

基于SSR分子标记的灯盏花遗传多样性分析

田星, 李中霖, 刘小莉*, 李国栋*

(云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南省中医药分子生物学重点实验室,
昆明 650500)

[摘要] 目的:研究灯盏花 *Erigeron breviscapus* 居群遗传多样性,为灯盏花资源的合理利用与保护提供科学依据。方法:采用12对简单重复序列(SSR)分子标记对灯盏花16个野生居群共243个样品进行遗传多样性研究,计算遗传多样性参数,并进行主坐标分析和结构聚类分析。结果:共检测到209个等位基因,平均每个位点的等位基因数为17.417个;基于12对SSR引物和16个灯盏花居群,观测杂合度(H_0)分别为0.603,0.613,期望杂合度(H_c)分别为0.658,0.659,香浓(Shannon)信息指数(I)分别为1.443,1.446,遗传分化系数(F_{st})0.123,基因流(N_m)2.077;分子方差分析(AMOVA)与遗传分化分析结果显示主要变异来源于居群内个体间变异;居群间遗传距离和遗传一致度分别为0.107(YA和XY)~0.713(SZ和XZD),0.490(SZ和XZD)~0.899(YA和XY);主坐标分析和结构聚类分析分别将16个居群分为2组。结论:SSR分子标记结果显示,灯盏花居群遗传多样性较高,居群内和居群间具有一定的遗传分化和 N_m ;遗传变异主要存在于居群内个体间。该实验结果可为灯盏花后续优良种质选育等研究提供参考依据。

[关键词] 灯盏花;简单重复序列(SSR)分子标记;遗传多样性;遗传结构;主坐标分析;聚类分析

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0136-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211119

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210705.1333.001.html>

[网络出版日期] 2021-07-06 9:13

Genetic Diversity Analysis of *Erigeron breviscapus* Based on SSR Markers

TIAN Xing, LI Zhong-ji, LIU Xiao-li*, LI Guo-dong*

(Yunnan Provincial Key Laboratory of Molecular Biology for Sinomedicine, Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the genetic diversity and population structure of *Erigeron breviscapus*, so as to provide a scientific basis for its resource protection and rational utilization. **Method:** Twelve pairs of simple sequence repeat (SSR) primers were screened out from 243 individuals in 16 natural populations to calculate the genetic diversity parameters of *E. breviscapus*, which were then subjected to principal coordinate analysis and cluster analysis. **Result:** Twelve SSR markers generated 209 alleles, with an average of 17.417 alleles per locus. Based on 12 SSR markers and 16 populations of *E. breviscapus*, the observed heterozygosity (H_0) values were determined to be 0.603 and 0.613, the expected heterozygosity (H_c) to be 0.658 and 0.659, and the Shannon's information index (I) to be 1.443 and 1.446, respectively. The Wright's fixation index (F_{st}) was 0.123 and gene flow (N_m) was 2.077. Analysis of molecular variance (AMOVA) and genetic differentiation revealed that genetic variation within populations was the main source of total variation.

[收稿日期] 20210428(023)

[基金项目] 云南省应用基础研究——中医联合面上项目(2018FF001-039);云南中医药大学中药学院学科建设专项(2019ZY014);云南省中青年学术技术带头人后备人才项目;云南省高层次人才培养支持计划“青年拔尖人才”专项

[第一作者] 田星,在读硕士,从事中药资源开发与利用研究工作,E-mail:mrtstar888@163.com

[通信作者] *刘小莉,博士,副教授,从事中药资源开发与利用研究工作,E-mail:kmxunzi@aliyun.com

*李国栋,博士,副教授,从事分子生药学研究,E-mail:gammar116@163.com;

The Nei's genetic distance and genetic identity coefficients were within the ranges of 0.107 (YA and XY)-0.713 (SZ and XZD) and 0.490 (SZ and XZD)-0.899 (YA and XY), respectively. As demonstrated by the principal coordinate analysis and cluster analysis, the 16 populations of *breviscapus* were divided into two clusters.

Conclusion: The genetic diversity of *E. breviscapus* was relatively high and there existed certain genetic differentiation and gene flow within and among populations. The genetic variation was mainly present within populations. All these have provided reference for subsequent study on good germplasm selection of *E. breviscapus*.

[Keywords] *Erigeron breviscapus*; simple sequence repeat(SSR) molecular markers; genetic diversity; genetic structure; principal coordinate analysis; cluster analysis

灯盏花又名灯盏细辛或短葶飞蓬,生于海拔1 200~3 500 m的中山和亚高山开旷山坡草地、林缘或疏林下^[1],主要分布于我国西部和西南部等地。其性寒、微苦、甘温辛,具有解毒、祛风除湿、活血化瘀、通经活络、消炎止痛的功效。目前,灯盏花被广泛用于心脑血管系统疾病、糖尿病、肾病、颈性眩晕等疾病的治疗^[2]。云南是灯盏花分布的核心区域,其资源总量约占全国总产量的97%,采集量约占全国的95%^[3]。作为云南道地药材,也是重点开发的“五大天然系列”药物之一。

随着对灯盏花药材需求量的不断增加和对野生资源的过度采挖,野生资源蕴藏量越来越不能满足人民日常用药需求和企业生产的需要,加之灯盏花成片分布的地区很少,野生药材储备量低于市场需求量,人工栽培已经成为灯盏花药材的主要来源^[4]。因此,对于灯盏花现状进行科学合理评价且提出科学的保护策略已经是迫在眉睫。

简单重复序列(SSR)具有数量丰富、多态性高、信息含量高、不受外界环境等因素的影响等特点,并且是共显性遗传已被广泛用于濒危及药用植物的群体遗传学研究^[5-6]。如枸杞子^[7]、滇重楼^[8]、栀子^[9]等药用植物。张笑等^[10]对绞股蓝的遗传多样性和遗传结构进行了研究,结果显示,绞股蓝自然居群遗传多样性较低,群体遗传结构清晰,为绞股蓝资源的合理利用和保护提供了科学依据;胡一凡等^[11]评价了云南草果居群的遗传多样性得出云南黄花草果遗传多样性水平偏高,遗传变异主要存在于居群内,为云南草果资源的分子鉴定奠定了基础。目前,对于灯盏花的遗传多样性主要采用随机扩增多态性DNA(RAPD)^[12-13],简单重复序列区间(ISSR)^[14],扩增片段长度多态性(AFLP)^[15]等分子标记进行研究,基于SSR分子标记对于灯盏花的研究还未见报道。

本研究利用12对SSR分子标记对灯盏花16个

野生居群的遗传多样性和遗传结构进行了分析,目的在于了解该物种资源现状和遗传背景,以期对灯盏花资源评价、优良种质筛选、分子标记辅助育种等研究提供参考和依据。

1 材料

本研究采集了灯盏花分布区内16个野生居群共243个分子样品材料,见表1。经云南中医药大学李国栋副教授鉴定为菊科飞蓬属多年生草本植物灯盏花 *Erigeron breviscapus*。将采集到的洁净、幼嫩的叶片放入装有硅胶珠的自封袋中迅速脱水干燥,带回实验室-80℃保存,凭证标本存放于云南中医药大学标本馆。

表1 16个灯盏花居群基本信息

Table 1 Information on 16 populations of *Erigeron breviscapus*

样品采集地	居群编号	经度(E)	纬度(N)	海拔/m	取样数/个
云南昆明澄江县	CJ	24°27'	102°31'	2 777	15
云南香格里拉小中甸	XZD	27°16'	99°29'	3 234	15
云南香格里拉易司乡	ZDYS	27°48'	99°46'	3 337	15
云南香格里拉金江镇	JJ	27°02'	99°57'	2 354	15
云南丽江玉湖村	LJ	27°00'	100°12'	2 746	15
云南大理剑川县	JC	26°33'	99°58'	2 583	15
云南怒江兰坪县	LP	26°35'	99°26'	2 910	15
云南大理下关镇	DL	25°42'	100°07'	2 709	15
云南大理祥云县	XY	25°27'	100°30'	2 061	15
云南玉溪新平县	XP	24°04'	101°59'	1 496	15
云南红河个旧市	GJ	23°19'	103°10'	2 182	15
云南曲靖师宗县	SZ	24°44'	104°07'	1 914	15
云南昆明嵩明县	SM	25°22'	102°43'	2 247	15
云南楚雄姚安县	YA	25°15'	101°07'	2 182	15
云南大理云龙县	YL	23°32'	99°09'	1 988	15
云南曲靖宣威市	XW	25°10'	103°14'	2 004	18

EDC-810型聚合酶链式反应(PCR)仪(北京东胜创新生物科技有限公司);3730XL型基因测序仪

(美国ABI公司);Quantum-ST型凝胶成像系统(郑州南北仪器设备有限公司);DYCP-32B型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Nanodrop One型微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技有限公司);Allegra 25R型台式高速冷冻离心机(美国Beckman公司);DK-8B型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);YXQ-75S II型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);Eppendorf微量可调移液器(德国Eppendorf公司);GeneScan™-120型GeneScan(美国ABI公司);LIZ-500型分子量内标(美国ABI公司,大小分别为35,50,75,100,139,150,160,200,250,300,340,350,400,450,490,500 bp,批号1907447)等。

新型快速植物基因组DNA提取试剂盒(BioTek,批号B007011019),三羟甲基氨基甲烷(Tris,批号EZ5679D134),硼酸(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号171026),乙二胺四乙酸(EDTA,Biosharp公司,批号67096248),2×EasyTaq PCR mix酶(北京全式金生物技术有限公司,批号P10127),Taq DNA聚合酶(美国赛默飞世尔科技有限公司,批号2075064)等。

2 方法

2.1 灯盏花DNA提取 取新鲜幼嫩叶片,利用植物基因组DNA提取试剂盒提取总DNA。用1%琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop One微量分光光度计检测DNA质量及浓度。

2.2 PCR扩增 从刘松卫等^[16]筛选出来的30对灯盏花SSR引物中,挑选了12对具有高度多态性[多态信息含量(PIC)>0.5],重复性高,稳定性好的特异性引物,运用Primer 5.0软件设计引物,引物信息和毛细管电泳荧光标记类型(FAM-蓝色,HEX-绿色,TAMRA-黑色),见表2。PCR反应体系15 μL:模板DNA 1 μL,正反向引物各0.15 μL,dNTPs 0.3 μL,Taq Buffer 1.5 μL,缓冲液 1.5 μL,Taq DNA聚合酶(5 U·μL⁻¹)0.3 μL,ddH₂O 10.1 μL。PCR反应程序:94 °C预变性3 min,94 °C变性15 s,55 °C退火15 s,72 °C延伸30 s,共35个循环,72 °C延伸3 min,最后4 °C保存。PCR扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,然后根据琼脂糖凝胶电泳结果估计PCR产物浓度,并将产物稀释10倍后,与LIZ-500内标混匀,置于ABI3730XL型测序仪样本架上进行毛细管电泳检测。

2.3 数据分析 利用群体遗传学软件GenAlex 6.41计算每个位点的等位基因(N_a),有效等位基因

(N_e),期望杂合度(H_e),观测杂合度(H_o),基因分化系数(F_{st}),基因流(N_m)等遗传多样性参数,并且对群体内和群体间不同水平的遗传变异来源进行分子方差分析(AMOVA),主坐标分析(PCoA)。采用STRUCTURE 2.3.4软件对来自不同居群的灯盏花个体进行贝叶斯聚类分析。程序运行参数根据居群数将 K 值设定为1~15,每个 K 值运行重复20次。10万次马尔科夫蒙特卡洛(MCMC)和100万次burn-in。根据STRUCTURE Harvester分析获得的最优的 ΔK 值来判断居群的分组情况。

3 结果与分析

3.1 灯盏花遗传多样性 12对SSR引物用于16个野生居群243个个体的检测,共检测到209个 N_a ,每个位点的 N_a 在9~30不等,平均每个位点的 N_a 为17.417个。 H_o 在0.238~0.980, H_e 在0.257~0.835,香浓信息指数(I)介于0.515~2.130。 N_a,N_e,H_e,H_o,I 平均值分别为17.417,4.088,0.658,0.603,1.443,由此可以看出12对SSR引物多态性水平较高,灯盏花在物种水平上的遗传多样性也较高。见表3。

在16个灯盏花居群中, H_o 在0.500~0.711,平均为0.613,其中最高的是ZDYS居群,最低的是DL居群; H_e 在0.558~0.729,平均为0.659,其中最高的是XW居群,最低的是DL居群。除ZDYS居群外,其余居群的 H_o 均小于 H_e ,说明居群间存在杂合度缺失的现象。每个居群 N_a 介于5.750~8.500,平均为6.771, N_e 介于3.223~5.737,平均为4.095, I 在1.204~1.689,平均为1.446。在所有的居群中,DL居群的 N_e,I,H_e,H_o 均是最低的,说明DL居群的遗传多样性最低;LJ居群的 N_a,N_e,I 均是最高的,表明LJ居群相对于其他居群遗传多样性高。见表4。

3.2 居群遗传分化和 N_m 利用GenAlex 6.41计算 F 统计量与 N_m ,群体内近交系数(F_{is})有2个位点(P2-16,P2-95)为负值,说明群体内存在杂合子过剩,其余各位点均为正值0.015~0.206,平均为0.072;群体总近交系数(F_{it})在P2-95位点上出现负值(-0.136),其余位点均为正值0.100~0.383,平均为0.185,从 F_{is} 和 F_{it} 结果中显示灯盏花群体的近交程度较高,而远交程度相对较低。见表5。

灯盏花居群的遗传分化系数(F_{st}) 在0.060~0.223,表明灯盏花各居群间存在着不同程度的遗传分化,最小为位点P2-11(0.060),最大为位点P2-80(0.223),平均为0.123,说明12.3%的遗传变异来自居群之间,87.7%的遗传变异来自居群内,遗传变异主要是由居群内部个体间差异引起的。灯盏花 N_m

表2 12对灯盏花引物

Table 2 Twelve primers used for amplifying microsatellite loci of *Erigeron breviscapus*

引物位点	重复单元	片段长度/bp	引物序列(5'-3')	荧光标记
P1-2	TGA (3*7)	221	上游 CCCATGCTTATGTGTGTATGTGT	FAM
			下游 CATCATGATTCCCTCCATTATC	
P1-7	TC (2*6)	157	上游 CCTATCCTCCACTCACTCACACT	HEX
			下游 ATGATGTTGATGGTGATTCTTGA	
P1-33	TGT (3*13)	155	上游 TACCCTCGGGTAGAGGTATGACT	TAMRA
			下游 GGATTCTAACAGAACTCAACCG	
P2-11	CGGTC (5*6)	149	上游 CACTTCGGTCTTCGGTCTTACT	FAM
			下游 GACACTATGAGTGCTTGGTCACA	
P2-16	GTT (3*6)	155	上游 AGCAGCTCCCTACCTTTGAGTAG	HEX
			下游 TGCAGATCTGAACTCTTTGTGAG	
P2-20	TATG (4*10)	139	上游 TGAAAGGATTTATGCAGTTTGA	TAMRA
			下游 CATCTAGCCACTTCCAGTAATGC	
P2-52	CAC (3*8)	144	上游 GATCCTTATCAACCCGCTATTTC	FAM
			下游 ATTAGTAGATGGATGGCGATTTG	
P2-53	TAT (3*10)	170	上游 GTTGCCGTGTGTAATTATAGGC	HEX
			下游 TACGAGCAGGGACAATTTCTGTA	
P2-80	ACA (3*7)	162	上游 GTCATTGGTTAGTCCTTGAGCTG	TAMRA
			下游 TACATCATACTCCCTCATAGCC	
P2-82	TG (2*12)	154	上游 GGAAGGTGATGGTTTGTGTGTAT	FAM
			下游 AGATCTGGTACAAAGCCTACACG	
P2-88	TTG (3*6)	161	上游 CTTATGGAAGCAGCCTCTCTACC	HEX
			下游 GTTTGTGACTTTGTCCCTTTGAG	
P2-95	TCA (3*6)	164	上游 ACCCAAATCAAAGAAATTACACG	TAMRA
			下游 GGATTAAGCTGGTGAATATGACG	

表3 不同位点的灯盏花遗传多样性分析

Table 3 Analysis genetic diversity of *Erigeron breviscapus* at different locus

位点	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F
P1-2	17	3.406	1.426	0.671	0.682	0.009
P1-7	19	3.085	1.286	0.503	0.617	0.168
P1-33	23	5.279	1.794	0.718	0.796	0.099
P2-11	9	3.106	1.275	0.580	0.655	0.106
P2-16	10	1.949	0.797	0.403	0.396	-0.049
P2-20	17	4.938	1.662	0.704	0.752	0.063
P2-52	11	1.523	0.515	0.238	0.257	0.067
P2-53	30	7.688	2.130	0.689	0.835	0.173
P2-80	15	2.743	1.140	0.478	0.602	0.149
P2-82	21	5.624	1.841	0.575	0.772	0.115
P2-88	21	4.323	1.641	0.695	0.731	0.051
P2-95	16	5.395	1.811	0.980	0.804	-0.225

在0.870~3.885,平均为2.077,说明居群间存在着一定的基因交流。

3.3 居群遗传结构分析 采用AMOVA对灯盏花16个居群在居群间和居群内的分布程度进行了检测,灯盏花有16%的遗传变异存在于居群间,84%的遗传变异存在于居群内,此结果与灯盏花群体遗传分化分析结果基本一致,即灯盏花主要遗传变异来源于居群内个体间变异,见表6。PCoA分析结果将灯盏花16个居群分为2组,第1组包括CJ, SZ, XW, GJ, XP, SM居群;第2组包括YA, XY, LP, LJ, ZDYS, YL, XZD, DL, JC, JJ居群。见图1。

为进一步分析灯盏花各居群间亲缘关系,本实验根据Nei的计算方法采用Nei's遗传距离和遗传一致度矩阵比较16个居群的遗传相似性,见表7。从表中可以看出居群间遗传距离为0.107~0.713,遗传距离最近的是YA居群和XY居群;遗传距离最远

表4 灯盏花不同居群的遗传多样性分析

Table 4 Analysis on genetic diversity of *Erigeron breviscapus* populations

居群	N_a	N_e	I	H_o	H_e	H_c	F
CJ	6.333	4.032	1.413	0.628	0.672	0.695	0.040
SZ	6.667	3.802	1.479	0.611	0.694	0.718	0.115
XP	6.583	3.654	1.464	0.583	0.680	0.704	0.156
GJ	6.083	3.715	1.456	0.656	0.701	0.725	0.055
XW	6.500	3.950	1.526	0.662	0.729	0.750	0.097
SM	7.167	4.057	1.489	0.644	0.675	0.698	0.055
YA	7.750	4.973	1.565	0.606	0.671	0.694	0.089
XY	6.500	3.466	1.350	0.594	0.617	0.639	0.029
LP	6.750	4.171	1.428	0.550	0.636	0.658	0.116
LJ	8.500	5.737	1.689	0.706	0.710	0.735	0.050
ZDYS	8.000	4.656	1.613	0.711	0.699	0.723	-0.039
YL	5.750	3.686	1.238	0.544	0.576	0.596	0.037
XZD	6.083	3.253	1.253	0.544	0.585	0.605	0.031
DL	6.000	3.223	1.204	0.500	0.558	0.577	0.086
JC	7.417	4.879	1.549	0.622	0.679	0.703	0.051
JJ	6.250	4.267	1.417	0.639	0.656	0.679	-0.015

表5 灯盏花居群 F 统计量和 N_m

Table 5 Summary of F -statistics and gene flow of *Erigeron breviscapus* populations

位点	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
P1-2	0.015	0.179	0.167	1.251
P1-7	0.180	0.251	0.087	2.616
P1-33	0.099	0.175	0.084	2.715
P2-11	0.115	0.168	0.060	3.885
P2-16	-0.017	0.100	0.115	1.928
P2-20	0.064	0.187	0.131	1.655
P2-52	0.072	0.212	0.151	1.409
P2-53	0.175	0.274	0.121	1.817
P2-80	0.206	0.383	0.223	0.870
P2-82	0.124	0.215	0.104	2.158
P2-88	0.049	0.208	0.166	1.252
P2-95	-0.220	-0.136	0.069	3.374

表6 灯盏花居群内及居群间的 AMOVA

Table 6 AMOVA within populations and among *Erigeron breviscapus* populations

来源	自由度	方差总和	平均方差	变异组分	变异百分率/%
居群间	16	563.130	35.196	1.749	16
居群内	237	2 152.247	9.081	9.081	84
总量	253	2 715.378	-	10.830	100

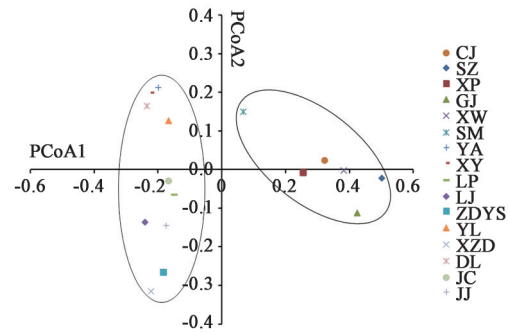


图1 灯盏花居群间成对遗传距离的 PCoA 分析

Fig. 1 PCoA results of *Erigeron breviscapus* based on populations' genetic distance

的是SZ居群和XZD居群,遗传一致度为0.490(SZ和XZD)~0.899(YA和XY),结果表明,遗传距离和遗传一致度是负相关的, YA居群与XY居群遗传相似性水平最高,而SZ居群与XZD居群遗传相似性水平最低。

3.4 聚类分析 利用STRUCTURE软件,对灯盏花16个居群进行聚类分析,采用 ΔK 统计的方法^[17],当 ΔK 在 $K=2$ 时出现最大峰值,见图2。 $K=2$ 时灯盏花的群体遗传结构,16个居群可分为2组,其中CJ, SZ, XP, GJ, XW, SM居群聚在一组;YA, XY, LP, LJ, ZDYS, YL, XZD, DL, JC, JJ居群聚在一组,见图3。

4 讨论

4.1 灯盏花居群遗传多样性水平 遗传多样性是体现一个物种进化潜力和抵抗外界环境变化的能力,遗传多样性水平越高,物种适应环境变化的能力越强,反之越弱。在物种遗传多样性研究中各种DNA标记用于描述不同物种的遗传多样性,并且主要取决于该物种的可用基因组序列信息^[18]。微卫星分子标记是研究药用植物非常理想的分子标记,尤其在药用植物群体遗传学研究中有优势^[19]。目前,已经有数种分子标记被应用到灯盏花遗传多样性的研究中,周利杰等^[12]运用RAPD技术对云南灯盏花居群进行了分析,结果表明,各项遗传多样性参数在物种水平和居群水平均表现出较高的遗传多样性。杨生超等^[14]和李惠霞等^[20]对灯盏花种质资源分别进行了ISSR和RAPD分析,结果表明,灯盏花种质资源遗传变异丰富。熊勇等^[21]采用ISSR对云南栽培灯盏花进行了遗传多样性分析,得出灯盏花遗传多样性水平较高。张薇等^[15]应用AFLP标记对灯盏花进行了遗传多样性分析得出,多态位点百分率为94.97%,遗传相似性系数0.433 0~0.949 4,表明灯盏花有较高的遗传多样性和遗传变异。通

表 7 灯盏花各居群遗传距离(左下)和遗传一致度(右上)矩阵

Table 7 Matrix of genetic distance (on the lower left) and genetic identity (on the upper right) of *Erigeron breviscapus* populations

居群	CJ	SZ	XP	GJ	XW	SM	YA	XY	LP	LJ	ZDYS	YL	XZD	DL	JC	JJ
CJ		0.834	0.705	0.762	0.848	0.771	0.701	0.651	0.631	0.631	0.613	0.622	0.579	0.603	0.680	0.655
SZ	0.182		0.788	0.794	0.858	0.773	0.609	0.580	0.551	0.510	0.522	0.576	0.490	0.570	0.564	0.551
XP	0.349	0.238		0.742	0.791	0.826	0.693	0.658	0.686	0.624	0.634	0.737	0.626	0.728	0.697	0.649
GJ	0.272	0.231	0.299		0.849	0.693	0.679	0.598	0.657	0.608	0.591	0.615	0.566	0.627	0.669	0.626
XW	0.165	0.153	0.235	0.164		0.775	0.672	0.624	0.609	0.586	0.605	0.628	0.576	0.616	0.646	0.637
SM	0.260	0.258	0.191	0.366	0.255		0.808	0.788	0.711	0.725	0.708	0.724	0.635	0.767	0.727	0.724
YA	0.355	0.496	0.367	0.387	0.398	0.213		0.899	0.782	0.777	0.779	0.795	0.733	0.873	0.799	0.772
XY	0.429	0.546	0.418	0.514	0.472	0.239	0.107		0.748	0.784	0.773	0.770	0.724	0.864	0.808	0.791
LP	0.460	0.595	0.376	0.421	0.497	0.341	0.245	0.290		0.821	0.734	0.789	0.700	0.721	0.861	0.796
LJ	0.461	0.673	0.472	0.497	0.535	0.322	0.252	0.244	0.197		0.807	0.738	0.767	0.709	0.895	0.887
ZDYS	0.489	0.650	0.456	0.525	0.503	0.345	0.250	0.258	0.309	0.215		0.681	0.875	0.707	0.790	0.823
YL	0.474	0.511	0.306	0.487	0.465	0.323	0.230	0.261	0.237	0.303	0.385		0.640	0.828	0.811	0.733
XZD	0.546	0.713	0.468	0.569	0.552	0.454	0.311	0.323	0.356	0.266	0.133	0.447		0.686	0.784	0.810
DL	0.506	0.563	0.318	0.467	0.485	0.266	0.136	0.146	0.327	0.344	0.347	0.189	0.377		0.753	0.741
JC	0.385	0.573	0.361	0.402	0.437	0.319	0.224	0.213	0.150	0.111	0.236	0.210	0.244	0.284		0.876
JJ	0.424	0.596	0.433	0.469	0.451	0.323	0.259	0.235	0.228	0.119	0.195	0.311	0.210	0.299	0.132	

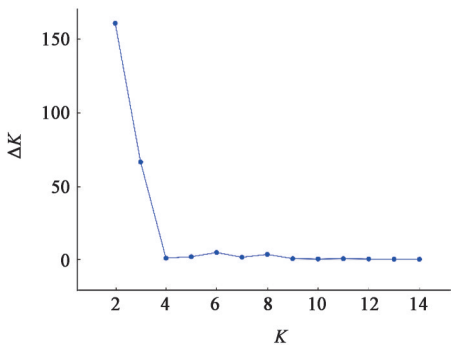


图 2 灯盏花 K 值与 ΔK 折线

Fig. 2 K value and ΔK of *Erigeron breviscapus* line chart

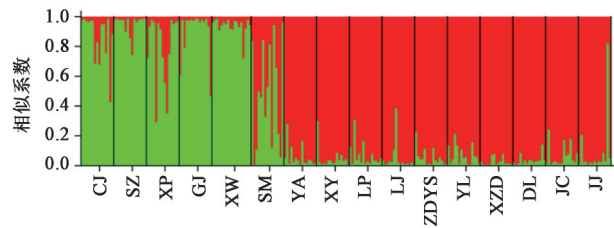


图 3 灯盏花样品群体遗传结构聚类

Fig. 3 Genetic structure of populations in *Erigeron breviscapus* samples

过前人对灯盏花的遗传多样性分析一致表明灯盏花具有较高水平的遗传多样性。

本研究基于 12 对 SSR 引物对 16 个灯盏花居群进行了遗传多样性分析,结果表明灯盏花具有较高水平的遗传多样性。 H_c 被认为是衡量一个物种遗

传多样性水平高低的标准^[22],本研究结果 H_c 在位点水平和居群水平分别为 0.257~0.835, 0.558~0.729, 平均值分别为 0.658, 0.659, 表现出较高的遗传多样性,大多数居群 H_c 水平较高。在居群水平上, N_a , N_e , I 平均值分别为 6.771, 4.095, 1.446, 此结果的遗传多样性水平高于周利杰等^[12]使用 RAPD 得出的遗传多样性($N_a=1.540$, $N_e=1.269$, $I=0.246$)水平,这种研究结果的差异可能与使用的分子标记特性有关。在对 16 个灯盏花居群遗传多样性参数分析中, LJ 居群的 N_a (8.500), N_e (5.737), I (1.689) 在所有居群中均是最高的,且 H_o (0.706), H_c (0.710) 分别仅低于 ZDYS($H_o=0.711$)和 XW($H_c=0.729$)居群,说明 LJ 居群遗传多样性最高最复杂,且距离其较近的居群相比于较远的居群遗传多样性较高,由此笔者推测 LJ 居群可能是灯盏花遗传多样性中心,随着进化过程不断向周围居群扩散。

4.2 灯盏花居群遗传结构 WRIGHT^[23]认为 $0 < F_{st} < 0.05$ 时,遗传分化小; $0.05 \leq F_{st} < 0.15$ 时,居群具有中等程度的遗传分化; $0.15 \leq F_{st} < 0.25$ 时,居群遗传分化较大; $F_{st} \geq 0.25$ 时,遗传分化很大。本研究中灯盏花 F_{st} 范围在 0.060~0.223, 平均值为 0.123, 说明灯盏花群体间的遗传变异只占 12.3%, 而 87.7% 的遗传变异来自于群体内,灯盏花居群表现为中等程度的遗传分化,这个结果与用 AMOVA 分析得出的结果

(居群内84%,居群间16%)基本一致,即灯盏花主要遗传变异来源于居群内个体间变异。但该结果小于周利杰等^[12]得出的遗传分化系数($G_{st}=0.3460$),产生此差异的原因可能与选择的居群间地理距离不同有关。 N_m 的大小可以反映群体间物质交流情况,当 $N_m>1$ 时,表明 N_m 所起的作用能有效抵制遗传漂变所起的作用,防止群体间分化的发生^[24],本实验得出 $N_m=2.077$,因此灯盏花居群遗传分化程度较小的原因可能是基因交流的结果。产生基因交流的原因可能有以下几点:①灯盏花花期一般在3~10月份,由于较长的花期加之其花色为蓝色或粉紫色,较易引来昆虫和鸟类等采蜜与取食,从而引起居群间基因交流;②由于灯盏花的种子较小且较轻加之其生境一般为开旷山坡草地,因此极易受风煤影响而传播扩散;③由于较高的药用价值,可能被人类采挖和栽培,以至于人为干扰造成不同居群间的基因交流。

4.3 灯盏花居群的遗传关系 本研究中,16个灯盏花居群遗传距离最远的是SZ居群和XZD居群(0.713),遗传距离最近的是YA居群和XY居群(0.107),在地理位置上SZ居群和XZD居群相距约863 km, YA居群和XY居群相距约138 km,分别为本实验所采样品间最远和最近距离,这个结果与杨生超等^[14]和李惠霞等^[20]得出的遗传关系与其采集地的地理分布距离有一定的相关性的结论一致。灯盏花遗传一致度为0.490~0.899,此结果支持了冯定霞等^[25]对灯盏花的核型和等位酶分析得出的遗传一致度高的观点。STRUCTURE的分析结果表明,16个灯盏花居群可分为2个组,第1组包括澄江县,师宗县,新平县,个旧市,宣威市,嵩明县6个居群;第2组包括姚安县,祥云县,兰坪县,丽江市,易司乡,云龙县,小中甸,大理市,剑川县,金江镇10个居群。从分类结果中可以看出灯盏花居群存在一个明显的地理划分,第1组的居群基本分布在云南中部到东南部,第2组居群分布在云南西北部。从表4可以看出云南西北部遗传多样性整体上高于中部到东南部,因此笔者推测云南西北部可能是灯盏花遗传多样性中心,可为以后灯盏花引种驯化、优良种质筛选等提供参考。此结果与PCoA分析结果一致。

综上所述,本研究采用SSR分子标记方法揭示了灯盏花野生居群的遗传多样性和遗传结构,结果表明,灯盏花具有较高的遗传多样性,中等程度的遗传分化和一定的基因交流。该结果支持了前人

使用RAPD,ISSR,AFLP等标记研究得出的灯盏花遗传多样性较高的结果。本研究认为灯盏花资源减少的主要原因不在于遗传变异上,可能在于其生境破坏、过度采挖、温度和气候改变等因素,不过从长远的角度考虑,这些因素必然导致遗传多样性降低,从而导致物种趋于濒危^[26]。建议对灯盏花群体进行就地保护,丽江居群的遗传多样性最高可作为优先保护单元,并采取措施禁止人为采挖以促进生境恢复。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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74卷[M]. 北京:科学出版社,1985.
- [2] 王峥,曲玮,梁敬钰. 灯盏花的研究进展[J]. 海峡药学,2012,24(6):1-8.
- [3] 朱媛,杨生超,祖艳群,等. 灯盏花栽培技术及有效成分积累研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(10):4499-4500.
- [4] 俞宏渊,陈宗莲. 灯盏细辛的家化栽培[J]. 云南植物研究,2002,24(1):115-120.
- [5] 葛淑俊,孟义江,李广敏,等. 我国药用植物遗传多样性研究进展[J]. 中草药,2006,37(10):1584-1589.
- [6] AKKAYA S M. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean[J]. Genetics, 1992, 132(4):1131-1139.
- [7] 余意,王凌,孙嘉惠,等. 基于微卫星群体遗传学的栽培枸杞遗传多样性和遗传结构评价[J]. 中国中药杂志,2020,45(4):838-845.
- [8] 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.
- [9] 邓绍勇,朱培林,温强,等. 基于EST-SSR引物的不同产区栽培栀子遗传多样性研究[J]. 中药材,2017,40(10):2275-2279.
- [10] 张笑,郑骑坚,李忠虎,等. 绞股蓝的遗传多样性和群体结构研究[J]. 中草药,2015,46(13):1958-1965.
- [11] 胡一凡,张雪梅,徐绍忠,等. 云南草果种质资源的遗传多样性及亲缘关系的SSR分析[J]. 中草药,2018,49(22):5388-5395.
- [12] 周利杰,李南高,虞泓,等. 云南灯盏花遗传变异的RAPD分析[J]. 云南植物研究,2005,27(1):59-65.
- [13] 杨生超,李永芳,赵峥,等. 灯盏花种质资源遗传关系的RAPD分析[J]. 中国中药杂志,2008,33(13):1532-1535.
- [14] 杨生超,文国松,刘雪玲,等. 灯盏花种质资源遗传关系的ISSR分析[J]. 中草药,2010,41(9):1523-1527.

- [15] 张薇,王建军,魏翔,等. AFLP标记对灯盏花遗传多样性及选育品系群体一致性的分析[J]. 中国中药杂志,2013,38(14):2245-2249.
- [16] 刘松卫,卢迎春,宋婉玲,等. 基于灯盏花全基因组SSR位点分析及多态性引物开发[J]. 分子植物育种,2018,16(12):4003-4009.
- [17] 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.
- [18] NAIK A, MISHRA S K, NAG A, et al. Cross-genera amplification of *Cajanus*. specific SSR markers in *Clitoria ternatea* (L.) and their application in genetic diversity studies [J]. Physiol Mol Biol Plants, 2020, 26:2371-2390.
- [19] 张文婧,张永清,袁庆军,等. 微卫星在道地药材群体遗传学研究中的应用与展望[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4232-4237.
- [20] 李惠霞,高兴艳,王锦琳,等. 云南栽培灯盏花遗传多样性 RAPD 分析[J]. 云南民族大学学报:自然科学版,2013,22(2):99-103.
- [21] 熊勇,杜荣花,马金林. 栽培灯盏花 DNA 指纹图谱研究及遗传多样性分析[J]. 生物技术,2012,22(5):45-48.
- [22] 崔晓龙,魏蓉城,黄瑞复. 草果遗传体系的初步研究 [J]. 云南大学学报:自然科学版,1995,17(3):290-297.
- [23] WRIGHT S. Evolution in mendelian populations [J]. Genetics, 1931,16(2):97-159.
- [24] WRIGHT S. The genetical structure of populations [J]. Ann Eugen, 1949,15(4):323-354.
- [25] 冯定霞,陈勃,党承林,等. 短葶飞蓬云南三个种群的核型与等位酶分析[J]. 云南植物研究,2002,24(6):754-758,768.
- [26] 上官琰,赵渤,谢晖,等. 广西地不容 SSR 标记开发及遗传多样性研究[J]. 中草药,2018,49(24):5910-5915.

[责任编辑 顾雪竹]