

## 基于 ISSR 的连翘遗传多样性研究

李璐, 董诚明\*, 朱昀昊, 夏伟

河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

**摘要:**目的 研究不同居群连翘的遗传多样性。方法 采用 ISSR 分子标记技术对连翘 25 个自然居群的样本进行分析, 利用 POPGENE 32 软件分析多态位点百分率 ( $P$ )、Nei's 基因多样性指数 ( $H$ ) 及 Shannon 多样性指数 ( $I$ ); 居群间遗传一致度采用 NTSYSpc-2.10 软件进行聚类分析。结果 选出 13 条 ISSR 引物, 扩增出 353 条清晰条带, 物种水平  $P$  为 100%,  $H$  为 0.252 3,  $I$  为 0.394 0, 遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 为 0.331 8, 居群间基因流 ( $N_m$ ) 为 1.007 0, 遗传距离 0.031 0~0.155 5; NTSYSpc 软件进行系统聚类, 将 25 个聚群划分为 2 大类, 7 分组; 连翘个体间进行聚类分析, 195 份连翘样品划分为 2 大类, 5 分组。结论 连翘种群遗传多样性水平较高, 但连翘种群间遗传距离与地理距离没有相关性, 与生态因子和生长环境有关。

**关键词:** 连翘; ISSR; 分子标记技术; 遗传多样性; 生态因子

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)15-3673-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.024

## Genetic diversity of *Forsythia suspensa* based on ISSR

LI Lu, DONG Cheng-ming, ZHU Yun-hao, XIA Wei

School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the genetic diversity of *Forsythia suspensa* from different populations. **Methods** ISSR markers were used to analyze the genetic diversity of 25 populations of *F. suspensa*. Percentage of species level polymorphic bands ( $P$ ), Nei's genetic diversity index ( $H$ ), and Shannon's information index ( $I$ ) of genetic information were calculated by POPGEN 32. UPGMA relationship dendrogram was clustered by NTSYS. **Results** Thirteen primers produced 353 bands and  $P$  was 100%.  $H$  and  $I$  were 0.252 3 and 0.394 0, and genetic differentiation coefficient ( $G_{st}$ ) and gene flow ( $N_m$ ) were 0.331 8 and 1.007 0 within the population levels. The genetic distance varied from 0.031 0 to 0.155 5. NTSYSpc software was used to cluster the system. A total of 25 clusters were divided into two categories and seven groups. Cluster analysis was conducted among *Forsythia* individuals. A total of 195 samples were divided into two categories and five groups. **Conclusion** The genetic diversity among the populations of *F. suspensa* is at higher level. However, the genetic distance among the *Forsythia* population is not related to the geographical distance, which is mainly dependent on the ecological factors and the growth environment.

**Key words:** *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl; ISSR; molecular marker; genetic diversity; ecological factors

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 为木犀科连翘属植物多年生落叶灌木植物。其主产于我国的山西、陕西、河南等地, 喜阳且具有一定的耐阴性, 多分布于海拔 250~2 200 m 的山坡、林下或山谷中。连翘因其具有显著的清热解毒之效, 广泛用于临床, 为我国大宗药材。近几年有些学者发现, 不同产地连翘有效成分有较大差异, 导致原因各异, 主要表现在生长环境差异、采收时间不同等。但利用分子生物学方法对不同产地连翘进行研究的相关

报道较少。

近年来, DNA 分子标记技术成为研究热点, 简单重复序列区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 是基于微卫星系列发展来的分子标记技术。目前被广泛用于物种分类、品种鉴定、居群遗传学研究、遗传图谱构建等领域, 是研究植物遗传多样性常用的分子生物学技术和方法<sup>[1-2]</sup>。因此, 本研究采用 ISSR 分子标记技术, 对 25 个连翘自然居群从 DNA 水平分析其遗传多样性, 旨在从

收稿日期: 2018-12-09

作者简介: 李璐 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源的开发利用。Tel: 15039087195 E-mail: 15039087195@163.com

\*通信作者 董诚明, 教授, 从事中药资源的开发利用研究。Tel: (0371)65962581 E-mail: dcm371@sohu.com

分子水平探明连翘资源的现状,为连翘栽培、利用和保护提供理论依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

连翘采于山西与河南,共 25 个自然居群,

采取幼嫩的叶片,放于装有干燥硅胶的自封袋干燥备用,后存放于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。样品由河南中医药大学董诚明教授鉴定为木犀科连翘属植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl。采集信息见表 1。

表 1 植物材料信息

Table 1 Information of plant materials

样品号	产地	产地简称	经度	纬度
1~15	三门峡陕县	SMX	34°30'35.5"	111°20'53.6"
16~22	洛阳洛宁县	LNXSD	34°13'40"	111°33'30"
23~30	三门峡卢氏县	LSZYG	33°42'12"	111°7'25"
31~35	南阳西峡县军马河	XXJMH	33°29'17"	111°29'49"
36~42	运城夏县	XXSJ	35°4'50"	111°20'1"
43~51	运城绛县	JXLK	35°23'38"	111°35'2"
52~58	运城垣曲县	YQLS	35°17'48"	111°54'19"
59~65	晋城阳城县	YCHH	35°24'19"	112°6'44"
66~74	沁水固县	QSGX	35°51'21"	112°35'2"
75~81	长治长子县	ZZLDC	36°4'29"	112°35'42"
82~89	临汾安泽县	AZDCX	36°3'23"	112°26'5"
90~97	长治屯留县	TLZD	36°19'0"	112°32'42"
98~104	晋城陵川县	LCLQ	35°47'44"	113°25'38"
105~109	长治壶关县	CZHGX	35°58'01.8"	113°29'02.5"
110~120	长治平顺县	PSQY	36°9'26"	113°23'47"
121~126	长治黎城县	LCSJZ	36°39'48"	113°25'40"
127~134	晋中左权县	JZZQX	36°54'51"	113°23'0"
135~145	林州石板岩	LZSBY	36°13'17"	113°45'10"
146~152	南阳内乡县	NXMSK	33°16'39"	111°54'16"
153~163	南阳南召县	NZSKS	33°16'28"	112°20'26"
164~170	洛阳嵩县车村	SXMZL	33°46'41.5"	112°13'08.0"
171~177	平顶山鲁山县	LSYSZ	33°48'12.2"	112°20'56"
178~184	洛阳栾川白土	LCBT	34°0'29"	111°22'30"
185~188	洛阳栾川狮子庙	LCSZM	33°54'46.4"	111°33'22.9"
189~195	长治平顺天脊岭	PSTJL	36°08'10.6"	113°35'53.5"

### 1.2 仪器与试剂

C1000 Touch<sup>TM</sup> 梯度 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司); GelDoc XR+凝胶成像仪 (美国 BIO-RAD 公司); JW-2018H 冷冻高速离心机 (安徽嘉文仪器装备有限公司); PowerPac<sup>TM</sup> Basic 电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司); DYCP-31E 型电泳槽 (北京六一仪器厂)。

ISSR 随机引物 (照哥伦比亚大学发布的序列,由北京三博远志生物技术有限责任公司合成),

Tris、EDTA Na<sub>2</sub>、琼脂糖 (北京索来宝科技有限公司); Gold View I 型核酸染色剂、DM2000、2×Es Taq MasterMix (Dye) (康为世纪生物科技有限公司); 10×Lodding Buffer [宝生物工程(大连)有限公司]; 其他化学试剂均为国产分析纯。

## 2 方法

### 2.1 基因组 DNA 的提取及检测

用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取连翘样品叶片 DNA。将所得的 DNA 溶液适当稀释后放

于-20 °C 保存。用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的完整性。

### 2.2 ISSR 引物筛选

本实验所应用的引物参照哥伦比亚大学发布,对分布于河南的不同连翘种群进行研究的有关文献中出现的引物进行筛选<sup>[3-6]</sup>,由北京三博远志生物技术有限责任公司合成,从 42 条引物中筛选出 13 条反应体系较稳定,扩增条带较清晰,多态性较好的引物,筛选出的 13 条最优引物用于 PCR 扩增,引物序列见表 2。

表 2 引物筛选

Table 2 SSR primer screening

序号	引物编号	引物序列 (5'→3')
1	UBC-807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
2	UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
3	UBC-823	TCTCTCTCTCTCTCTCC
4	UBC-825	ACACACACACACACACT
5	UBC-826	ACACACACACACACACC
6	ISSR-827	ACACACACACACACACGG
7	UBC-827	ACACACACACACACACG
8	UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
9	UBC-841a	GAGAGAGAGAGAGAGACC
10	ISSR-12	GAGGAGGAGGAGGAGGAG
11	ISSR-33	AGAGAGAGAGAGAGAGAT
12	ISSR-34	AGAGAGAGAGAGAGAGAA
13	ISSR-58	AGAGAGAGAGAGAGAGGA

### 2.3 ISSR-PCR 的扩增及检测

提取的 DNA 用 BIO-RAD C1000 扩增仪进行 PCR 扩增反应。总的体系为 20 μL, DNA 模板 1 μL, ISSR 引物 1 μL, TaqDNA 聚合酶 10 μL, 无菌水补至 20 μL。PCR 所扩增的程序如下: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 50 s, 72 °C 总延伸 10 min, 共 35 个循环, 12 °C 保存。PCR 扩增的产物用 2% 的琼脂糖凝胶在 120 V、100 mA 电泳仪条件下电泳 30 min, 置于自动凝胶成像分析仪上成像, 调节光圈及亮度进行拍照保存。

## 3 结果与分析

### 3.1 连翘不同自然居群 ISSR 遗传多样性分析

**3.1.1 ISSR-PCR 扩增结果** 25 个不同居群连翘共 195 个样品, 用筛选出的 13 条引物对 195 个连翘样品进行 PCR 扩增, 共扩增出 353 条清晰条带, PCR 扩增结果见图 1, 由扩增条带结果可知, 平

M 99 98 97 96 95 94 93 92 91 90 89 88 87 86 85 84 83 82 81 80 79 78 77 76 75 74 73 72 71 70 69 68

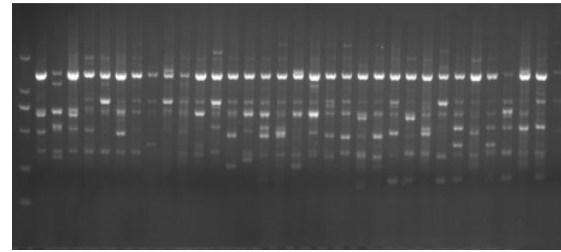


图 1 引物 UBC-807 对连翘的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of PCR amplification by UBC-807 primer

均每个引物扩增的条带数为 27.2, 其中多态性条带中有效条带数为 353, 占总条带的 100%。13 条引物扩增出的引物条带范围为 19~39, 引物 UBC-835 扩增出的条带最多, 为 39 条; 其次为引物 UBC-811, 扩增出 33 条条带; 引物 UBC-823 扩增条带最少, 为 19 条。13 条 ISSR 引物在每个产地中扩增出的有效条带数为 1~26; 由扩增出的清晰条带可以明显辨别每个样品基因型, 即说明 195 个样品有 195 个基因型, 即样品具有独立基因型。

**3.1.2 不同居群连翘遗传多样性分析** 采用 POPGENE32 对 25 个连翘居群的遗传多样性进行统计分析, 结果见表 3。多态位点百分率 ( $P$ ) 变化范围为 38.53%~65.40%; Shannon 多样性指数 ( $I$ ) 变化范围为 0.206 1~0.314 2;  $H$  变化范围为 0.137 2~0.205 5。等位基因数 ( $N_a$ ) 与  $P$  对连翘居群遗传多样性分析结果一致; 有效等位基因数 ( $N_e$ ) 和  $H$  对连翘居群遗传多样性分析结果相一致; 在对 25 个不同居群变异指数分析时,  $I$  与  $H$  变异情况结果基本一致。综合上述结果可知, SMX、JZZQX 和 PSQY 3 个居群连翘遗传多样性较为丰富, 其  $I$  分别为 0.314 2、0.295 7 和 0.293 1。根据产区进行划分时, 河南 11 个连翘居群中  $I$  大于山西的 14 个居群连翘, 其值分别为 0.391 8 和 0.372 9; 伏牛山 9 个居群连翘  $I$  大于太行山 15 个居群连翘, 其值分别为 0.389 7 和 0.376 2。由结果可知, 居群分析时, 产区内居群变异指数差别较小。当以地理分布为单位时, 河南产区连翘  $I$  从大自小依次为伏牛山中 > 三门峡 > 伏牛山北、伏牛山南, 其值分别为 0.368 1、0.314 2、0.309 4 和 0.300 5; 山西产区连翘  $I$  从大自小依次为山西中 > 山西南 > 山西北, 其值分别为 0.365 5、0.341 1 和 0.319 8; 由表 3 可知各地理分布区域内  $P$  基本与  $I$  排序相一致, 这说明了地理分布区域内连翘各居群具有遗传多样性。

表 3 连翘不同居群遗传变异分析结果 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Analysis of genetic variation in different populations of *F. suspense* ( $\bar{x} \pm s$ )

产地	$P/\%$	$N_a$	$N_c$	$H$	$I$
SMX	65.44	1.654 4±0.476 2	0.339 5±0.348 5	0.205 5±0.187 7	0.314 2±0.267 9
LNXS	50.71	1.507 1±0.500 7	1.301 9±0.373 1	0.175 5±0.199 4	0.263 1±0.284 9
LSZYG	53.54	1.535 4±0.499 5	1.296 0±0.358 3	0.175 7±0.193 4	0.266 4±0.277 3
XXJMH	41.93	1.419 3±0.494 1	1.249 6±0.349 2	0.147 3±0.190 6	0.221 3±0.276 2
XXSJ	41.08	1.410 8±0.492 7	1.240 3±0.349 7	0.140 7±0.190 5	0.211 4±0.274 6
JXLK	50.14	1.501 4±0.500 7	1.278 3±0.358 2	0.164 2±0.193 4	0.248 6±0.277 5
YQLS	45.89	1.458 9±0.499 0	1.284 4±0.370 9	0.164 4±0.199 9	0.244 9±0.286 5
YCHH	47.03	1.470 3±0.499 8	1.265 2±0.355 4	0.156 6±0.191 6	0.236 9±0.275 8
QSGX	56.66	1.566 6±0.496 3	1.302 6±0.354 7	0.181 1±0.191 2	0.276 0±0.273 9
ZZLDC	44.19	1.441 9±0.497 3	1.238 9±0.332 5	0.144 1±0.184 1	0.219 6±0.268 0
AZDCX	45.89	1.458 9±0.499 0	1.234 2±0.335 5	0.140 8±0.182 8	0.216 1±0.264 1
TLZD	47.03	1.470 3±0.499 8	1.259 4±0.342 5	0.155 5±0.188 4	0.236 1±0.273 1
LCLQ	55.52	1.555 2±0.497 6	1.299 4±0.356 7	0.178 6±0.191 7	0.271 9±0.274 7
CZHGX	46.18	1.461 8±0.499 2	1.274 6±0.356 6	0.162 1±0.193 6	0.243 7±0.280 0
PSQY	58.92	1.589 2±0.492 7	1.329 5±0.361 6	0.195 6±0.195 0	0.295 7±0.278 9
LCSJZ	47.59	1.475 9±0.500 1	1.298 5±0.375 7	0.172 5±0.201 2	0.256 7±0.288 4
JZZQX	59.77	1.597 7±0.491 1	1.321 1±0.354 9	0.192 5±0.191 2	0.293 1±0.273 7
LZSBY	51.56	1.515 6±0.500 5	1.291 7±0.361 6	0.172 3±0.194 3	0.260 4±0.279 0
NXMSK	49.58	1.495 8±0.500 7	1.292 8±0.368 3	0.171 0±0.197 5	0.256 8±0.283 0
NZSKS	52.41	1.524 1±0.500 1	1.282 1±0.346 8	0.169 2±0.190 7	0.257 1±0.275 1
SXMZL	56.66	1.566 6±0.496 3	1.295 1±0.351 1	0.177 7±0.188 2	0.272 3±0.269 9
LSYSZ	52.41	1.524 1±0.500 1	1.287 5±0.358 5	0.170 9±0.191 5	0.259 8±0.275 0
LCBT	55.52	1.555 2±0.497 6	1.309 0±0.357 5	0.184 4±0.192 5	0.279 7±0.276 6
LCSZM	38.53	1.385 3±0.487 3	1.231 6±0.340 7	0.137 2±0.186 9	0.206 1±0.272 2
PSTJL	55.24	1.552 4±0.498 0	1.316 3±0.368 7	0.186 2±0.196 4	0.281 0±0.280 6
总共	100.00	2.000 0±0.000 0	1.409 2±0.328 7	0.252 3±0.166 3	0.394 0±0.220 0

**3.1.3 不同居群遗传变异分析** 由产地划分得出不同居群连翘遗传结构分析结果见表 4。有结果可知,物种水平总遗传多样性指数 ( $H_t$ ) 为 0.252 7, 种内遗传多样性指数 ( $H_s$ ) 为 0.168 9, 连翘基因分化系数 ( $G_{st}$ ) 为 0.331 8, 居群间基因流 ( $N_m$ ) 为 1.007, 即连翘在物种水平上有 33.18% 的遗传变异存在于居群间, 66.82% 的遗传变异存在于居群内, 说明连翘在居群内遗传分化明显。河南与山西 2 大产区连翘基因  $G_{st}$  分别为 0.318 2 和 0.302 3,  $N_m$  值分别为 1.071 4 和 1.154 0; 太行山与伏牛山产区连翘基因  $G_{st}$  值分别为 0.308 0 和 0.327 3,  $N_m$  值分别为 1.123 6 和 1.027 5。由产区划分结果发现, 产区连翘  $N_m$  均大于 1, 且产区各居群间基因分化在 30% 左右, 说明遗传分化主要存在于居群内。且山西产区基因

$G_{st}$  由高到低依次为山西中 > 山西南 > 山西北, 说明山西北部居群间变异分化较南部和中部低; 河南产区中基因遗传分化系数由高到低依次为伏牛山中 > 伏牛山南 > 伏牛山北 > 三门峡, 结果表明河南产区中的伏牛中部居群间变异分化明显。

**3.1.4 居群间遗传距离与遗传一致度分析** 采用 POPGENE 32 软件对居群间遗传距离及遗传一致度进行分析, 结果见表 5。由结果可知, 25 个居群间遗传距离为 0.031 0~0.155 5, 居群间遗传一致度范围为 0.852 0~0.969 5, 其中 YQLS 与 YCHH 之间遗传距离最小, 亲缘关系较近, LCSZM 与 ZZLDC 遗传距离最大, 亲缘关系较远。采用 NTSYSpc-2.10 软件对 25 个居群进行聚类分析, 结果见图 2。由聚类结可知, 系统聚类时遗传一致度

表 4 不同居群连翘遗传结构分析结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Result of genetic variation in different populations of *F. suspensa* ( $\bar{x} \pm s$ )

产地	$H_t$	$H_s$	$G_{st}$	$N_m$	$P\%$	$I$
河南 (11)	0.251 6±0.027 9	0.171 5±0.012 9	0.318 2	1.071 4	96.60	0.391 8±0.222 1
山西 (14)	0.239 0±0.029 5	0.166 8±0.013 8	0.302 3	1.154 0	92.07	0.372 9±0.232 3
三门峡 (2)	0.210 6±0.032 9	0.190 6±0.028 2	0.095 1	4.759 4	65.44	0.314 2±0.267 9
伏牛山 (9)	0.249 2±0.028 0	0.167 6±0.012 8	0.327 3	1.027 5	94.90	0.389 7±0.223 4
太行山 (15)	0.241 5±0.029 8	0.167 1±0.013 6	0.308 0	1.123 6	92.63	0.376 2±0.233 4
山西南 (6)	0.218 6±0.032 4	0.164 3±0.018 7	0.248 7	1.510 5	80.17	0.341 1±0.249 6
山西中 (6)	0.233 5±0.029 0	0.164 1±0.014 9	0.297 4	1.181 0	88.10	0.365 5±0.231 7
山西北 (2)	0.208 0±0.035 7	0.182 5±0.029 0	0.124 0	3.531 8	67.14	0.319 8±0.267 5
伏牛山南 (2)	0.198 1±0.036 3	0.170 1±0.027 9	0.141 3	3.037 8	63.46	0.300 5±0.270 1
伏牛山中 (4)	0.234 4±0.029 5	0.161 1±0.015 0	0.312 7	1.099 1	85.27	0.368 1±0.234 4
伏牛山北 (2)	0.199 4±0.032 7	0.174 3±0.026 1	0.125 9	3.471 7	68.84	0.309 4±0.257 1
全部 (25)	0.252 7±0.027 5	0.168 9±0.011 4	0.331 8	1.007 0	100.00	0.394 0±0.220 0

表 5 Nei's 遗传距离与遗传一致度

Table 5 Nei's genetic distance and genetic consistency

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	****																								
2	0.033 2	****																							
3	0.038 9	0.043 8	****																						
4	0.082 3	0.107 6	0.067 8	****																					
5	0.106 5	0.120 2	0.118 4	0.076 4	****																				
6	0.084 8	0.098 6	0.108 6	0.081 7	0.050 5	****																			
7	0.075 3	0.085 8	0.085 8	0.084 3	0.074 8	0.034 7	****																		
8	0.068 9	0.084 0	0.080 6	0.064 4	0.069 0	0.049 6	0.031 0	****																	
9	0.062 3	0.085 1	0.079 5	0.075 0	0.096 6	0.079 4	0.086 1	0.055 7	****																
10	0.099 5	0.105 9	0.100 3	0.112 6	0.133 0	0.107 4	0.106 4	0.083 7	0.051 4	****															
11	0.090 8	0.107 0	0.099 0	0.099 7	0.132 3	0.094 7	0.092 1	0.072 9	0.048 7	0.036 6	****														
12	0.079 3	0.088 4	0.107 5	0.116 1	0.117 0	0.081 4	0.087 4	0.071 6	0.063 8	0.049 4	0.043 8	****													
13	0.061 9	0.080 4	0.101 0	0.096 7	0.101 2	0.061 5	0.076 1	0.069 6	0.081 9	0.101 0	0.087 5	0.063 4	****												
14	0.087 0	0.108 6	0.122 0	0.121 4	0.104 2	0.066 5	0.085 1	0.084 2	0.106 7	0.142 6	0.116 2	0.089 3	0.051 2	****											
15	0.068 5	0.094 9	0.109 7	0.099 6	0.090 8	0.065 0	0.074 4	0.075 2	0.087 4	0.105 3	0.090 8	0.076 4	0.040 2	0.036 8	****										
16	0.076 0	0.110 2	0.096 6	0.098 2	0.102 4	0.080 6	0.086 7	0.082 3	0.101 4	0.009 0	0.102 5	0.103 9	0.068 2	0.059 6	0.035 5	****									
17	0.057 5	0.081 8	0.084 0	0.086 4	0.092 7	0.071 0	0.075 7	0.078 7	0.073 0	0.112 1	0.100 4	0.083 4	0.058 7	0.073 4	0.049 9	0.049 3	****								
18	0.079 3	0.094 6	0.106 4	0.114 6	0.122 1	0.103 2	0.104 4	0.111 2	0.098 6	0.126 5	0.127 3	0.107 1	0.102 7	0.118 7	0.094 1	0.097 4	0.044 8	****							
19	0.083 0	0.099 0	0.104 2	0.123 2	0.127 1	0.104 7	0.109 0	0.117 4	0.090 2	0.121 7	0.112 2	0.098 7	0.086 9	0.105 7	0.092 5	0.101 0	0.062 2	0.060 1	****						
20	0.083 3	0.093 0	0.090 3	0.114 9	0.120 5	0.102 9	0.094 8	0.103 0	0.092 6	0.103 7	0.107 1	0.082 0	0.095 6	0.113 9	0.088 8	0.107 3	0.064 4	0.063 2	0.057 0	****					
21	0.085 1	0.094 8	0.103 7	0.122 7	0.132 9	0.098 4	0.114 9	0.106 8	0.089 4	0.113 0	0.108 4	0.095 7	0.094 0	0.118 6	0.104 2	0.121 4	0.093 3	0.108 3	0.105 8	0.118 2	****				
22	0.104 2	0.119 1	0.121 9	0.130 8	0.158 7	0.123 6	0.137 6	0.137 2	0.105 4	0.149 7	0.137 1	0.122 8	0.101 8	0.119 9	0.128 6	0.140 6	0.110 2	0.137 3	0.142 6	0.150 5	0.016 3	****			
23	0.079 6	0.097 1	0.094 1	0.120 9	0.149 5	0.123 4	0.122 7	0.121 6	0.092 6	0.118 7	0.112 3	0.092 7	0.094 0	0.111 2	0.103 3	0.123 9	0.090 3	0.120 1	0.109 6	0.114 4	0.048 4	0.047 2	****		
24	0.102 0	0.118 6	0.120 8	0.141 8	0.160 2	0.136 6	0.142 9	0.142 8	0.119 4	0.155 5	0.142 6	0.122 3	0.120 6	0.121 5	0.113 8	0.130 8	0.108 9	0.141 9	0.134 1	0.136 2	0.069 2	0.065 6	0.043 1	****	
25	0.082 0	0.096 8	0.090 5	0.111 3	0.134 8	0.119 4	0.117 5	0.109 3	0.100 7	0.135 3	0.130 5	0.101 7	0.094 4	0.105 6	0.099 9	0.097 5	0.078 9	0.095 7	0.105 7	0.107 1	0.063 9	0.075 0	0.040 3	0.056 9	****

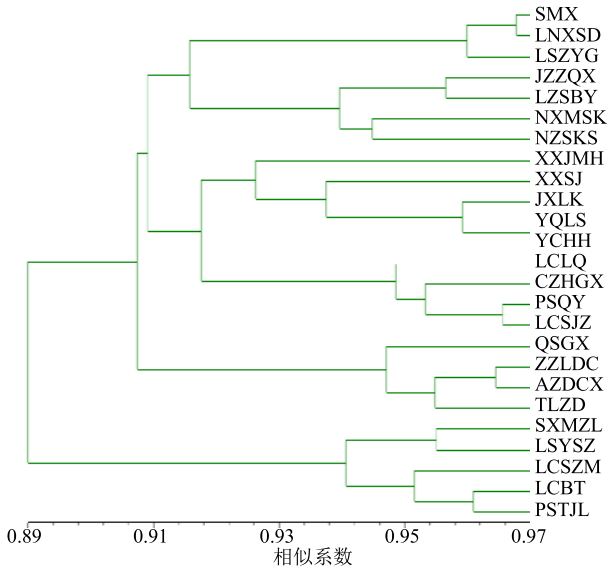


图 2 连翘自然居群间遗传聚类 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA cluster graph of genetic clustering among natural populations of *F. suspensa*

为 0.89~0.97, 均值为 0.93, 因此可将 25 个连翘居群划分为 7 类, 由上至下依次为第 1 组包括 3 个居群, 分别为 SMX、LNXSD 和 LSZYG, 第 1 组主要分布在河南西部, 位于伏牛山、秦岭与太行山交汇处, 地理位置突出; 第 2 组包括 4 个居群, 为 JZZQX、LZSBY、NXMSK 和 NZSKS, 其中 JZZQX 与 LZSBY 为太行山山脉边缘区域, NXMSK 与 NZSKS 为伏牛山山脉浅山区, 且海拔较腹地海拔低; 第 3 组包含 1 个自然聚群, 为 XXJMH; 第 4 组由 4 个居群组成, 分别为 XXSJ、JXLK、YQLS 和 YCHH, 4 个居群属于太行山山脉南; 第 5 组包括 4 个居群, 为 LCLQ、CZHGX、PSQY、LCSJZ; 第 6 组包括 QSGX、ZZLDC、AZDCX 和 TLZD 4 个居群, 其中第 5 组与第 6 组主要分布于太行山腹地, 具有相似的生态条件。第 7 组包括 SXMZL、LSYSZ、LCBT、PSTJL 和 LCSZM 5 个居群, 进一步又可分为 2 组, 分别为 SXMZL 和 LSYSZ, LCBT、PSTJL 和 LCSZM 2 组, 聚类发现山西中部 PSTJL 居群归为此组, 可能由于 PSTJL 与 LCBT 和 BTSZM 均处于高海拔, 且所处环境植被分布相似。

结合表 5 与图 2 可知, 连翘居群间遗传距离及遗传一致度范围分别为 0.031 0~0.155 5 和 0.852 0~0.967 3, 聚类分析主要以相似的生态因素及环境对各居群进行聚类, 说明居群间存在遗传分化, 但分化程度较小, 变异分化主要受地理因素及环境因子控制。

### 3.2 个体间聚类分析

运用 NTSYS-pc2.10e 软件对 195 个样品基于遗传相似性系数进行 UPGMA 聚类, 结果见图 3。由结果可知, 25 个居群 195 个连翘样品从 0.72 处可分为 5 组, 具体分组情况如下。

第 1 组: 包括 4 个居群, 分别为 SMX、LNXSD、LSZYG 和 XXJMH, 从地理位置上看, 4 个居群均处于河南西部, 4 个居群均属于山脉边缘区域, 4 个居群连翘均处于伏牛山与秦岭的交界处, 地势相似且地理环境及植被分布及海拔有较大的相似性。

第 2 组: 包括 4 个居群, 分别为 JZZQX、LZSBY、NXMSK 和 NZSKS, 进一步细分时发现 JZZQX 和 LZSBY 又聚为 1 类, 均为太行山山脉的边缘区域; NXMSK 和 NZSKS 2 个产地聚为一类, 均为伏牛山山脉的浅山区。

第 3 组: 包括 8 个居群, 分别为 XXSJ、JXLK、YQLS、YCHH、QSGX、ZZLDC、AZDCX 和 TLZD, 这 8 个居群连翘进一步区分时, 可分为 2 组, 第 1 组为 XXSJ、JXLK、YQLS、YCHH, 第 2 组为 QSGX、ZZLDC、AZDCX 和 TLZD, 第 1 组 4 个居群在地理分布上较近, 第 2 组 4 个居群连翘分布于山西中部, 地理分布较近。

第 4 组: 包括 5 个居群, 分别为 LCLQ、PSQY、CZHGX、LCSJZ 和 JZZQX, 但 JZZQ 仅有 2 个样品, 则认为第 4 组由 4 个居群组成。由地理分布可知, 4 个居群间 LCLQ、PSQY、LCSJZ 和 CZHGX 地理距离较近且均为太行腹地, 整体位置位于山西中部偏北。

第 5 组: 包含 5 个居群, 分别为 SXMZL、LSYSZ、LCBT、LCSZM 和 PSTJL, 由结果可知, PSTJL 分布于山西中部, SXMZL、LSYSZ、LCBT、和 LCSZM 属于河南中南部, 位于伏牛山腹地区域, PSTJL 与其余 4 个居群连翘分布差异较大, 打破了地理距离限制。

### 4 讨论

在衡量居群遗传多样性时, 往往会通过  $P$ 、 $N_a$ 、 $N_s$ 、 $H$ 、 $I$  这些变异指数进行评价<sup>[7-9]</sup>。汤正辉等<sup>[3]</sup>应用 ISSR 分子标记对分布于河南省不同地区的连翘 6 个自然种群进行遗传多样性分析, 结果表明连翘具有较高的遗传多样性。12 条引物共得到 89 个重复性好的位点, 在物种水平上,  $P$  为 94.38%;  $H$  和  $I$  分别为 0.326 5 和 0.490 1, 这与本实验分析结果相

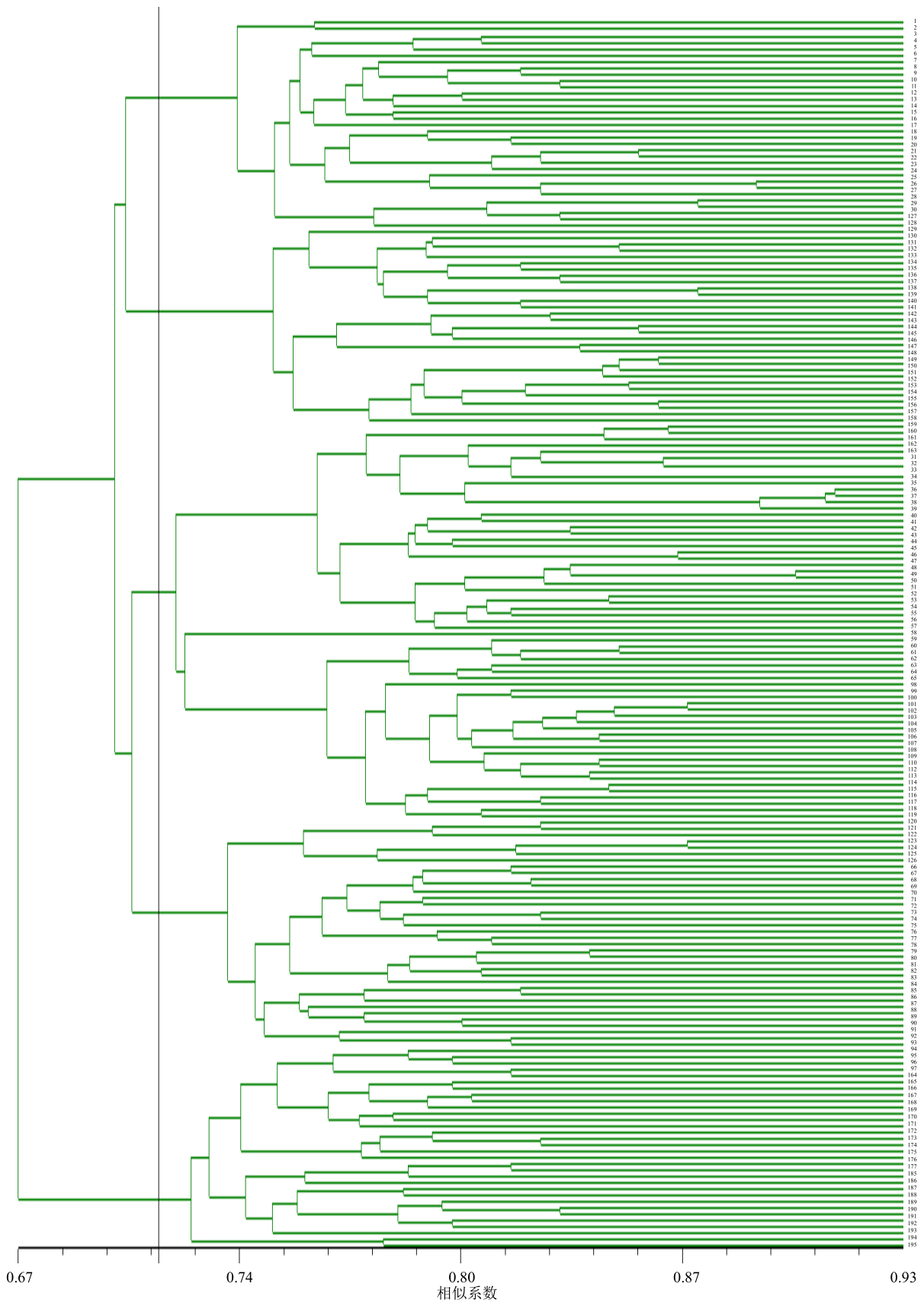


图 3 个体间基于遗传相似性系数的 UPGMA 聚类

Fig. 3 UPGMA clustering based on genetic similarity coefficient among individuals

近,  $I$  有遗传多样性。吴婷等<sup>[10]</sup>利用 RAPD 分子标记技术对不同产地连翘的 DNA 指纹图谱构建的研究中得出, 11 条 RAPD 引物对 14 批连翘进行 PCR 扩增, 共获得 80 条谱带, 平均每个引物扩增出 7.27 条谱带, 其中多态性谱带 67 条, 多态性条带比率为 83.8%, 表明连翘遗传多样性比较丰富。研究发现, 利用 PAPP 技术较本研究利用 ISSR 分子标记技术多态比率低, 可以说明 ISSR 分子标记技术能更精确对连翘所携带遗传信息进行描述, 同样也映证了连翘具有较高的遗传多样性。

本实验在对 25 个连翘居群的研究中得出连翘在物种水平上有 33.18% 的遗传变异存在于居群间, 66.82% 的遗传变异存在于居群内, 说明连翘在居群内遗传分化明显, 这与汤正辉等<sup>[3]</sup>对连翘 ISSR 遗传多样性分析结果相似, 汤正辉在研究中发现种群间遗传分化系数为 0.274 3, 遗传变异主要来自于种群内部。

在对  $N_m$  结果分析中发现,  $N_m$  值均大于 1, 25 个连翘居群总的基因交流值为 1.007 0, 说明居群间基因交流程度明显。有学者<sup>[11]</sup>认为群体间的基因流值若小于 1 ( $N_m < 1$ ), 有限的基因流是促使群体发生遗传分化的主要原因。若  $N_m > 1$  说明地理距离可能很近或群体间有某种渠道可以发生基因流。本研究结果表明, 25 个居群间基因流大于 1, 对 25 个连翘居群进行细分为产区和小区产地进行分析时发现, 居群区域较大时, 居群间基因交流程度较小区交流程度低, 但其  $N_m$  均大于 1。综上说明连翘在居群间主要受生态因子和生长环境有关。

根据 NTSYSpc 软件度不同居群及个体样本间的聚类分析可知, 25 个居群由 0.93 处进行划分可分为 7 个类别, 而 7 组聚类结果中, 第 2 组与第 7 组聚类结果中发现, JZZQX、LZSBY 与 NXMSK 和 NZSKS 聚为一类, JZZQX 和 LZSBY 均属于太行山山脉边缘区域, 具有相似的环境, NXMSK 和 NZSKS 属于伏牛山山脉浅山区, 海拔较低且环境相似; PSTJL 与 SXMZL、LSYSZ、LCBT 和 LCSZM 聚为一类, 2 组结果均打破了地理距离的隔阂且但居群间具有相似的海拔。在对单个样品进行聚类分析时得出: 195 个连翘样品共聚为 5 类, 其结果与

居群间聚类结果相似; 在对其细分时发现, 虽然居群间连翘能够细化为五类, 但并不是每一个居群内样品能聚在一起, 例如: LNXSD 样品则有 2 个样品分别穿插在 SMX 和 LSZYG 居群中; JZZQX 样品穿插于 LZSBY 居群中等。这与汤正辉等<sup>[3]</sup>研究结果类似。综上所述, 连翘与地理距离没有一定的相关性, 但聚类结果又表明, 高海拔及太行、伏牛腹地; 浅山区及山脉边缘区域居群能够分别归为一类, 说明连翘遗传距离与其生态因子及环境有关, 从侧面也能指出连翘基因交流程度较大。

#### 参考文献

- [1] 王 笠, 赵志礼, 倪梁红, 等. 基于 ISSR 标记的麻花羌遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3168-3174.
- [2] 王晓彤, 罗 点, 陈 高, 等. 对叶百部遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4051-4056.
- [3] 汤正辉, 祝亚军, 谭晓风, 等. 河南连翘种群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(8): 32-37.
- [4] 巨秀婷, 阿敞兰, 侯志强, 等. 基于 ISSR 分子标记的郁金香品种遗传多样性分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(7): 2934-2939.
- [5] 林伟东, 陈志丹, 孙威江, 等. 基于 ISSR 标记的福建茶树品种 (系) 遗传多样性分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(5): 1814-1821.
- [6] 王美军, 黄 乐, 刘昆玉, 等. 刺葡萄 ISSR 分子标记体系的建立及种质资源聚类分析 [J]. 果树学报, 2017, 34(3): 279-287.
- [7] 张 盾, 任梦云, 张银东, 等. 基于 ISSR 分子标记的野生山萸萆遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 219-226.
- [8] 郎乾坤, 樊丛照, 朱 军, 等. 维吾尔药茶昆仑雪菊 ISSR 分子标记体系的建立 [J]. 生物资源, 2017, 39(1): 36-41.
- [9] 王晓彤, 罗 点, 陈 高, 等. 对叶百部遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4051-4056.
- [10] 吴 婷, 魏 珊, 米丽华, 等. 不同产地连翘的 DNA 指纹图谱构建与聚类分析 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 816-820.
- [11] 李忠虎, 刘占林, 王玛丽, 等. 基因流存在条件下的物种形成研究述评: 生殖隔离机制进化 [J]. 生物多样性, 2014, 22(1): 88-96.