

基于 SRAP 分子标记的何首乌种质遗传多样性和群体结构研究

李嘉惠¹, 欧晓华¹, 刘晓莹¹, 卢昌华¹, 张宏意^{1,2}, 何梦玲^{1,2}, 严寒静^{1,2*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点研究室, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 探究何首乌 *Polygonum multiflorum* 种质的遗传多样性和居群结构, 为何首乌种质资源的保护及合理利用提供参考。**方法** 采用 SRAP 分子标记方法, 利用 Structure 2.3.4、NTSYSpc、Popgen 32 和 MEGA 7 软件对数据进行统计, 获得何首乌居群的多样性水平、遗传距离、遗传分化程度、聚类结果和群体分析结果。**结果** 何首乌野生居群遗传多样性大于栽培居群, 多样性主要来自居群间。野生居群中, 四川和重庆居群的遗传多样性较高, 何首乌样品间遗传距离与地理距离无明显相关性; 何首乌样品的邻接法 (neighbor joining, NJ) 聚类结果与地理分布相符, 相同采集点样品可聚在一起。结果还显示农户栽培品亲缘关系近, 说明品种间存在相互引种情况。居群结构分析表明, 大部分何首乌样品的血缘组成较为单一, 且 $K=16$ 时, 样品分类效果最佳, 而分类结果则与 NJ 聚类基本一致。**结论** SRAP 分子标记是何首乌遗传多样性估计和种群关系的有效分析工具, 而地形复杂性可能是影响何首乌遗传多样性程度的重要因素, 另外, 广西所产棱枝何首乌在何首乌种群中表现出特异性, 与其他种源遗传距离大, 支持将其列为何首乌的变种。

关键词: 何首乌; SRAP; 遗传多样性; 种质; 亲缘关系

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)07-2115-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.022

Genetic diversity and population structure of *Polygonum multiflorum* germplasm based on SRAP molecular marker

LI Jia-hui¹, OU Xiao-hua¹, LIU Xiao-ying¹, LU Chang-hua¹, ZHANG Hong-yi^{1,2}, HE Meng-ling^{1,2}, YAN Han-jing^{1,2}

1. School of Traditional Chinese medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Key Laboratory of Production & Development of Cantons Medicinal Materials, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity and population structure of *Polygonum multiflorum* germplasm, in order to provide reference for the protection and rational utilization of *P. multiflorum* germplasm resources. **Methods** Base on SRAP molecular marker method, the diversity level, genetic distance, genetic differentiation degree, clustering results and population analysis results of *P. multiflorum* population were obtained by using Structure 2.3.4, NTSYSpc, Popgen 32 and MEGA 7 software to make statistics on the data. **Results** The genetic diversity of *P. multiflorum* was mainly from intergroup, and the genetic diversity of wild population was greater than that of cultivated population. In the wild population, the genetic diversity was high in Sichuan and Chongqing population, and the genetic distance between samples of *P. multiflorum* had no obvious correlation with geographical distance; The NJ clustering results of the samples were consistent with the geographical distribution, and the samples from the same collection point could be clustered together. In addition, the results also showed that the cultivars of peasant households were closely related, indicating the existence of mutual introduction between the cultivars. Population structure analysis showed that most samples had single consanguinity, and the best classification result which was consistent with NJ clustering result could be obtained when $K=16$ was used. **Conclusion** SRAP molecular marker technique is an effective analysis tool for genetic diversity estimation and

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 广东省科技厅项目 (2017A020213023)

作者简介: 李嘉惠 (1994—), 女 (汉族), 广东肇庆人, 硕士研究生, 主要从事中药资源开发与品质评价研究工作。

E-mail: 787517019@qq.com

*通信作者: 严寒静 (1972—), 女 (汉族), 重庆人, 硕士研究生导师, 博士学位, 主要从事中药资源开发与品质评价研究工作。

E-mail: yanhanjing1211@163.com

population relationship studies of *P. multiflorum*. The complexity of terrain may be an important factor affecting the genetic diversity of *P. multiflorum*. In addition, *P. multiflorum* var. *angulatum* from Guangxi shows specificity in *P. multiflorum* population and has a large genetic distance from other provenances, therefore, it is suggested to classify it as a variety of *P. multiflorum*.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb.; SRAP; genetic diversity; germplasm

何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb 为蓼科多年生草本植物,其地下膨大的块根,生则截疟解毒、润肠通便,炮制后可补益精血、固肾乌须,而现代研究表明,何首乌块根具有调血脂和抗衰老等的作用^[1]。随着人们生活水平的提高及对保健领域的关注,具有补益功效的何首乌需求量日渐攀升,作为本品主流的野生何首乌在掠夺式的采挖中正以每年约 15% 的速度递减^[2]。有学者调查了我国何首乌野生品种的分布区域,并且对其蕴藏量作了估算,发现调查的 60 多个样方当中,能采挖出来的一般为何首乌幼根,质量在 10 g 左右,单个样方的蕴藏量还不足 50 g,所走访的湖北、广西田林、贵州和河南嵩县等地的何首乌野生品种也呈下降的趋势^[3],而目前人工栽培的规模还未能满足市场的需要,同时长期的扦插繁殖已导致栽培种质的退化^[4],何首乌种质资源正面临严峻的挑战。

植物的种质资源,是植物在常年演化过程中,在经历自然选择、人工驯化后形成的可以传递给下一代的遗传物质的总称,凡是携带有遗传信息的野生品种、栽培品种、变种和古老地方品种等都属于种质资源^[5]。植物种质资源的多样性,一方面决定了植物种群在自然界中的生存能力和应对环境变化的适应能力,影响生存环境的生态平衡;另一方面,作为人类可利用的资源,它所蕴含的遗传物质可以通过优良种质挖掘,抗性基因的筛选为人类带来效益^[6]。因此,为应对何首乌资源日渐匮乏的境况,亟待加强何首乌种质多样性的研究,为其种质保护奠定基础。

目前物种遗传多样性研究方法包括形态学标记方法、生化标记方法、细胞学标记方法和分子标记方法^[5]。由于植物形态受环境的影响,因此以形态数据对种质进行研究往往会损失较多的遗传多样性,较难反映物种的真实情况,而分子标记则是 DNA 分子水平的直接反应,不受外界环境因素的影响,在植物生长的任何部位都可以检测到,位点多且丰富,检测较快^[7],因而更能代表种质的多样性。在植物研究领域一般使用的标记方法包括了 SSR、

ISSR、AFLP、RFLP、RAPD 和 SRAP 等,其中 ISSR^[8]、RAPD^[9] 和 SRAP (sequence related amplified polymorphism)^[10] 分子标记方法在何首乌遗传多样性研究中已有使用。SRAP 标记方法是由 Li 等^[11]于 2001 年创立的,相对于其它标记方法,它具备分布普遍、可靠性和重复性高、技术难度低和多态性高等特点^[12],在国内外已广泛应用于农作物的研究^[13]。程远辉^[10]在研究重庆地区何首乌遗传多样性时,曾较长时间使用 RAPD 标记方法进行研究,结果显示扩增条带少,重复性差,所以最终选择 SRAP 方法进行研究,可见 SRAP 标记方法在何首乌遗传多样性研究上的优势。

因此,本实验采用 SRAP 分子标记方法,对全国 12 个省 44 个居群的 327 份何首乌样品进行研究,并以此探究我国何首乌的种质多样性和居群结构,为何首乌种质资源的保护及合理利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

于 2017—2019 年,采集 327 份样品,经广东药科大学中药学院刘基柱副教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb.。样品覆盖我国 12 个省 44 个地点,其中 218 份为栽培品,109 份为野生品,栽培品中包含一份棱枝何首乌 (LZ),样品详细信息见表 1、2。

1.2 方法

选用植物 DNA 提取试剂盒 (宝生物工程有限公司,产品型号 9768) 对何首乌叶片的基因组 DNA 进行提取。

利用前期筛选得到的 13 对引物对 327 份何首乌基因组 DNA 进行扩增,其中反应体系的总体积为 20 μ L,即 10 μ L premix (宝生物工程有限公司,产品型号 RR902A),上下游引物 (引物母液质量浓度为 10 ng/ μ L) 各 1 μ L, DNA 模板为 40 ng,并用 ddH₂O 补充体积至 20 μ L,另外 PCR 反应为 SRAP 标记方法的一般程序,即 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C、1 min, 35 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C、1 min, 50 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

表 1 何首乌栽培品来源

Table 1 Origin of *P. multiflorum* cultivars

省份	地点	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m	时间	数量/份	样品编号
广东	德庆莫村镇太宪村	112°05'31"	23°21'56"	60	2018-04	20	TX1~20
	德庆新圩镇大同村	111°55'51"	23°20'07"	20	2018-04	20	DT1~20
	高州石鼓镇白泥塘村	110°47'47"	21°49'03"	20	2017-07	20	BNT1~20
	新兴天堂镇山塘角村	112°01'05"	22°34'36"	20	2018-07	18	STJ1~18
	德庆大桥村春牛亭	111°47'22"	23°08'26"	30	2018-04	20	CNT1~20
广西	贵港	109°	23°	—	2019-05	26	GG1~26
贵州	施秉牛大场镇山口村	107°48'44"	26°20'05"	800 以上	2018-04	20	SKC1~20
上海	上海中医药大学	121°35'57"	31°11'39"	10	2018-06	9	SZY1~9*
	益大本草园	121°37'57"	31°08'51"	—100	2018-06	1	YD1*
	愚园路	121°25'57"	31°13'15"	70	2018-06	1	YYL-1*
江西	江西中医药大学	115°44'43"	28°40'45"	60	2018-06	9	JZY1~9*
江苏	南京中医药大学	118°05'32"	32°10'68"	—	2017-11	8	HC1~8*
	南京中医药大学	118°04'85"	32°10'54"	—	2017-11	11	YY1~11*
陕西	陕西中医药大学	108°44'19"	34°19'03"	343.5	2019-04	20	SXZ1~20*
河南	河南中医药大学	113°48'07"	34°46'45"	90	2019-09	14	HZY1~14*
广东	广东药科大学 (原种为棱枝何首乌)	113°25'12"	23°03'36"	—	2019-11	1	LZ1*

*为引种样品, 未加*为农户种植样品, “—”代表无海拔数据, 下表同

The introduction samples were marked with “*”, while the farmers planting samples were not marked with “*”, in addition “—” means no elevation data

表 2 何首乌野生品来源

Table 2 Origin of wild *P. multiflorum* samples

产地	地点	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m	时间	数量/份	样品编号
广东	德庆官圩金光村	111°49'45"	23°18'18"	—	2017-09	1	JGC1
	德庆官圩五福村	111°47'39"	23°15'31"	40	2017-09	2	WFC1~2
	德庆官圩金林电站	111°24'40"	23°17'67"	80	2017-09	1	DZ1
	德庆官圩酒厂	111°23'	23°16'	—	2017-09	1	JC1
	高要河台	112°	23°	—	2017-09	2	HT1~2
	高州石鼓镇白泥塘村	110°47'47"	21°49'03"	20	2017-08	1	BNT1*
	肇庆鼎湖山	112°33'03"	23°9'42"	—	2017-10	1	DHS1
	德庆莫村镇太宪村	112°07'33"	23°24'35"	60	2017-07	2	TX1~2*
	云浮市大方镇增西村	111°34'37"	22°56'46"	96	2017-06	1	ZXC1
	茂名	110°	21°	—	2019-04	1	MM1
重庆	北碚区金刚碑	106°24'52"	29°50'23"	—	2017-10	5	JGB1~5
	北碚区西南大学	106°25'55"	29°49'41"	—	2017-10	6	XNU1~6
	南岸区五公里	106°34'48"	29°30'36"	—	2017-10	1	WGL1
	南川区重庆市药用植物园	107°12'36"	29°07'48"	—	2019-01	16	ZWY1~16
四川	巴中市南龛山	106°45'42"	31°50'44"	—	2017-10	2	NKS1~2
	巴中市平昌元山镇	107°10'29"	31°43'13"	—	2017-10	1	YSZ1
	简阳市平泉镇	104°38'52"	30°20'47"	—	2017	1	PQZ1
	乐山市峨眉山	103°20'20"	29°36'24"	1035	2018-05	1	EMS1
贵州		103°20'03"	29°36'13"	953	2018-05	1	EMS2
	成都市武侯区林荫街	104°04'07"	30°38'18"	519	2019-04	10	CD1~10
	贵阳市宝福山	106°45'05"	26°34'37"	—	2019-04	7	BFS1~7
	贵阳市小河	106°	26°32'21"	—	2019-04	9	XH1~9
湖南	贵阳市花溪	106°	26°23'04"	—	2019-04	3	HX1~3
	张家界贺龙公园	110°29'33"	29°22'53"	—	2018-08	1	HLP1
	南岳区衡山	112°42'48"	27°16'47"	360	2019-04	7	HS1~7
		112°41'40"	27°17'36"	1160	2019-04	2	HS8~9
江苏	南岳树木园	112°41'38"	27°17'47"	1230	2019-04	3	SMY1~3
	宜兴市	119°34'42"	31°10'36"	90	2018-05	1	YX1
		119°33'43"	31°10'35"	90	2018-05	1	YX2
		119°33'46"	31°10'27"	90	2018-05	3	YX3~5
安徽	广德县	119°35'49"	31°05'50"	90	2018-05	2	GD1~2
		119°35'45"	31°05'44"	90	2018-05	1	GD3
		119°35'59"	31°06'02"	90	2018-05	1	GD4
		119°36'04"	31°05'40"	90	2018-05	1	GD5
		119°36'16"	31°05'41"	100	2018-05	2	GD6~7
		119°36'17"	31°05'42"	100	2018-05	2	GD8~9
		118°08'30"	30°05'12"	—	2018-08	1	FXC1
	黄山市浮溪村	118°08'57"	30°04'44"	—	2018-08	5	FXC2~6

何首乌 SRAP-PCR 产物通过 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法进行条带显示。

1.3 数据统计

使用条带识别软件 Quantity-One 加人工识别的方式统计非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图上各泳道的条带迁移距离, 相同位置有条带则记为“1”, 无则为“0”, 并建立二维数据矩阵。利用 NTSYSpc、Popgen 32、MEGA 7 和 Structure 2.3.4 软件对数据进行统计, 获得何首乌种质的遗传多样性参数、遗传距离、样品聚类 and 分类结果。

2 结果及分析

2.1 13 对引物在何首乌种质研究中的多态性分析

如表 3 所示, 13 对 SRAP 引物扩增位点数范围为 17~31 个, 总位点数为 318 个, 其中多态位点数为 313 个, 所有引物均表现出极高的多态性, 其中有 9 对引物多态性百分数为 100%, 结果表明 13 对引物扩增条带及引物多态性丰富, SRAP 分子标记方法适用于何首乌种质的遗传多样性研究。

2.2 何首乌种质遗传多样性分析

何首乌种质遗传多样性、居群分化及基因交流程度结果如表 4 所示。野生品遗传多样性大于栽培品, 栽培品中的农户种植样品, 其奈氏基因多样性

(H) 和香农信息指数 (I) 均小于 0.01, 且多态位点百分比小于 5%, 表明以上居群遗传多样性较少, 居群内样品整齐度较高, 而引种样品遗传多样性则相对较高; 野生品种中, 重庆野生居群和四川野生居群的 H 和 I 值分别大于 0.2 和 0.3, 其多态性位点百分数分别为 71.1% 和 66.0%, 说明 2 居群野生何首乌遗传多样性较丰富; 而贵州、湖南和安徽野生居群遗传多样性则仅次于重庆和四川, 其他省份何首乌野生居群遗传多样性则相对较低。此外, 栽培品和野生品居群间基因多样性 (H_t) 均大于居群内多样性 (H_s), 说明种质多样性主要来自居群间。整个何首乌种质资源的基因差异分化系数 (G_{st}) 为 0.753 1 (>0.500), 表明地方群体间遗传分化程度大, 但居群间的基因交流值 (N_m) 为 0.163 9 (<1.000) 说明居群间的基因交流较少。另外栽培品的分化程度极高, 但基因交流则极小, 推测是由于栽培过程主要采用营养繁殖造成的。

2.3 何首乌遗传距离和遗传一致度

居群间的遗传距离和遗传一致度结果见表 5。栽培品中, 除德庆大桥村 CNT 居群外, 农户种植品居群间遗传一致度均大于 0.89, 说明农户栽培品种存在相互引种的情况。据调查, CNT 何首乌栽培方法与德庆其他地方差异较大, 且种苗一般为自留苗, 推测这可能是导致遗传距离较大的原因, 其块根形态与其它地区显示出明显差异, 提示该种源的特异性。同为上海的 2 个栽培品 YYL 和 YD 间遗传距离较小, 而棱枝何首乌则与其他所有居群的相似度均极小, 遗传相似系数约为 0.5; 野生品中, 广东野生居群和农户栽培品的相似度极高, 而贵州的野生居群和其他居群的遗传相似性均相对较低, 其值在 0.6~0.8, 但与四川居群的相似性最大, 遗传相似系数为 0.804 6。

2.4 何首乌遗传距离和地理距离的相关性

利用样品的经纬度信息, 代入 2 点间地理距离公式, 如公式 1 所示, 式中 x_1 和 x_2 分别表示地方 1 和地方 2 的纬度, 而 y_1 和 y_2 则表示地方 1 和地方 2 的经度, 单位为米, 如图 1 所示, 何首乌样品间地理距离和遗传距离间的相关性极低, 相关系数值仅为 7.326×10^{-4} , 说明遗传距离与地理距离无明显相关性。

表 3 13 对 SRAP 引物扩增结果

Table 3 Amplified results of 13 SRAP primers combinations

引物对	总位点数	多态位点数	多态性百分数/%
ME2EM9	24	24	100.0
ME2EM13	23	23	100.0
ME2EM18	19	19	100.0
ME2EM20	25	25	100.0
ME4EM11	24	24	100.0
ME6EM8	22	21	95.5
ME8EM3	25	23	92.0
ME8EM4	26	26	100.0
ME15EM15	17	17	100.0
ME17EM2	26	25	96.2
ME17EM9	29	28	96.6
ME17EM13	31	31	100.0
ME18EM8	27	27	100.0
13 对引物	318	313	98.4
平均值	24.5	24.1	98.4

$$\text{两点地理距离} = 2 \times \text{asin} \left[\left(\sin \left(\frac{\pi}{360} \times (x_1 - x_2) \right) \right)^2 + \cos \left(\frac{\pi x_1}{180} \right) \times \cos \left(\frac{\pi x_2}{180} \right) \times \left(\sin \left(\frac{\pi}{360} \times (y_1 - y_2) \right) \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \times 6370.996 \times 1000 \quad (1)$$

表 4 何首乌居群遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of *P. multiflorum* populations

居群名	居群个体数	N_a	N_e	H	I	多态位点数	多态位点百分数/%	H_i	H_s	G_{st}	N_m
STJ	18	1.006 3	1.002 0	0.001 3	0.002 1	2	0.63				
DT	20	1.003 1	1.001 0	0.000 7	0.001 2	1	0.31				
CNT	20	1.012 6	1.006 7	0.004 4	0.006 7	4	1.26				
TX	20	1.003 1	1.000 7	0.000 6	0.001 1	1	0.31				
BNT	20	1.009 4	1.001 0	0.000 9	0.001 9	3	0.94				
GG	26	1.034 6	1.007 2	0.004 9	0.008 4	11	3.46				
SKC	20	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	0	0.00				
SZY	9	1.242 1	1.167 0	0.093 9	0.137 5	77	24.21				
JZY	9	1.289 3	1.182 9	0.105 0	0.155 8	92	28.93				
YY	11	1.207 5	1.135 8	0.076 7	0.113 3	66	20.75				
HC	8	1.072 3	1.049 1	0.027 7	0.040 6	23	7.23				
SXZ	20	1.103 8	1.040 2	0.025 9	0.040 8	33	10.38				
HZY	14	1.289 3	1.167 9	0.097 4	0.146 1	92	28.93				
YYL	1	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	0	0.00				
YD	1	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	0	0.00				
LZ	1	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	0	0.00				
广东野生居群	13	1.317 6	1.184 5	0.107 9	0.161 8	101	31.76				
重庆野生居群	28	1.710 7	1.399 9	0.229 6	0.344 4	226	71.07				
四川野生居群	16	1.660 4	1.357 5	0.205 0	0.311 2	210	66.04				
贵州野生居群	19	1.496 9	1.255 9	0.150 3	0.228 5	158	49.69				
湖南野生居群	13	1.449 7	1.232 0	0.136 1	0.207 3	143	44.97				
江苏野生居群	5	1.242 1	1.160 8	0.091 5	0.135 0	77	24.21				
安徽野生居群	15	1.503 1	1.273 6	0.162 1	0.245 4	160	50.30				
栽培品	218	1.896 2	1.369 8	0.223 4	0.348 2	218	89.62	0.242 4	0.027 5	0.886 7	0.063 9
野生品	109	1.956 0	1.477 0	0.285 4	0.436 3	304	95.60	0.276 3	0.154 7	0.440 2	0.635 8
全部样品	327	1.984 3	1.454 9	0.271 7	0.417 9	313	98.43	0.268 0	0.066 2	0.753 1	0.163 9

表 5 何首乌居群间遗传距离和遗传一致度

Table 5 Genetic distance and genetic consistency between *P. multiflorum* populations

居群名	STJ	DT	CNT	TX	BNT	GG	SKC	SZY	JZY	YY	HC	SXZ	HZY	YYL	YD	LZ	广东野生居群	重庆野生居群	四川野生居群	贵州野生居群	湖南野生居群	江苏野生居群	安徽野生居群
STJ	****	0.941 5	0.776 3	0.906 9	0.973 0	0.965 8	0.995 0	0.782 6	0.830 1	0.775 1	0.753 9	0.737 6	0.750 1	0.774 8	0.734 0	0.534 3	0.927 7	0.812 9	0.791 9	0.653 9	0.811 7	0.779 2	0.763 4
DT	0.060 3	****	0.765 4	0.896 9	0.937 0	0.929 8	0.940 2	0.764 9	0.833 0	0.771 2	0.730 2	0.728 5	0.758 7	0.757 7	0.730 3	0.524 9	0.913 8	0.813 0	0.785 9	0.662 2	0.793 0	0.798 2	0.790 7
CNT	0.253 2	0.267 4	****	0.830 2	0.791 0	0.783 2	0.781 3	0.783 6	0.849 9	0.789 3	0.739 4	0.716 0	0.723 7	0.779 9	0.762 7	0.491 3	0.821 9	0.792 5	0.783 6	0.608 1	0.785 8	0.758 4	0.739 9
TX	0.097 8	0.108 8	0.186 0	****	0.927 9	0.920 3	0.911 9	0.754 3	0.830 3	0.759 3	0.769 5	0.692 7	0.728 7	0.767 2	0.732 6	0.496 7	0.887 8	0.788 5	0.754 2	0.603 3	0.773 8	0.758 3	0.738 6
BNT	0.027 4	0.065 1	0.234 5	0.074 8	****	0.993 2	0.978 0	0.775 2	0.828 5	0.758 6	0.762 7	0.722 0	0.741 8	0.770 6	0.723 4	0.519 0	0.917 4	0.805 1	0.779 3	0.631 3	0.794 4	0.778 0	0.765 2
GG	0.034 8	0.072 8	0.244 3	0.083 0	0.006 8	****	0.970 8	0.767 8	0.820 8	0.754 4	0.759 0	0.725 4	0.734 4	0.763 7	0.722 9	0.518 6	0.912 5	0.802 3	0.774 7	0.627 9	0.788 6	0.770 2	0.757 6
SKC	0.005 0	0.061 7	0.246 8	0.092 2	0.022 3	0.029 6	****	0.781 7	0.829 4	0.774 7	0.759 1	0.731 4	0.748 9	0.773 6	0.732 7	0.534 6	0.928 1	0.812 1	0.788 5	0.649 1	0.809 3	0.777 4	0.763 9
SZY	0.245 1	0.268 0	0.243 8	0.282 0	0.254 7	0.264 2	0.246 3	****	0.837 4	0.864 5	0.798 8	0.780 8	0.756 2	0.899 1	0.815 9	0.572 2	0.849 8	0.880 9	0.852 5	0.749 9	0.846 9	0.840 3	0.850 7
JZY	0.186 2	0.182 7	0.162 6	0.186 0	0.188 2	0.197 5	0.187 1	0.177 4	****	0.827 9	0.788 4	0.751 6	0.780 8	0.811 6	0.787 0	0.556 0	0.890 9	0.869 5	0.831 9	0.676 4	0.846 6	0.801 4	0.820 7
YY	0.254 8	0.259 8	0.236 6	0.275 3	0.276 3	0.281 8	0.255 3	0.145 6	0.188 9	****	0.797 9	0.821 6	0.778 6	0.815 2	0.960 9	0.575 5	0.844 2	0.882 9	0.867 6	0.699 4	0.856 5	0.867 4	0.882 0
HC	0.282 5	0.314 4	0.302 0	0.262 0	0.270 9	0.275 8	0.275 6	0.224 7	0.237 7	0.225 8	****	0.717 8	0.727 7	0.780 9	0.773 7	0.540 4	0.779 0	0.804 0	0.779 8	0.640 3	0.768 1	0.803 2	0.759 5
SXZ	0.304 4	0.316 7	0.334 0	0.367 2	0.325 7	0.321 0	0.312 8	0.247 5	0.285 6	0.196 5	0.331 6	****	0.750 9	0.745 4	0.775 3	0.576 3	0.779 4	0.812 4	0.857 6	0.680 0	0.777 6	0.797 6	0.824 8
HZY	0.287 6	0.276 2	0.323 3	0.316 5	0.298 6	0.308 7	0.289 2	0.279 5	0.247 5	0.250 3	0.317 9	0.286 5	****	0.746 2	0.733 0	0.604 3	0.801 9	0.819 9	0.826 9	0.707 5	0.799 1	0.775 3	0.801 8
YYL	0.255 2	0.277 4	0.248 6	0.265 0	0.260 5	0.269 6	0.256 7	0.106 4	0.208 7	0.204 3	0.247 3	0.293 9	0.292 7	****	0.783 0	0.540 9	0.832 4	0.837 4	0.810 1	0.698 7	0.815 2	0.801 5	0.810 6
YD	0.309 2	0.314 4	0.270 9	0.311 2	0.323 7	0.324 4	0.311 0	0.203 4	0.239 5	0.039 9	0.256 6	0.254 6	0.310 6	0.244 6	****	0.544 0	0.800 7	0.827 1	0.802 0	0.648 3	0.808 7	0.835 7	0.833 9
LZ	0.626 8	0.644 5	0.710 6	0.699 8	0.655 9	0.656 6	0.626 3	0.558 3	0.587 0	0.552 6	0.615 5	0.551 1	0.503 7	0.614 6	0.608 8	****	0.569 6	0.627 6	0.642 1	0.631 5	0.589 5	0.598 1	0.642 0
广东野生居群	0.075 1	0.090 1	0.196 1	0.119 0	0.086 2	0.091 6	0.074 6	0.162 7	0.115 5	0.169 3	0.249 7	0.249 2	0.220 8	0.183 5	0.222 3	0.562 8	****	0.880 5	0.863 0	0.714 1	0.857 6	0.840 7	0.843 8
重庆野生居群	0.207 2	0.207 1	0.232 5	0.237 6	0.216 7	0.220 2	0.208 1	0.126 9	0.139 8	0.124 5	0.218 1	0.207 8	0.198 5	0.177 5	0.189 8	0.465 8	0.127 3	****	0.911 6	0.795 4	0.881 3	0.855 9	0.892 6
四川野生居群	0.233 4	0.240 9	0.243 8	0.282 1	0.249 4	0.255 2	0.237 7	0.159 6	0.184 1	0.142 1	0.248 7	0.153 7	0.190 1	0.210 6	0.220 6	0.443 0	0.147 3	0.092 6	****	0.804 6	0.867 2	0.864 5	0.890 7
贵州野生居群	0.424 9	0.412 2	0.497 4	0.505 3	0.459 9	0.465 3	0.432 2	0.287 8	0.391 0	0.357 5	0.445 9	0.385 7	0.346 0	0.358 6	0.433 4	0.459 7	0.336 8	0.228 9	0.217 4	****	0.764 3	0.702 0	0.785 0
湖南野生居群	0.208 6	0.232 0	0.241 1	0.256 5	0.230 2	0.237 5	0.211 5	0.166 2	0.166 6	0.154 9	0.263 9	0.251 5	0.224 2	0.204 3	0.212 3	0.528 4	0.153 6	0.126 4	0.142 5	0.268 7	****	0.848 4	0.876 8
江苏野生居群	0.249 5	0.225 4	0.276 6	0.276 7	0.251 0	0.261 1	0.251 8	0.174 1	0.221 5	0.142 3	0.219 1	0.226 2	0.254 5	0.221 3	0.179 5	0.514 1	0.173 5	0.155 6	0.145 7	0.353 9	0.164 4	****	0.887 0
安徽野生居群	0.270 0	0.234 8	0.301 3	0.302 9	0.267 6	0.277 6	0.269 3	0.161 7	0.197 6	0.125 5	0.275 1	0.192 7	0.220 9	0.210 0	0.181 6	0.443 2	0.169 8	0.113 6	0.115 7	0.242 1	0.131 4	0.1199	****

****上方为居群间的遗传一致度，****下方为居群间的遗传距离

The top of **** in the table is the genetic consistency between populations, and the bottom of **** is the genetic distance between populations

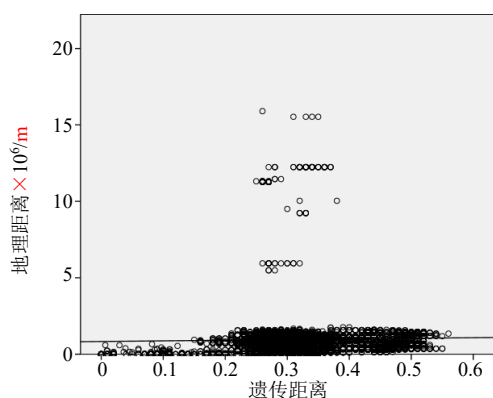


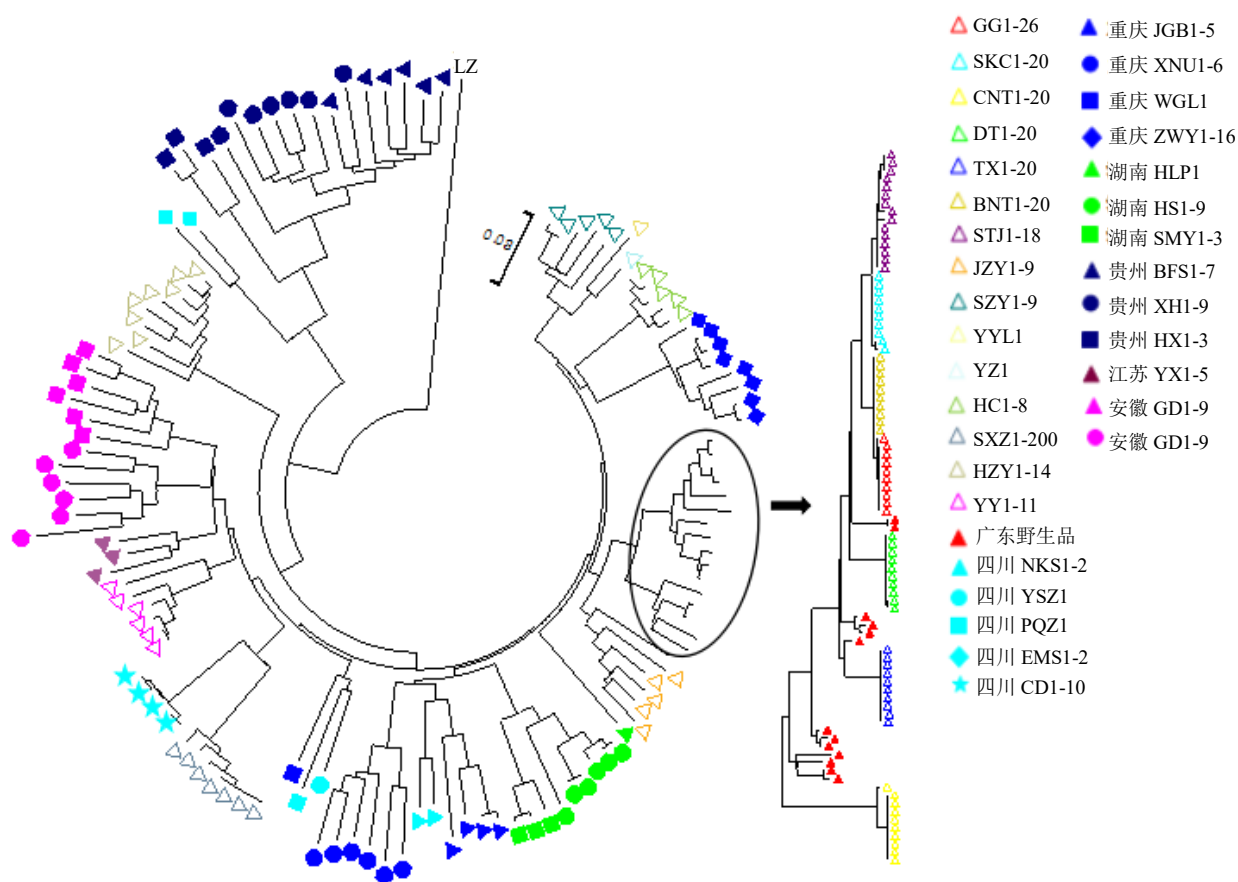
图 1 何首乌样品间遗传距离和地理距离的相关性
Fig. 1 Correlation between genetic distance and geographical distance among *P. multiflorum* samples

2.5 何首乌样品的聚类分析和主成分分析

采用邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建何首乌样品的聚类树, 结果如图 2 所示。何首乌样品主

要分成 4 大分支, 第 1 分支为棱枝何首乌, 它与其它种源表现出明显的不同, 因此独立成支; 第 2 分支包括四川的 EMS1-2 和贵州的所有野生品, 而河南郑州的样品则聚类为第 3 支, 其余的所有样品组成第 4 分支。第 4 分支中, 农户种植的栽培品相似度较高, 聚为一小支, 而广东野生品则分散聚类在该小支中, 此外, 除重庆和四川的样品聚类结果较为分散外, 其余采自相同省份和相同地点的样品基本能聚在一起, 说明重庆和四川的野生品遗传多样性较大, 样品间存在较大差异。

样品主成分分析分布图见图 3, 图中样品距离越小代表样品间的遗传关系越接近, 反之则说明亲缘关系越远。利用主成分分析对样品进行分类, 主要可以把何首乌样品分成 3 个类群, 分类结果和 NJ 聚类结果相似, 棱枝何首乌单独作为一个类群, 第 2 类群为贵州省的所有样品和四川峨眉山的 2 个样品, 而第 3 类群则由其他样品组成。



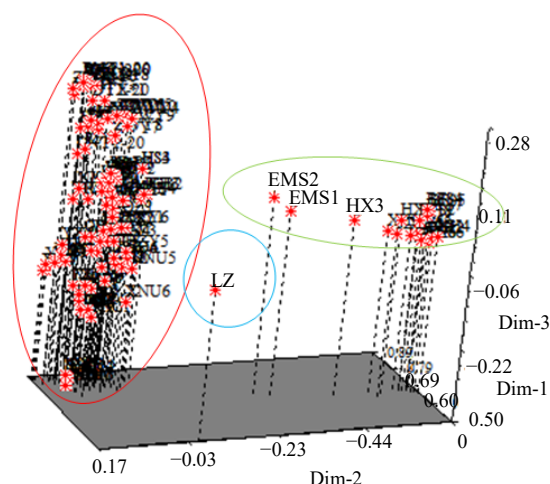


图 3 何首乌样品主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of *P. multiflorum* samples

2.6 何首乌群体结构分析

利用 Structure 2.3.4 软件对何首乌种质进行群体结构分析,假定群体数目 K 值为 1~23,每个 K 值重复运算 10 次,根据 Evanno 等^[14]的方法计算出 ΔK 值,如图 4 所示,结果表明当 $K=16$ 时,其 ΔK 值最大,说明种群分成 16 个类群时最佳,并由此获得群体结构图,如图 5 所示,不同颜色代表不同类群,每个长方形表示一个样品,纵坐标为各类种群质占其祖先成分的比例,根据刘丽华等^[15]的研究,单个样品某血统 $Q \geq 0.600$ 说明该样品血统及遗传基础较单一,可归类到对应的类群中, $Q < 0.600$ 则具有混合血缘,即遗传结构比较复杂且没有明确的类群归属特性,经样品归纳如表 6 所示,何首乌 327 份样品中,319 份样品在某一类群中的 $Q \geq 0.600$,说明何首乌群体中大部分种质的遗传结构较简单,而 EMS (1~2)、HLP1、JGB1、DZ1、JGC1 及 HT (1~

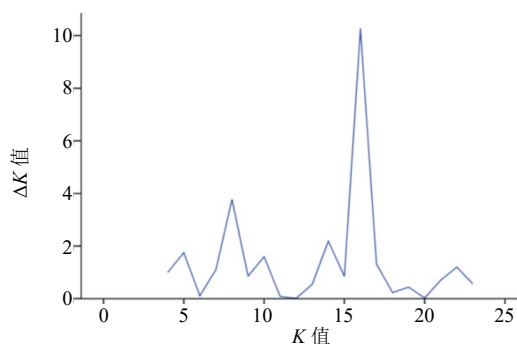


图 4 ΔK 值运算结果

Fig. 4 ΔK value operation result

2) 样品则血统相对复杂。此外结果还表明,相同采集点样品血缘组成相似,可大致归在同一类群中,其中除 CNT 血统较为特殊外,其余农户栽培品遗传基础相同均归为一类。和 NJ 聚类相似,群体结构的分类是 NJ 聚类 4 大分支基础上的细分和调整,不同的地方是在 NJ 聚类图中单独成支的棱枝何首乌 (LZ) 此处则与重庆和四川的野生品 WGL1、PQZ1 和 YSZ1 分在同一类。

3 讨论

3.1 SRAP 分子标记方法在何首乌种质研究中的有效性

本实验结果表明,利用 SRAP 分子标记技术研究何首乌栽培和野生种群的遗传多样性,其扩增条带及多态性条带较丰富,且通过 SRAP 标记数据对种群进行划分,分类结果和种质来源相符,证明该方法能够反映何首乌种质遗传多样性和遗传差异的真实情况,目前相关研究也证明,SRAP 分子标记是遗传多样性估计和种群关系的有效分析工具^[16]。

3.2 何首乌居群遗传多样性

经种质遗传多样性分析,野生居群的多样性大于栽培居群,尽管引种品居群内及居群间样品存在一定的遗传多样性,但由于农户种植品种存在相互引种的情况,且居群内种源一致度较高,因此相较于野生居群,栽培品居群整体的多样性较低。而野生居群中,四川和重庆居群的遗传多样性较高,湖南、贵州和安徽居群次之,而广东和江苏居群相对较低。通过地形分析发现,四川、重庆位于我国西

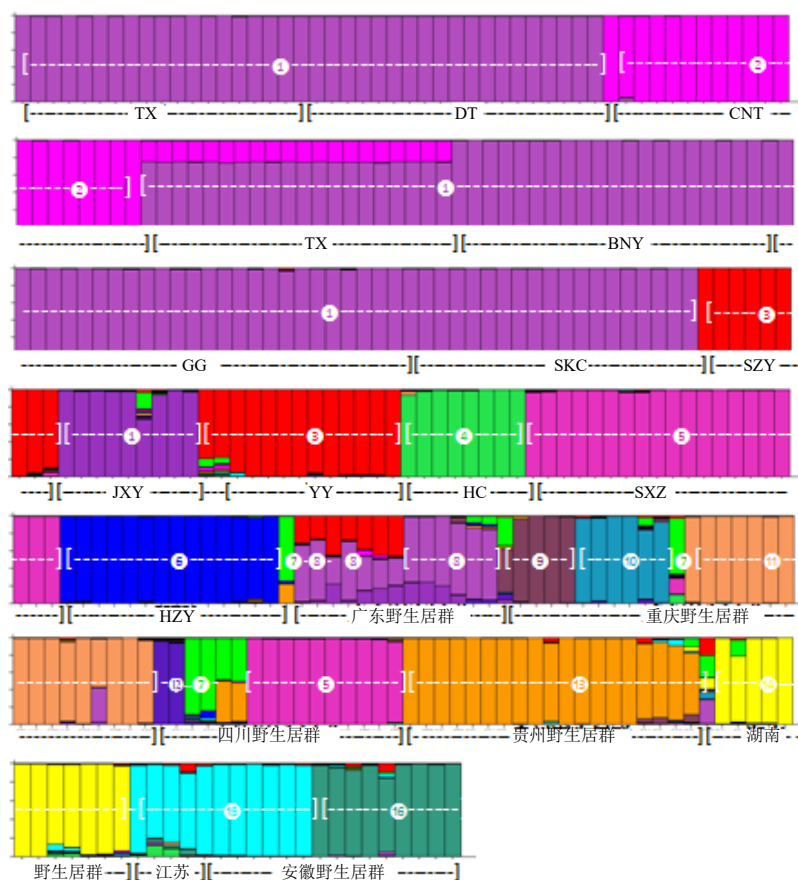


图 5 何首乌群体结构

Fig. 5 Population structure of *P. multiflorum*

表 6 何首乌样品分类结果

Table 6 Classification results of *P. multiflorum* samples

Q 值	组别	样品编号
≥0.600	1	TX (1~20)、DT (1~20)、BNT (1~20)、STJ (1~18)、GG (1~26)、SKC (1~20)、JZY (1~9)
	2	CNT (1~20)
	3	SZY (1~9)、YD1、YYL1、YY (1~11)
	4	HC (1~8)
	5	SXZ (1~20)、CD (1~10)
	6	HZY (1~14)
	7	LZ1、WGL1、PQZ1、YSZ1
	8	WFC (1~2)、JC1、DHS1、BNT*1、ZXC1、MM1、TX* (1~2)
	9	JGB (2~5)
	10	XNU (1~6)
	11	ZWY (1~16)
	12	NKS (1~2)
	13	BFS (1~7)、XH (1~9)、HX (1~3)
	14	HS (1~9)、SMY (1~3)
	15	YX (1~5)、FXC (1~6)
	16	GD (1~9)
<0.600		EMS (1~2)、HLP1、JGB1、DZ1、JGC1、HT (1~2)

南地区, 地处第 1 和第 2 阶梯中, 地形海拔高、重峦叠嶂、复杂多变, 湖南和安徽虽处于第 3 阶梯, 然而两地样品采集地分别为衡山和黄山, 海拔较高, 而贵州的 3 个样品采集点也位于云贵高原中, 其它

采样点则处于南方丘陵地区和华东、华中平原地带, 由此可见, 地形复杂性和海拔可能是影响遗传多样性程度的重要因素。也有研究发现利用 ISSR^[8]技术, 野生和栽培何首乌的多样性无明显差异, 经核

对文献,本课题组认为样品采集数量和采样点分布范围及研究方法的不同造成了结果的不一致。此外,基因交流是减少遗传漂变的重要途径,然而何首乌为自交物种^[10],因此居群基因交流少,而遗传分化程度高。

3.3 遗传距离和地理距离的关系

研究结果表明何首乌样品间遗传距离与地理距离无明显相关性。首先栽培品存在相互引种的情况,再者西南地区地形复杂,居群多样性高,尽管西南地区内部采样点相距较近,但地形差异造成的遗传分化致使遗传距离相对较大,2 个原因共同导致两者不呈明显的相关性。

3.4 NJ 聚类结果和 STRUCTURE 居群结构分析结果及比较

NJ 聚类和 STRUCTURE 群体分析是种质亲缘关系研究及样品分类的方法,相较于 NJ 聚类,STRUCTURE 既可以研究每个样品的血统构成,还可以明确种群的最佳类群数,而聚类分析则是根据样品间的差异程度进行分类,类群数一般为人为所定,缺乏一定的科学性,不过聚类图能清楚呈现类群间的亲缘关系,因此结合 2 种方法能更深入地探究种质的群体结构。

利用遗传距离构建的聚类结果和以 STRUCTURE 软件获得的居群结构分析结果对种源的分类基本一致,聚类特点与已有研究相似,即聚类结果与地理分布相符,相同采集点样品可分在同一类中^[8-10,17-19]。群体结构分析显示,大部分何首乌样品的血缘组成较单一,相同采集点样品血缘组成相似,可大致归在同一类群中,其中除 CNT 血缘较为特殊外,其余农户栽培品遗传基础相同均归为一类。值得关注的结果是农户种植品种和广东野生品种聚为一支,说明样品间亲缘关系较接近,从侧面可反映目前农户栽培品可能由广东野生品种驯化而来,并且广东野生品间并未出现明显分化。另外,四川 EMS 和贵阳的样品与其它样品遗传距离大,独立成支,有研究人员在何首乌种质研究中也发现,贵州居群叶片侧叶脉有较程度的白斑,同时该居群与其它居群遗传距离较大,基因交流值仅为 0.01^[8],而本实验也同样发现贵阳的居群叶脉有较大的白斑,可能是样品位于云贵高原的特殊地形所致。同时,棱枝何首乌在何首乌种群中表现出极大的特异性,与其他种源遗传距离大,支持将其列为何首乌的变种。

上述结果可以把何首乌种质特点总结为:由于较快的遗传进化速度,为适应多变的环境,何首乌形成不同的地理种源,相同环境下何首乌遗传距离小,相似度较高,且血缘组成相同,而地理距离较近,但不同地形环境的何首乌存在差异,因此地形的复杂性和海拔是何首乌种群遗传多样性的重要影响因素。由于何首乌为自交的物种,基因交流少,因此地理环境所造成的居群遗传分化未能通过基因交流而得到减少,所以何首乌居群间的遗传分化较大,最终导致何首乌大部分样品的血统组成单一,但是不同生长环境居群的血缘组成不同的现象。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨丽. 中药学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 28.
- [2] 黄志海, 徐文, 张靖, 等. 中药何首乌全球生态适宜性分析 [J]. 世界中医药, 2017, 12(5): 982-985.
- [3] 刘海华, 艾伦强, 唐春梓, 等. 何首乌野生资源调查及存在的问题 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(24): 5718-5721.
- [4] 黄和平, 王键, 黄璐琦, 等. 何首乌资源现状及保护对策 [J]. 海峡药学, 2013, 25(1): 40-42.
- [5] 史顺敏, 俞年军, 于凡, 等. 丹参种质资源的研究进展 [J]. 现代中医药, 2016, 36(6): 113-117.
- [6] 徐海明. 种质资源核心库构建方法的研究及其应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [7] 陈红波, 余金芮, 杨春先, 等. 药用植物研究中的分子标记技术应用进展 [J]. 湖北农业科学, 2017, 56(13): 2401-2405.
- [8] 方清茂. 栽培与野生何首乌种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [A] // 中药饮片质量分析与中药鉴别技术交流研讨会论文集 [C]. 北京: 北京晟励炎国际会议服务中心, 2009: 45-51.
- [9] 王凌晖, 曹福亮, 汪贵斌, 等. 何首乌野生种质资源的 RAPD 指纹图谱构建 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(4): 37-40.
- [10] 程远辉. 基于 SRAP 分析的重庆何首乌种质资源整理研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [11] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2/3): 455-461.
- [12] Roberts D W H, Wolfe A D. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for

- studies in plant molecular biology (1.) [J]. *Appl Plant Sci*, 2014, 2(7): 1400017.
- [13] Jia S Z, Yan Z M, Wang Y H, *et al.* Genetic diversity and relatedness among ornamental purslane (*Portulaca* L.) accessions unraveled by SRAP markers [J]. *3 Biotech*, 2017, 7(4): 241.
- [14] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [15] 刘丽华, 王立新, 赵昌平, 等. 光温敏二系杂交小麦恢复系遗传多样性和群体结构分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(9): 867-875.
- [16] Zhang R P, Wu J, Li X G, *et al.* An AFLP, SRAP, and SSR genetic linkage map and identification of QTLs for fruit traits in pear (*Pyrus* L.) [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2013, 31(3): 678-687.
- [17] 张宏意, 袁林林, 饶秋红, 等. 不同产地何首乌叶绿体 psbA-trnH 基因序列分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(5): 1146-1149.
- [18] 白明明, 孙小芹, 郭建林, 等. 基于 psbA-trnH 分析的何首乌野生居群遗传多样性 [J]. *植物资源与环境学报*, 2012, 21(2): 36-44.
- [19] 严寒静, 房志坚, 余世孝. 不同种源何首乌的 ITS 序列分析及其亲缘关系研究 [J]. *西北植物学报*, 2008, 28(5): 922-927.

[责任编辑 时圣明]