, 表明温州产区的平阳、泰顺、文成种源亲缘性近; 再则, 20 世纪末江西、湖南成为全国栀子的主要产区, 因各地交通的便利促进了栀子产业的交流和发展, 各地区交互引种开始频繁, 3 个聚类图中, 泰顺二十年生种源和浏阳种源均被聚在一起, 这预示着二十年前泰顺栀子产区和湖南浏阳之间可能有种源引种交流。

栀子为我国大宗药食两用药材之一, 产区分布广泛, 相互引种频繁, 栽培类型多样, 除有野生外还有庭院栽培、GAP 基地种植等, 因此栀子的种质资源遗传多样性高且亲缘关系复杂。本研究揭示了西南、华中居群重点产区的栀子种质遗传多样性, 且首次报道了基于分子标记的浙江居群栀子遗传多样性, 明确了浙南地区平阳、泰顺、文成种源的

道地性, 可为浙产栀子育种、分类和利用提供可靠的理论基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 涂盛辉, 邱祖民, 刘燕燕. 等. 中药栀子提取工艺的优化 [J]. 中成药, 2006, 28(10): 1519-1521.
- [3] 孟祥乐, 李红伟, 李 颜, 等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 959-967.
- [4] 付小梅, 周光雄, 葛 菲, 等. 栀子类药材的研究概况及展望 [J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 24-26.
- [5] 潘 媛, 陈大霞, 宋旭红, 等. 基于 SCoT 标记的栽培栀子种质资源遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3376-3381.
- [6] 王 伟, 付 娟, 万 琴, 等. 栀子全时段融合指纹图谱的构建及特征峰的鉴定 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2158-2162.
- [7] 孟祥乐, 李红伟, 李 颜, 等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2011, 20(11): 959-967.
- [8] 梁金强, 陶施民, 余庆涛, 等. 葛根枳椇子栀子提取物对大鼠酒精性脂肪肝的作用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 1981-1988.
- [9] 中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [10] 付小梅, 赖学文, 葛 菲, 等. 中药栀子类药材资源调查和商品药材鉴定 [J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(5): 23-25.
- [11] 邓邵勇, 朱培林, 温 强, 等. 基于 EST-SSR 分子标记的栀子野生群体多样性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 431-438.
- [12] 雷 粟, 王 益, 赵阿曼, 等. 栀子道地药材遗传关系的 ISSR 证据 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 116-120.
- [13] 何 峰, 唐 灿, 王子雯, 等. 巴中栀子遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(10): 782-786.
- [14] 韩建萍, 陈士林, 张文生, 等. 栀子遗传多样性及遗传分化的 RAPD 分析 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(23): 1774-1778.