

西伯利亚蓼 EST-SSR 引物开发和国内资源的遗传背景分析

王晓云, 徐旭, 程波翔, 慕泽泾, 杜小浪*, 钟国跃
(江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004)

[摘要] 目的:评价国内西伯利亚蓼资源的遗传分化程度,为种群分化、物种进化、资源保护和药材品质保障提供科学依据。方法:从国内4个省份13个采样点采集56份西伯利亚蓼,开发并筛选多态性EST-SSR标记,结合相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记扩增结果,通过计算遗传距离和聚类分析,评价不同生态分布区域内西伯利亚蓼的遗传分化程度。结果:开发的45对EST-SSR引物中,38对引物有扩增产物,共扩增出660个条带,其中17对引物产生的多态性条带比率为100%,共扩增出多态性条带303条。96对SRAP通用引物中,67对引物有扩增产物,共扩增出1347个条带,其中58对引物产生的多态性条带比率为100%,共扩增出多态性条带1147条。种群遗传距离计算和聚类分析结果表明,西伯利亚蓼种群内和种群间均有遗传分化,分布区域相隔越远,遗传分化程度越高。结论:地理位置隔离、海拔高度均影响了国内西伯利亚蓼种质资源的分布和分化,人类活动可能也对其有影响。

[关键词] 相关序列扩增多态性标记; EST-SSR 标记; 遗传; 分化

[中图分类号] R282.7; R29; R22-03; R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0043-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050043

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171213.0851.014.html>

[网络出版时间] 2017-12-13 10:47

Development of EST-SSR Markers and Genetic Background Analysis for *Polygonum sibiricum* in China

WANG Xiao-yun, XU Xu, CHENG Bo-xiang, MU Ze-jing, DU Xiao-lang*, ZHONG Guo-yue
(Research Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) Resources and Ethnic Minority Medicine,
Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the genetic differentiation of *Polygonum sibiricum* in different areas in China, in order to provide basis for its population subdivision, evolution, protection and utilization, and quality control. **Method:** Fifty-six samples were collected from 13 sampling sites in four provinces of China. EST-SSR primers were developed and screened, and the genetic differentiation was evaluated with both EST-SSR and sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers. **Result:** Among 45 pairs of EST-SSR primers, 38 pairs amplified 660 distinguished bands, and 17 pairs amplified 303 polymorphic bands, with a polymorphism rate of 100%. Among 96 pairs of SRAP primers, 67 pairs amplified 1347 distinguished bands, and 58 pairs amplified 1147 polymorphic bands, with a polymorphism rate of 100%. Genetic distance and cluster analysis revealed both inter- and inner-population have genetic differentiation. **Conclusion:** Genetic variation and geographic differentiation are observed among *P. sibiricum* populations in China, which were affected by geographic distances, altitudes and possibly mankind activities.

[收稿日期] 20170801(011)

[基金项目] 江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心2014年度协同创新项目(JXXT201401007)

[第一作者] 王晓云, 博士, 副教授, 从事药用植物分子遗传与育种研究工作, Tel: 0791-87118873, E-mail: wxy20052002@aliyun.com

[通信作者] * 杜小浪, 硕士, 助理研究员, 从事药用植物资源学研究工作, Tel: 0791-87118873, E-mail: 754324793@qq.com

[**Key words**] sequencerelated amplified polymorphism (SRAP) marker; EST-SSR marker; genetics; differentiation

“黄水病”、“恶性腹水”是藏族地区多发疾病,也是藏族医学临床具有治疗优势的病种之一。曲玛孜类药材是治疗这类疾病的常用药材,在《蓝琉璃》,《晶珠本草》,《新修晶珠本草》,《中国藏药》,《藏药志》和《中华藏本草》等藏族医药文献中均有记载。在《部颁标准·藏药分册》和《藏药标准》中,收载有九味藏紫菀花散、流感丸、青鹏膏剂、大月晶丸等藏族药,曲玛孜是这些藏族药的处方组成药物。

西伯利亚蓼是曲玛孜的法定基原之一^[1-2],为蓼科多年生草本。它的近缘种较多,种下还有变种细叶西伯利亚蓼,生境和形态特征与西伯利亚蓼极其相似^[3-4]。西伯利亚蓼属于野生广布种,未经人工栽培,各生态区域内的种质资源具有一定的遗传分化,这也导致不同产地的西伯利亚蓼用作曲玛孜的基原时,药材品质参差不齐。

随着中药和民族药产业的发展,人们日益重视药用植物资源保护、开发和利用。然而,国内外对西

伯利亚蓼的研究还很少,已有研究集中在系统分类^[5]、药理作用^[6-7]、化学成分^[8-9]和耐盐碱机制^[10-11]方面,未见资源分布和遗传背景研究的报道。本文旨在开发西伯利亚蓼的 EST-SSR 分子标记,并利用 EST-SSR 和相关序列扩增多态性 (SRAP) 分子标记,分析国内 4 个省份西伯利亚蓼的遗传背景,评价遗传分化程度,从而为种群分化和物种进化、生态适应机制研究、优良种质资源筛选和保护、分子育种以及衡量遗传分化对药材质量的影响提供依据。

1 材料

从国内 4 个省份 13 个采样点采集 56 份植物材料,经江西中医药大学钟国跃研究员鉴定为蓼科植物西伯利亚蓼 *Polygonum sibiricum*。基于谷歌地图数据,绘制采样地点所属行政区域的分布,见图 1。将采集的植物材料用硅胶迅速干燥保存,按照采集时间先后编号,记载采样地经纬度和海拔高度,见表 1。



绿色. 青海省的样本; 粉色. 甘肃省的样本; 蓝色. 四川省的样本(四川省阿坝县若柯牧场附近的两个样本采集地相聚较近, 合并为 1 个圆点表示); 内蒙古自治区的样本采集地远离以上省份, 未标出)

图 1 西伯利亚蓼样本采集地点分布

Fig.1 Sampling point location of *Polygonum sibiricum*

植物基因组 DNA 提取试剂盒 (批号 DP305) 和 PCR 扩增所用 $2 \times Taq$ PCR Mastermix (批号 KT201) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取 用液氮充分研磨植物材料, 精密称定 50 mg, 用试剂盒提取基因组 DNA。

2.2 EST-SSR 分子标记引物的开发 从 NCBI 数据库中下载西伯利亚蓼的 367 条 EST 序列, 按照文献 [12] 方法设计 EST-SSR 引物。微卫星核心序列分别设置为 2, 3, 4, 5, 6 个核苷酸, 最小重复数为 3, 4, 5, 6, 9 次。

2.3 EST-SSR 分子标记反应体系和程序 PCR 反应体系为 10 μ L, 含质量浓度 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DNA 2 μ L, $2 \times \text{PCR Master Mix}$ 5 μ L, 浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上下

表 1 西伯利亚蓼样品信息

Table 1 Sample information of *Polygonum sibiricum*

采集地	样品编号	采集地海拔 /m	采集地定位 (纬度/经度)
青海省鄂陵湖	1~6	4 278	34°59' 37.60"N/97°36' 13.56"E
青海省达日县当洛乡	7~9	4 238	34°03' 54.20"N/99°23' 41.60"E
青海省黄南州泽库县	10~13	3 660	35°06' 22.02"N/101°40' 49.90"E
青海省泽库县麦秀镇	14~16	4 252	33°11' 11.90"N/97°23' 69.40"E
青海省玉树歇武镇扣远武歇	17	4 291	35°03' 52.20"N/102°51' 19.40"E
甘肃省合作市扎油	18~22	3 550	34°59' 20.526"N/101°46' 39.75"E
甘肃省玛曲县洛奇段	23~26	3 473	33°42' 14.00"N/103°14' 41.52"E
四川省若尔盖县阿西茸乡卓让村	27~28	2 963	33°40' 54.58"N/103°13' 15.95"E
四川省阿坝县若柯牧场路边	29~32	3 278	32°54' 08.50"N/101°42' 21.36"E
四川省阿坝县若柯牧场大沟边	33~37	3 414	32°59' 28.20"N/101°36' 16.31"E
甘肃省碌曲县尕海湖边	38~41	3 472	34°13' 16.82"N/102°20' 12.61"E
青海省久治县日麻乡	42~46	3 995	33°23' 18.70"N/100°57' 41.90"E
内蒙古自治区化德县	47~56	1 474	41°54' 10.96"N/114°0' 37.00"E

游引物各 0.2 μL, ddH₂O 2.6 μL。引物共 45 对, 序列见表 2。EST-SSR 分子标记的扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 45 s, 退火(温度见表 2) 1 min, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。

2.4 SRAP 分子标记反应体系和程序 用 SRAP 分子标记通用引物进行扩增^[13], 引物共 96 对。PCR 反应体系与 EST-SSR 分子标记相同。扩增程序为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 37 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 5 个循环; 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

2.5 扩增产物检测 采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2.6 进化时间计算及进化树绘制 将清晰可辨的电泳条带用于统计分析, 按扩增条带有无记数, 有条带即为 1, 无条带记为 0, 将图形资料转换成数据。参照李亚玲等^[14]的方法, 利用 DPS14.5 软件中的 UPGMA 法进行 0, 1 数据系统聚类并获得遗传距离矩阵, 然后输入 MEGA5 软件绘制进化树。

3 结果与分析

3.1 EST-SSR 引物的开发 根据 NCBI 数据库中的西伯利亚蓼 EST 序列, 共开发了 45 对 EST-SSR 引物, 针对不同的 SSR 类型进行扩增, 退火温度均为 65 °C 以上, 见表 2。

3.2 引物筛选和评价

3.2.1 EST-SSR 分子标记引物 45 对 EST-SSR 引

物中, 有 38 对引物有扩增产物, 见表 3。共扩增出 660 个条带, 其余 7 对没有扩增产物。平均每对引物扩增的多态性条带数为 17.4, 多态性比率为 95.0%。其中 17 对引物产生的多态性条带比率为 100%, 共扩增出多态性条带 303 条; 其余 21 对引物扩增出条带 357 条, 多态性条带 322 条, 多态性比率平均为 90.2%。

3.2.2 SRAP 分子标记引物 96 对 SRAP 引物中, 有 67 对引物有扩增产物, 见表 4。共扩增出 1 347 个条带, 其余 29 对没有扩增产物。平均每对引物扩增的多态性条带数为 20.1, 多态性比率为 99.3%。其中 58 对引物产生的多态性条带比率 100%, 共扩增出多态性条带 1 147 条; 其余 9 对引物扩增出条带 200 条, 多态性条带 190 条, 多态性比率平均为 95%。

3.3 遗传距离和聚类分析 利用 EST-SSR 和 SRAP 分子标记数据, 基于 UPGMA 算法, 计算西伯利亚蓼种群的遗传距离并进行聚类分析。结果表明, 遗传距离范围为 0.275 3~0.790 4, 平均遗传距离为 0.573 9。

内蒙古自治区的样本单独聚成 1 支, 其余样本均未能按照省份分别聚类在一起, 见图 2。四川省的样本按照采集地的划分, 分别聚成了分支。青海省的样本中, 除了玉树歇武的 17 号以外, 其他样本按照采集地分别聚成 5 个分支; 这 5 个分支中, 除了久治县日麻乡这 1 支, 其他 4 个分支聚在了一起。甘肃省的样本聚类情况最复杂, 未能按照采集地分

表 2 西伯利亚蓼 EST-SSR 分子标记序列信息

Table 2 EST-SSR molecular marker information of *Polygonum sibiricum*

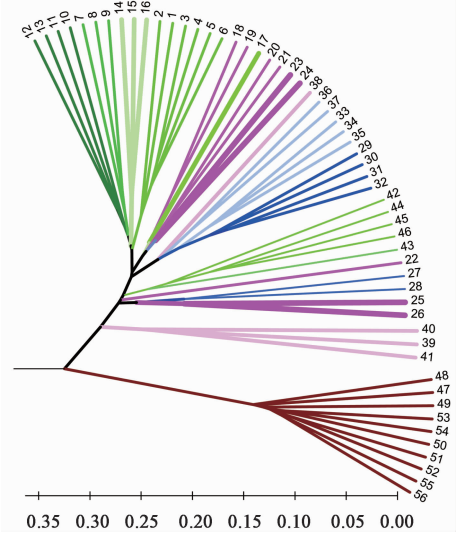
编号	名称	SSR 类型	引物组合		退火温度 / $^{\circ}\text{C}$
			正向引物	反向引物	
1	Sin1047	(TTG)6	CTTGTGGCAAATCAAACACG	CGCCATTAATGAGATGTCCA	65.8
2	Sin1087	(ATTT)5	CTTTGGGTGAAAAGGGCAAG	CGGGTTCCTACTACCATCGTTT	67.1
3	Sin1102	(TGT)8	CAGTACCTTAAGCCGACCCA	AGTGAAGAGGAGGAGGAGG	69.0
4	Sin113	(CCT)6	CATCTCCAATCCCATGAAGG	AGGGTCAATGAGATCCAACG	66.5
5	Sin1142-1	(AG)15	GAAGAGGGTGTGCAATGGAT	CGTGTTCCTCTCTCTGTGCC	69.0
6	Sin1142-2	(AG)15	GAAGAGGGTGTGCAATGGAT	CGTGTTCCTCTCTCTGTGCC	69.0
7	Sin1221	(CTCATC)3	CGGCCGAGGTACAACATAAA	ACCTCGGTGAAGATGCAGAT	68.1
8	Sin1296	(ATC)6	TGTGTCCCGTTCAAACAAA	GCTTTTGAGTAAACCCCAA	65.5
9	Contig164	(AGA)8	GACAAGAGAGCGGCAACAA	TCATCTCTTGCCACACAAGC	67.7
10	Sin1717	(ACATC)4	ATCAATTGCCCAAATCAGA	AACGTGAAAGACGGGATTG	65.8
11	Sin1766	(AT)13	ATAGTGGACCCATTCCAC	AAGCCTCTTACGGGAAAAA	67.4
12	Sin1788	(TA)11	CGACCACATGCAAGAAAACA	GAGGTGGAGGAGGTGCTTCT	69.9
13	Sin1923	(CTT)10	GCTCTCCTCTTCCCTCGAAC	TTCCCTCGTTGAATCTTTGG	68.7
14	Sin1981	(TA)10	GGAAGGATGCCCTCTTCTTC	AACACCCCAAGTTCAGCAC	68.1
15	Sin204	(GCTG)5	CTTCTCCTTCTTCTCGGCT	GATGGGAGCCACTAGCACAT	68.8
16	Sin212	(GA)9	AGGTACGGGGAAACCAT	GTGGTAGATTGGCAGTTGGG	67.7
17	Sin2164	(TA)10	GAATAGGGAGCACCCATCAA	CCTTCAACTTCTCGCACTCC	67.7
18	Sin22	(CCT)6	GGCCGAGGTAATCAATCACT	CGCAGAGGAAGGAATTCAAC	68.4
19	Contig225	(AT)19	TAGGCAGGTACGTTGCCAGT	TCCATCTGAGGCAGCTAACCC	70.5
20	Sin2201	(CT)9	CGCTCTTGACAAAACAGAGA	TCGCGAGAAAAACAGTGAGA	67.9
21	Sin2289	(AGA)6	ATCAATCTCTGTTCACGCCC	GGTCAAACCTCCATGCCTGTT	67.1
22	Sin2495	(AT)10	GTTATTATGATGAGTGTGCAACATT	CAAGCTCAACCAAAATCGACA	67.1
23	Sin2632	(TTC)6	GATGCCTAACTTGCAATTACATGA	CAGTTGCTATGGGATGGGTT	67.3
24	Sin2754-1	(CTGGAG)4	GTGGCCTATCAATCCAGAA	ATCTTCTCTCGCCCTTCTC	67.8
25	Sin2754-2	(CTGGAG)3	GCTTCAGTTACGGGGATTGA	CAGCCTTCTTACAGCTCCAAT	67.1
26	Sin2940	(CTTTGG)3	TTGCTTGTGCCCATTATCA	AAGTATATCCACCCCTCG	67.3
27	Contig306	(AT)12	AAGTCTCACAGTTACACCTCAA	TCAAAGTGAGGCGCTAATGA	70.2
28	Sin3113	(GAA)6	ACACACGTTGTTACCTCC	GATTGACAATGGCGGTTTTT	68.4
29	Sin3166	(CTT)7	CGGGGACACACCAACCTAT	GGCTTGAATCTTCCGTACCA	67.9
30	Contig335	(AGA)6	CCGTTGATACCTCTGCACT	AGAGACTGGAGCAACCCAGA	69.5
31	Sin3402	(GTCGGA)3	GCCGAGGTACAACCAGTCAT	TGACAACTCTGCGGAAGATG	69.0
32	Sin3439	(AGAAGG)3	TGTTGCGGTATGCTAACGAC	ACCATGGCAACAACCTCCATT	67.8
33	Sin3571	(AT)11	CGGGCAGGTAAGGATGA	CAAAATTCAAAACCCAGTTTCG	67.8
34	Sin584	(AAAAG)4	TAACGCCCGCATAATTTAA	GGCAGGAGGCTTTATCAGAG	67.5
35	Sin587	(AAT)6	TAGTCCAAAACCCAGATCG	ATTCAAACAGTGGAGGGGTG	67.0
36	Contig61	(GA)23/(GA)26	AGCAACAGCATGGTAAAGGG	TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	73.8
37	Sin62	(TTC)16	CGGGCAGGTACCTAAACAAC	GATCGTGATGCTGAAGCAGA	67.7
38	Sin660	(GTAG)5	GCGGATCGAACTTAGTGAC	GCTCATCCAAAACCAAGCAT	67.8
39	Sin663	(AT)9	CAACAAAACCTGGCCAAAAC	GAGGCGGTTCTTAATCTCA	67.2
40	Sin664	(ATTGGA)3	TCCGGATTCAATTCATTCA	AAGGTGCTGGTATGGTTGGA	68.3
41	Sin691-1	(GGTTGT)3	TCAAGACGGGTGAGGTTAGC	CAGCTTCAGCACATGCAAC	68.8
42	Sin691-2	(TGC)6	TGTTGTGGTTCTTGTCTGTT	CTGGGATATGGTGTGTTT	68.0
43	Sin709	(TA)9	GAATAGGGAGCACCCATCAA	CCTTCAACTTCTCGCACTCC	67.7
44	Sin739	(ATAAAA)3	CGAAGACCCACAAGGGTAAA	AGAGGTTGATGGCCTACACG	68.7
45	Sin839	(GA)13	TCATGCCACGTGTCTACTC	GCTGCTCTGCTCTCTGCTCT	71.2

表 3 西伯利亚蓼 EST-SSR 分子标记序列扩增信息

Table 3 Amplification results of EST-SSR markers of *Polygonum sibiricum*

编号	名称	扩增/条	多态性/条	多态性比率/%
1	Sin1047	25	21	84.00
2	Sin1087	22	21	95.45
3	Sin1102	21	20	95.24
4	Sin113	18	17	94.44
5	Sin1142-1	28	28	100.00
6	Sin1142-2	32	31	96.88
7	Sin1221	0	0	0.00
8	Sin1296	14	11	78.57
9	Contig164	14	14	100.00
10	Sin1717	15	12	80.00
11	Sin1766	15	15	100.00
12	Sin1788	0	0	0.00
13	Sin1923	0	0	0.00
14	Sin1981	21	21	100.00
15	Sin204	18	17	94.44
16	Sin212	20	20	100.00
17	Sin2164	0	0	0.00
18	Sin22	25	24	96.00
19	Contig225	16	16	100.00
20	Sin2201	10	9	90.00
21	Sin2289	15	13	86.67
22	Sin2495	13	13	100.00
23	Sin2632	14	14	100.00
24	Sin2754-1	14	13	92.86
25	Sin2754-2	14	11	78.57
26	Sin2940	9	9	100.00
27	Contig306	8	7	87.50
28	Sin3113	17	15	88.24
29	Sin3166	11	10	90.90
30	Contig335	14	12	85.71
31	Sin3402	21	20	95.24
32	Sin3439	21	21	100.00
33	Sin3571	9	8	88.89
34	Sin584	15	15	100.00
35	Sin587	17	15	88.24
36	Contig61	0	0	0.00
37	Sin62	24	24	100.00
38	Sin660	20	20	100.00
39	Sin663	27	27	100.00
40	Sin664	0	0	0.00
41	Sin691-1	19	19	100.00
42	Sin691-2	17	15	88.24
43	Sin709	18	18	100.00
44	Sin739	9	9	100.00
45	Sin839	0	0	0.00

别聚成各自的分支。其中,合作市扎油的 22 号样本单独成为 1 支,其余 4 个样本与青海省玛曲县洛奇段的 2 个样本、青海省玉树歇武的 17 号样本聚成了 1 支。甘肃省碌曲县尕海湖边采集的 3 个样本聚成了 1 个单独的分支,但 38 号样本与四川省阿坝县若柯回牧场大沟边的样本聚在了一起。



1~56. 样本;绿色. 青海省的样本;粉色. 甘肃省的样本;红褐色. 内蒙古自治区的样本;蓝色. 四川省的样本(同一省份中,不同采集地的样本用不同深浅颜色或粗细的分支表示)

图 2 根据 SRAP 和 EST-SSR 分子标记序列构建西伯利亚蓼系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on EST-SSR and SRAP molecular markers of *Polygonum sibiricum*

4 讨论

SRAP 和 EST-SSR 2 种分子标记扩增的靶序列不同,结合使用时,揭示的多态性位点数更多,可达到互补的效果,覆盖的基因组信息也更全面。本研究采用这两种分子标记进行西伯利亚蓼的遗传背景分析,比单一使用一种分子标记获得的结果更加全面可靠。

内蒙古自治区的样本来源于同一个采样地,聚成 1 个保守的、独立的分支,且远离其他省份的样本。这一采样地处于低海拔地区,与其他省份处于高海拔地区的采样地相距遥远,聚类结果体现了地域阻隔造成的种质资源保守性。

青海省鄂陵湖、达日县当洛乡、黄南州泽库县和泽库县麦秀镇均为高海拔地区,海拔高度相似但地理位置相隔一定的距离。来源于这 4 个地区的种群按照采样地分别聚成 1 个小枝,然后再聚类在一起,形成 1 个独立的大枝。表明在长期的进化过程中,地理位置隔离和海拔的不同造成了西伯利亚蓼向着

表 4 西伯利亚蓼 SRAP 分子标记序列扩增信息

Table 4 Amplification results of SRAP markers information of *Polygonum sibiricum*

编号	引物组合	扩增条带数	多态性条带数	多态性比率/%	编号	引物组合	扩增条带数	多态性条带数	多态性比率/%
1	em1me1	29	28	96.56	49	em3me9	0	0	0.00
2	em1me2	27	27	100.00	50	em3me10	20	20	100.00
3	em1me3	25	25	100.00	51	em3me11	0	0	0.00
4	em1me4	25	25	100.00	52	em3me12	18	18	100.00
5	em1me5	24	24	100.00	53	em3me13	0	0	0.00
6	em1me6	0	0	0.00	54	em3me14	0	0	0.00
7	em1me7	0	0	0.00	55	em3me15	15	15	100.00
8	em1me8	31	31	100.00	56	em3me16	15	15	100.00
9	em1me9	22	22	100.00	57	em3me17	0	0	0.00
10	em1me10	21	21	100.00	58	em3me18	15	15	100.00
11	em1me11	27	27	100.00	59	em3me19	0	0	0.00
12	em1me12	34	34	100.00	60	em3me20	0	0	0.00
13	em1me13	22	21	95.45	61	em4me1	13	13	100.00
14	em1me14	31	31	100.00	62	em4me2	14	13	92.86
15	em1me15	26	26	100.00	63	em4me3	22	22	100.00
16	em1me16	34	34	100.00	64	em4me4	21	21	100.00
17	em1me17	20	20	100.00	65	em4me5	21	20	95.24
18	em1me18	23	23	100.00	66	em4me6	16	16	100.00
19	em1me19	18	17	94.44	67	em4me7	15	15	100.00
20	em1me20	18	18	100.00	68	em4me8	14	14	100.00
21	em2me1	0	0	0.00	69	em4me9	14	14	100.00
22	em2me2	22	21	95.45	70	em4me10	16	16	100.00
23	em2me3	26	26	100.00	71	em4me11	15	15	100.00
24	em2me4	0	0	0.00	72	em4me12	14	14	100.00
25	em2me5	18	18	100.00	73	em4me13	15	15	100.00
26	em2me6	18	18	100.00	74	em4me14	0	0	0.00
27	em2me7	18	18	100.00	75	em4me15	0	0	0.00
28	em2me8	22	22	100.00	76	em4me16	15	15	100.00
29	em2me9	12	12	100.00	77	em4me17	14	14	100.00
30	em2me10	23	23	100.00	78	em4me18	9	9	100.00
31	em2me11	17	17	100.00	79	em4me19	18	18	100.00
32	em2me12	0	0	0.00	80	em4me20	14	14	100.00
33	em2me13	0	0	0.00	81	em5me5	21	21	100.00
34	em2me14	18	18	100.00	82	em6me6	23	23	100.00
35	em2me15	0	0	0.00	83	em7me7	19	19	100.00
36	em2me16	18	18	100.00	84	em8me8	21	21	100.00
37	em2me17	17	17	100.00	85	em9me9	22	22	100.00
38	em2me18	18	16	88.89	86	em10me10	29	29	100.00
39	em2me19	0	0	0.00	87	em11me11	26	26	100.00
40	em2me20	19	18	94.74	88	em12me12	25	25	100.00
41	em3me1	19	19	100.00	89	em13me13	19	19	100.00
42	em3me2	0	0	0.00	90	em14me14	0	0	0.00
43	em3me3	37	36	97.30	91	em15me15	0	0	0.00
44	em3me4	23	23	100.00	92	em16me16	0	0	0.00
45	em3me5	0	0	0.00	93	em17me17	0	0	0.00
46	em3me6	0	0	0.00	94	em18me18	0	0	0.00
47	em3me7	0	0	0.00	95	em19me19	0	0	0.00
48	em3me8	0	0	0.00	96	em20me20	0	0	0.00

不同的方向分化;在相似海拔高度的区域内,西伯利亚蓼更容易发生种质资源的扩散和遗传物质交流。

青海省久治县日麻乡的5个样本聚成了1个单独的分支,甘肃省碌曲县尕海湖边的3个样本聚成了1个单独的分支,四川省阿坝县若柯牧场2个地点的种群分别聚成了单独的分支。表明以上4个采样地点的西伯利亚蓼种群分化具有独立性。

青海、甘肃和四川是地理位置相连的3个省份。甘肃合作市扎油、玛曲县洛奇段和四川若尔盖县阿西茸乡卓让村地理位置相对较近,并且均处于国道线附近,较易受到人类活动的影响,因此,这3个采集地点的种群聚类时多次出现交叉分布现象,洛奇段的2个样本和卓让村的2个样本聚类在一起。甘肃省碌曲县尕海湖边的38号样本与若柯牧场大沟边的种群聚类在一起,青海省玉树歇武镇扣远武歇的17号样本与甘肃省合作市扎油乡的样本聚类在一起,甘肃省合作市扎油的22号样本与甘肃省玛曲县洛奇段和四川省若尔盖县阿西茸乡卓让村的样本聚类在一起,推测产生以上聚类结果的原因可能在于人类活动带来了偶然的种质资源扩散,导致部分样本聚类时有跨省份交叉现象。

综上所述,青海、甘肃、四川和内蒙古自治区的西伯利亚蓼种群内和种群间均有遗传分化。分布区域相隔越远,遗传分化程度越高。地理位置隔离、海拔高度均影响了种质资源的分布和分化,人类活动可能也会产生影响。

[参考文献]

[1] 王洪玲,梁文娟,朱继孝,等.藏族药西伯利亚蓼化学成分分离鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(7):60-63.
[2] 罗武政,李啟恩,陈静,等.藏药曲玛孜的文献查考[J].中国中药杂志,2015,40(10):2047-2049.
[3] 李安仁.中国植物志.第25(1)卷[M].北京:科学出版社,1998:89.

[4] 江礼义,王小冬,于阳.细叶西伯利亚蓼群落结构与演替特征研究[J].西藏科技,2013(12):74-76.
[5] 王靖茹.中国蓼科植物花被片及果实结构的分类学价值[D].哈尔滨:哈尔滨师范大学,2015.
[6] 朱继孝,王晓云,王洪玲,等.西伯利亚蓼提取物降尿酸作用机制研究[J].中国药理学通报,2015,31(B11):146.
[7] 王晓云,王洪玲,张亚梅,等.西伯利亚蓼醇提物对高尿酸血症小鼠尿酸生成和排泄的影响研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(5):626-631.
[8] 王洪玲,梁文娟,朱继孝,等.藏族药西伯利亚蓼化学成分分离鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(7):60-63.
[9] 王洪玲,朱继孝,任刚,等.藏药曲玛孜挥发油化学成分 GC-MS 分析[J].安徽农业科学,2016,44(21):88-90.
[10] 赵淑婷,曲春浦,许志茹,等.西伯利亚蓼谷氨酰胺合成酶基因的克隆及碱性盐胁迫下的表达[J].植物研究,2014,34(2):252-257.
[11] QU C P, XU Z R, LIU G J, et al. Differential expression of copper-zinc superoxide dismutase gene of *Polygonum sibiricum* leaves, stems and underground stems, subjected to high-salt stress[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(12):5234-5245.
[12] Bosamia T C, Mishra G P, Thankappan R, et al. Novel and stress relevant EST derived SSR markers developed and validated in peanut [J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0133537.
[13] 张丽,姜树坤,张喜娟,等.粳稻 SRAP 分子标记遗传群的构建与分析[J].植物生理学通讯,2007,43(3):443-447.
[14] 李亚玲,韩国民,何沙娥,等.基于 DNA 分子标记数据构建系统进化树的新策略[J].生物信息学,2008,6(4):168-170.

[责任编辑 顾雪竹]