

# 基于 *psbA-trnH* 分析的何首乌野生居群遗传多样性

白明明, 孙小芹, 郭建林, 李密密, 杭悦宇<sup>①</sup>

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物迁地保护重点实验室, 江苏 南京 210014]

**摘要:** 对产自不同省区的何首乌 [*Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.] 17 个野生居群 85 个单株的 *psbA-trnH* 序列进行了扩增和分析, 在此基础上分析了居群间的遗传多样性, 并采用 NJ 法对 85 个单株进行了聚类分析。结果表明: 供试 85 个单株的 *psbA-trnH* 序列长度为 384 bp; 其中, 变异位点为 167 bp, 简约信息位点为 53 bp, 分别占序列总长度的 43.5% 和 13.8%。变异类型主要为碱基缺失和替换; 变异位点主要集中在 235~281 bp 区域, 根据位点变异情况可将 17 个居群大体分为 3 类。各居群间的遗传距离为 0.000~0.172, 其中, 贵州居群与其他 16 个居群间的遗传距离为 0.167~0.172, 而其他 16 个居群间的遗传距离为 0.000~0.017。17 个居群间的核苷酸多样性指数 ( $P_i$ )、遗传分化系数 ( $N_{st}$ ) 和基因流 ( $N_m$ ) 分别为 0.028 56, 0.918 68 和 0.04; 除贵州居群外其他 16 个居群的  $P_i$ 、 $N_{st}$  和  $N_m$  分别为 0.015 68, 0.837 19 和 0.10; 贵州居群与其周边省区 (四川、云南、广西、湖南和湖北) 居群的  $P_i$ 、 $N_{st}$  和  $N_m$  分别为 0.047 99, 0.937 62 和 0.03。在 NJ 系统树上, 17 个居群可聚为 4 支, 且大部分居群的供试单株聚在同一分支中; 仅贵州居群单独聚为一支, 与序列分析的划分结果基本一致。由研究结果可见: 野生何首乌居群总遗传变异的 91.868% 来自居群间, 8.132% 来自居群内, 居群间的基因交流较少; 除贵州居群外其余 16 个居群的整体遗传多样性水平偏低, 说明何首乌居群整体多样性水平在很大程度上受贵州居群的影响。

**关键词:** 何首乌; 居群; *psbA-trnH* 序列; 遗传多样性; NJ 系统树

中图分类号: Q946-33; S567.23\*9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)02-0036-09

**Genetic diversity of wild populations of *Fallopia multiflora* based on *psbA-trnH* analysis** BAI Ming-ming, SUN Xiao-qin, GUO Jian-lin, LI Mi-mi, HANG Yue-yu<sup>①</sup> (Jiangsu Province Key Laboratory for Plant *Ex-situ* Conservation, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(2): 36-44

**Abstract:** Sequence of *psbA-trnH* of 85 individuals in 17 wild populations of *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald. from different provinces and regions in China was amplified and analyzed, and on the basis, genetic diversity among populations was analyzed and cluster analysis of 85 individuals was also carried out by NJ method. The results show that the length of *psbA-trnH* sequence of 85 individuals is 384 bp, in which, there are 167 bp variable sites and 53 bp parsimony informative sites, accounting for 43.5% and 13.8% of the total length of sequence, respectively. Variable types are mainly base deletion and substitution. Variable sites mainly concentrate in the region of 235-281 bp. 17 populations are almostly divided into three types according to site variation status. The genetic distances among 17 populations are 0.000-0.172, in which, genetic distances between Guizhou population and other 16 populations are 0.167-0.172, and those among other 16 populations are 0.000-0.017. Nucleotide diversity index ( $P_i$ ), coefficient of gene differentiation ( $N_{st}$ ) and gene flow ( $N_m$ ) among 17 populations are 0.028 56, 0.918 68 and 0.04, respectively.  $P_i$ ,  $N_{st}$  and  $N_m$  among other 16 populations except Guizhou population are 0.015 68, 0.837 19 and 0.10, respectively. And  $P_i$ ,  $N_{st}$  and  $N_m$  between Guizhou population and its neighboring populations (Sichuan, Yunnan, Guangxi, Hu'nan and Hubei) are 0.047 99, 0.937 62 and 0.03, respectively. On NJ phylogenetic tree, 17 populations are clustered into four branches and individuals tested in most populations are clustered in a same branch and only Guizhou

收稿日期: 2011-12-27

基金项目: 国家农业部 DUS 测试品种信息 DNA 测试技术研究项目 (200903008-02-05)

作者简介: 白明明 (1987—), 女, 山东郯城人, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源的研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: hangyueyu@21cn.com

population is clustered alone in a branch, which is basically same with the deviation result by sequence analysis. It is suggested that 91.868% of overall genetic variation of 17 wild populations exists among populations and 8.132% within populations, and gene exchange among populations is less. Except Guizhou population, overall genetic diversity level among other 16 populations is low, indicating that the overall diversity level of *F. multiflora* populations is affected by Guizhou population at a large extent.

**Key words:** *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.; population; *psbA-trnH* sequence; genetic diversity; NJ phylogenetic tree

何首乌 [*Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.] 为蓼科 (Polygonaceae) 何首乌属 (*Fallopia* Adans.) 多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 其块根和藤茎均为传统中药材, 具有解毒、消痈、截疟、润肠通便的功效<sup>[2]</sup>。何首乌野生资源丰富, 主要分布在安徽、福建、广东、甘肃、广西、贵州、湖北、河南、湖南、江苏、江西、四川、山东、上海、陕西、云南和浙江。

目前, 有关何首乌遗传多样性的研究非常少。王凌晖等<sup>[3]</sup>采用 RAPD 技术对广西产 10 个野生何首乌居群进行了遗传多样性分析, 用 40 对随机引物共扩增出 175 个多态性片段, 多态性百分率达 59.3%; 严寒静等<sup>[4]</sup>采用 PCR 直接测序法测定何首乌 10 个种源核糖体 DNA 的 ITS 序列, 共找到 22 个变异位点, 其中 ITS1 区域有 4 个、ITS2 区域有 16 个、5.8S 区域有 2 个, 序列间遗传分化距离 0.001 75 ~ 0.049 45。对于野生何首乌来说, 上述研究涉及的样品分布范围并不广、居群数也偏少, 且所用片段的变异位点不能充分反映何首乌野生种质资源的遗传结构。

*psbA-trnH* 基因间隔区位于编码光合系统 II 反应中心 D I 蛋白的 *psbA* 基因和编码 tRNA 组氨酸的 *trnH* 基因之间, 被认为是叶绿体基因组中进化速率最快的基因间隔区之一。目前, 已将 *psbA-trnH* 序列分析用于薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 3 个种<sup>[5]</sup>、石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 15 个种<sup>[6]</sup> 和连翘 [*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl] 3 个居群<sup>[7]</sup> 的遗传多样性研究。

作者对采自 17 个省区的野生何首乌 85 个单株的 *psbA-trnH* 序列进行了分析, 比较分析野生何首乌的遗传多样性, 探讨不同居群的遗传变异程度, 以期为其优良品种的选育和种质资源的研究提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试的 17 个野生何首乌居群的分布地及基本地

理信息见表 1。凭证标本存放于江苏省·中国科学院植物研究所标本馆 (NAS), 经江苏省·中国科学院植物研究所杭悦宇研究员鉴定。于 2010 年在每个居群选取 5 株样株, 采集幼嫩且无病虫害的干净叶片, 用变色硅胶干燥后保存、待用。

实验用 10×PCR buffer (含  $Mg^{2+}$ )、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 均购自上海博彩生物科技有限公司, 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州爱思进生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取 参照文献 [8] 采用改良 CTAB 法提取基因组总 DNA。取 10 mg 叶片, 在液氮中研磨后加入 500  $\mu$ L 提取液于 65  $^{\circ}$ C 水浴中保温 45 min, 期间摇动 30 次; 加入 500  $\mu$ L 体积比 24:1 的氯仿-异戊醇混合液, 混合均匀, 12 000  $r \cdot min^{-1}$  离心 10 min; 取上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇, -20  $^{\circ}$ C 放置 1 h 以上; 4 000  $r \cdot min^{-1}$  离心 10 ~ 20 min 使 DNA 沉淀; 用 700  $\mu$ L 体积分数 70% 乙醇清洗 1 次, 4 000  $r \cdot min^{-1}$  离心 5 ~ 10 min; 再用 700  $\mu$ L 无水乙醇清洗 1 次, 4 000  $r \cdot min^{-1}$  离心 5 ~ 10 min; 得到 DNA 沉淀, 晾干, 最后加入 100  $\mu$ L 水或 TE 溶解 DNA。

1.2.2 *psbA-trnH* 序列的扩增及产物检测 根据 GenBank 中发布的何首乌 *psbA-trnH* 序列 (GenBank 登录号为 EU554047.1), 采用 Primer Premier 5.0 软件自行设计 *psbA-trnH* 序列引物, FHS 和 FHA 引物序列分别为 5'-TTCCCGCTAGACCTAGCTGC-3' 和 5'-ACTGCCTTGATCCACTTGGC-3'。

扩增反应在 PE-9600 型 PCR 仪 (Perkin Elmer 公司生产) 上进行。扩增反应体系总体积 20  $\mu$ L, 含 30 ng 模板 DNA、10 × PCR buffer (含  $Mg^{2+}$ ) 2  $\mu$ L、10 mmol  $\cdot L^{-1}$  dNTPs 0.3  $\mu$ L、5  $\mu$ mol  $\cdot L^{-1}$  引物 2  $\mu$ L 和 5 U  $\cdot \mu$ L<sup>-1</sup> *Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 用灭菌双蒸水补足至 20  $\mu$ L。扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 70  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 最后于 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

表 1 供试何首乌野生居群的基本概况<sup>1)</sup>Table 1 Basic status of wild populations of *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald. tested<sup>1)</sup>

编号 No.	采集地 Locality	凭证标本号 Voucher number	GenBank 登录号 GenBank accession No.	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitude
1	贵州贵阳 Guiyang of Guizhou	0651568,0651601-0651604	JN847843-JN847847	E106°37'48.51"	N26°38'50.82"	1 296
2	四川南充 Nanchong of Sichuan	0651574,0651652, 0651625-0651627	JN847848-JN847852	E106°06'38.51"	N30°50'16.05"	295
3	云南昆明 Kunming of Yunnan	0651578,0651640-0651643	JN847853-JN847856, JN847914	E102°43'19.93"	N25°02'15.80"	1 903
4	广西桂林 Guilin of Guangxi	0651567,0651597-0651600	JN847913, JN847857, JN847867-JN847869	E110°17'24.70"	N25°16'24.84"	166
5	湖南邵阳 Shaoyang of Hu'nan	0651571,0651613-0651616	JN847866, JN847880- JN847883	E111°28'04.05"	N27°14'20.01"	215
6	广东德庆 Deqing of Guangdong	0651582,0651648-0651651	JN847872-JN847876	E111°47'47.88"	N23°14'34.97"	40
7	山东临沂 Linyi of Shandong	0651575,0651628-0651631	JN847886, JN847927- JN847930	E118°21'23.21"	N35°06'16.82"	68
8	浙江长兴 Changxing of Zhejiang	0651579,0651644-0651647	JN847887-JN847891	E119°54'39.08"	N31°01'36.16"	28
9	湖北武当山 Wudangshan of Hubei	0651569,0651605-0651608	JN847892, JN847900- JN847903	E110°13'38.36"	N32°13'31.71"	287
10	福建武夷山 Wuyishan of Fujian	0651565,0651589-0651592	JN847893-JN847897	E118°02'07.12"	N27°45'23.93"	252
11	上海 Shanghai	0651576,0651632-0651635	JN847898, JN847899, JN847925, JN847926, JN847947	E121°27'00.35"	N31°09'01.49"	7
12	江西南昌 Nanchang of Jiangxi	0651573,0651621-0651624	JN847904-JN847908	E115°51'31.46"	N28°40'56.25"	21
13	甘肃陇南 Longnan of Gansu	0651566,0651593-0651596	JN847909-JN847912, JN847945	E104°55'19.46"	N33°24'02.76"	1 036
14	陕西西安 Xi'an of Shaanxi	0651577,0651636-0651639	JN847915-JN847919	E108°56'39.37"	N34°15'53.95"	407
15	江苏南京 Nanjing of Jiangsu	0651572,0651617-0651620	JN847931-JN847935	E118°49'58.43"	N32°03'01.94"	39
16	河南高山 Songshan of He'nan	0651570,0651609-0651612	JN847936-JN847939, JN847946	E113°01'10.03"	N33°42'52.28"	153
17	安徽合肥 Hefei of Anhui	0651564,0651585-0651588	JN847940-JN847944	E117°13'38.18"	N31°49'17.21"	34

<sup>1)</sup> 每个居群包含 5 个单株, 编号为 1-5 Each population contains five individuals with number 1-5.

扩增产物与 6×甘油凝胶上样液混合后, 用质量体积分数 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg·mL<sup>-1</sup> 1×EB) 进行电泳检测, 电泳时间约 40 min。电泳结束后用 WV-BP330 型凝胶扫描分析系统(江苏捷达科技发展有限公司生产)观察扩增结果并拍照。

1.2.3 扩增片段的纯化和序列测定 PCR 扩增产物用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化, 纯化后使用引物 FHS 和 FHA 直接进行双向测序, 测序由上海华大基因有限公司完成。

### 1.3 序列分析

采用 Sequencher 软件进行峰图文件的编辑和拼接, 拼接好的序列用 MEGA 4.1 软件进行多重序列比对(multiple sequence alignment, MSA), 对序列长度、保守位点、变异位点和简约信息位点等序列特征进行分析<sup>[9]</sup>; 通过 Kimura 2-parameter(K2P) 模型计算遗传距离, 构建距离矩阵<sup>[10]</sup>; 应用 DnaSP 5.10<sup>[11]</sup> 软件

计算核苷酸多样性指数<sup>[12]</sup>、基因流<sup>[13]</sup>和居群间遗传分化系数<sup>[13]</sup>; 以蒺藜(*Polygonum aviculare* L.) (GenBank 登录号为 FJ395458.1) 为外类群, 通过邻接法(neighbor-joining method, NJ) 构建基于遗传距离的聚类图, 构建的系统发育树采用 1 000 次循环的自举检验法(bootstrap test) 检验各分支的置信度, 空缺(gap) 始终作为缺失(missing) 处理<sup>[14]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 何首乌居群 *psbA-trnH* 序列扩增结果分析

供试的 85 个野生何首乌单株 *psbA-trnH* 序列的长度为 243 ~ 434 bp, 排序后两端切平获得的序列长度为 384 bp, 当空缺(gap) 始终作缺失(missing) 处理时, 保守位点有 217 bp, 占序列总长度的 56.5%; 变异位点有 167 bp, 占序列总长度的 43.5%, 变异类型主

要为碱基缺失和替换。其中,简约信息位点有 53 bp, 占序列总长度的 13.8%。

### 2.2 何首乌居群 *psbA-trnH* 序列的差异分析

何首乌不同居群 *psbA-trnH* 序列变异位点的比较结果见表 2。由表 2 可见:何首乌不同居群间和单株间 *psbA-trnH* 序列均存在碱基变异位点,主要集中在 235~281 bp 区域。福建、广东、湖北、湖南、江西、四川和浙江居群的所有单株,山东居群的 4 号单株,上海居群的 2 号和 4 号单株,广西居群的 1~4 号单株以及云南居群的 2~5 号单株的 *psbA-trnH* 序列在 235~281 bp 位点的碱基序列依次为 TATGGCCTCT TTGCTGT(或 G) TTTG(或 T 或 A) GTTGGGTGACT TTTTTTTGATTTCAT;贵州居群 5 个单株的 *psbA-trnH* 序列在 235~281 bp 位点的碱基序列依次为 TCT-CCCTCTTT--TGTTTT----GGG-GGAAATTCCTTT--TTCTT(“-”表示碱基缺失)。比较而言,贵州居群 *psbA-trnH* 序列 235~281 bp 区域间有 16 个变异位点,与其他 11 个居群的差异较大。在 251 bp 位置,其他 11 个居群的碱基分别为 T 和 G,其中,福建、湖北、

江西、四川和浙江居群的所有单株,山东居群的 4 号单株,上海居群的 2 号和 4 号单株及云南居群的 2~5 号单株的碱基为 T;广东和湖南居群的所有单株以及广西居群的 1~4 号单株的碱基为 G。在 255 bp 位置,福建、湖北、江西和浙江居群的所有单株,山东居群的 4 号单株以及上海居群的 2 号和 4 号单株的碱基为 G;广东和湖南居群的所有单株以及广西居群的 1~4 号单株的碱基为 T;四川居群的 5 个单株和云南居群的 2~5 号单株的碱基为 A。

安徽、甘肃、河南、江苏和陕西居群所有单株的 *psbA-trnH* 序列在 235~281 bp 位点的碱基均缺失;山东居群的 1~3 号和 5 号单株,上海居群的 1 号、3 号和 5 号单株,广西居群的 5 号单株及云南居群的 1 号单株在这段序列位点也存在碱基缺失。

根据 *psbA-trnH* 序列 235~281 bp 区域的碱基差异,17 个野生何首乌居群可被划分为 3 大组:第 1 组包括福建、广东、湖北、湖南、江西、四川、浙江、广西和云南居群;第 2 组仅贵州居群,其特征为 235~281 bp 序列与第 1 组相比有 16 个变异位点;第 3 组包括安

表 2 何首乌 17 个野生居群 *psbA-trnH* 序列变异位点的比较

Table 2 Comparison of variable sites in *psbA-trnH* sequence of seventeen wild populations of *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.

居群号 <sup>1)</sup> Population No. <sup>1)</sup>	单株号 Individual No.	各位点的碱基 <sup>2)</sup> Base at different sites <sup>2)</sup>																			
		8	14	20	79	80	83	86	88	90	91	92-98	99	103	104	107	111	112	114	115	130
13	1-5	G	A	T	T	C	A	A	A	G	G	-	A	T	T	G	C	A	A	A	A
14	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	2-5	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	1,3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	2,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	1-3,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	1-3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	4-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	1,3,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	2,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1	1-5	.	T	G	A	-	C	T	T	A	-	-	C	-	C	A	T	-	-	-	-

续表 2 Table 2 (Continued)

居群号 <sup>1)</sup> Population No. <sup>1)</sup>	单株号 Individual No.	各位点的碱基 <sup>2)</sup> Base at different sites <sup>2)</sup>																		
		131	136	137	138	139	140	141	142	143	149	150	151	152	157	161-165	170	173	185	191
13	1-5	C	T	-	-	A	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	G	T	
14	1-5	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
15	1-5	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
16	1-5	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
17	1-5	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
2	1-5	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
3	1	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
	2-5	.	-	-	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
4	1,3	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	T	.	T	-	.	.	.	.	
	2,4	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	T	.	T	-	.	.	.	.	
	5	.	.	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
5	1-5	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	T	.	T	-	.	.	.	.	
6	1-5	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	T	.	T	-	.	.	.	.	
7	1-3,5	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
	4	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C	.	.	.	
8	1-3	.	.	-	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C	.	.	.	
	4-5	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C	.	.	.	
9	1-5	.	.	-	C	-	-	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
10	1-5	.	.	-	C	-	-	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
11	1,3,5	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
	2,4	.	.	-	C	-	-	-	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
12	1-5	.	.	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	
1	1-5	-	.	T	C	.	.	.	.	T	G	G	A	G	II	.	T	A	C	

居群号 <sup>1)</sup> Population No. <sup>1)</sup>	单株号 Individual No.	各位点的碱基 <sup>2)</sup> Base at different sites <sup>2)</sup>																		
		196	197	198	199	209	211	216	217	218	219	227	228	229	230	231	235-250	251	252	253
13	1-5	T	G	T	A	T	C	C	G	A	A	C	T	A	C	C	-	-	-	-
14	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
15	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
16	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
17	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
2	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
3	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
	2-5	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
4	1,3	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	III	G	T	T
	2,4	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	III	G	T	T
	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
5	1-5	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	III	G	T	T
6	1-5	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	III	G	T	T
7	1-3,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
	4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
8	1-3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
	4-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
9	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
10	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
11	1,3,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-
	2,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
12	1-5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	III	T	T	T
1	1-5	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	T	A	T	T	IV	T	T	T	

续表2 Table 2 (Continued)

居群号 <sup>1)</sup> Population No. <sup>1)</sup>	单株号 Individual No.	各位点的碱基 <sup>2)</sup> Base at different sites <sup>2)</sup>																	
		254	255	256-281	285	287	288	289	293	300	303-326	336-342	343	349	350	354-366	371	378	380
13	1-5	-	-	-	T	T	T	C	C	-	-	-	T	T	T	-	T	G	C
14	1-5	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
15	1-5	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
16	1-5	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
17	1-5	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
2	1-5	T	A	V	.	.	.	.	A	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
3	1	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
	2-5	T	A	V	.	.	.	.	A	A	-	-	.	.	.	-	.	.	.
4	1,3	T	T	V	.	.	.	.	.	A	-	VIII	.	.	.	-	.	.	.
	2,4	T	T	V	.	.	.	.	.	A	-	-	.	.	.	-	.	.	.
	5	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
5	1-5	T	T	V	.	.	.	.	.	A	-	-	.	.	.	-	.	.	.
6	1-5	T	T	V	.	.	.	.	.	A	-	-	.	.	.	-	.	.	.
7	1-3,5	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
	4	T	G	V	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
8	1-3	T	G	V	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
	4-5	T	G	V	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
9	1-5	T	G	V	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
10	1-5	T	G	V	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
11	1,3,5	-	-	-	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
	2,4	T	G	V	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
12	1-5	T	G	V	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.	.	-	.	.	.
1	1-5	T	-	VI	C	-	-	-	A	A	VII	IX	C	A	A	X	G	A	T

<sup>1)</sup> 1. 贵州贵阳 Guiyang of Guizhou; 2. 四川南充 Nanchong of Sichuan; 3. 云南昆明 Kunming of Yunnan; 4. 广西桂林 Guilin of Guangxi; 5. 湖南邵阳 Shaoyang of Hu'nan; 6. 广东德庆 Deqing of Guangdong; 7. 山东临沂 Linyi of Shandong; 8. 浙江长兴 Changxing of Zhejiang; 9. 湖北武当山 Wudangshan of Hubei; 10. 福建武夷山 Wuyishan of Fujian; 11. 上海 Shanghai; 12. 江西南昌 Nanchang of Jiangxi; 13. 甘肃陇南 Longnan of Gansu; 14. 陕西西安 Xi'an of Shaanxi; 15. 江苏南京 Nanjing of Jiangsu; 16. 河南嵩山 Songshan of He'nan; 17. 安徽合肥 Hefei of Anhui.

<sup>2)</sup> “.”: 表示与甘肃陇南居群的碱基相同 Representing the base being same to Longnan of Gansu population; “-”: 碱基缺失 Base missing; I: ATTATA; II: TTAC; III: TATGGCCTCTTTGGTG; IV: TCT-CCCTCTTT--TG; V: GTGGGTGGACTTTTTTTTGATTCAT; VI: ---GGG-GGAAATTTCTTT--TTCTT; VII: GATTGAAAATTTTTGTTGATTTC; VIII: TGAAATT; IX: AAAGTTA; X: ATGATGAATAGTG.

徽、甘肃、河南、江苏、陕西、山东和上海居群,其特征为235~281 bp区域碱基缺失。另外,第1组又可分为3小组:第1小组包括广东、湖南和广西居群,其251 bp位点的碱基为G、255 bp位点的碱基为T;第2小组包括福建、湖北、江西和浙江居群,其251和255 bp 2个位点的碱基恰好与第1小组完全相反;第3小组包括四川和云南居群,其251和255 bp的碱基分别为T和A。

### 2.3 何首乌居群的遗传多样性分析

采用MEGA 4.1软件中的Kimura 2-parameter模型计算何首乌不同居群间 *psbA-trnH* 序列的遗传距离并构建序列距离矩阵,结果见表3。何首乌各居群间的遗传距离为0.000~0.172;其中,贵州居群与其他居群间的遗传距离均较大,为0.167~0.172;其他居群间的遗传距离均较小,为0.000~0.017。

何首乌17个野生居群的核苷酸多样性指数为

0.028 56±0.005 43,居群间的遗传分化系数达到0.918 68,基因流为0.04。说明17个何首乌野生居群总遗传变异的91.868%来自居群间,8.132%来自居群内,居群间的基因交流较少。

由于贵州居群的 *psbA-trnH* 序列与其他居群有较大差异,因此,对其他16个居群以及贵州居群与其周边省区居群的遗传多样性进行了分析,结果显示:其他16个居群的核苷酸多样性指数为0.015 68±0.000 77,居群间遗传分化系数为0.837 19,基因流为0.10;贵州居群与其周边省区(四川、云南、广西、湖南和湖北)居群的核苷酸多样性指数为0.047 99±0.010 88,居群间遗传分化系数为0.937 62,基因流为0.03。说明其他16个何首乌野生居群的整体遗传多样性水平偏低;贵州居群与其周边省区居群的遗传分化系数大于其他16个居群,基因交流则小于其他16个居群,说明何首乌野生居群的遗传多样性整体水平

表 3 何首乌 17 个野生居群间的遗传距离<sup>1)</sup>Table 3 Genetic distance among seventeen wild populations of *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.<sup>1)</sup>

居群 Population	各居群间的遗传距离 Genetic distance among different populations															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
2	0.167															
3	0.171	0.005														
4	0.167	0.014	0.016													
5	0.167	0.016	0.017	0.002												
6	0.167	0.016	0.017	0.002	0.000											
7	0.168	0.009	0.010	0.007	0.009	0.009										
8	0.172	0.012	0.013	0.010	0.012	0.012	0.003									
9	0.172	0.012	0.013	0.010	0.012	0.012	0.005	0.008								
10	0.172	0.012	0.013	0.010	0.012	0.012	0.005	0.008	0.000							
11	0.169	0.009	0.011	0.008	0.009	0.009	0.002	0.006	0.002	0.002						
12	0.167	0.008	0.009	0.006	0.008	0.008	0.001	0.004	0.004	0.004	0.002					
13	0.167	0.008	0.009	0.006	0.008	0.008	0.001	0.004	0.004	0.004	0.002	0.000				
14	0.167	0.008	0.009	0.006	0.008	0.008	0.001	0.004	0.004	0.004	0.002	0.000	0.000			
15	0.167	0.008	0.009	0.006	0.008	0.008	0.001	0.004	0.004	0.004	0.002	0.000	0.000	0.000		
16	0.167	0.008	0.009	0.006	0.008	0.008	0.001	0.004	0.004	0.004	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	
17	0.167	0.008	0.009	0.006	0.008	0.008	0.001	0.004	0.004	0.004	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>1)</sup> 1. 贵州贵阳 Guiyang of Guizhou; 2. 四川南充 Nanchong of Sichuan; 3. 云南昆明 Kunming of Yunnan; 4. 广西桂林 Guilin of Guangxi; 5. 湖南邵阳 Shaoyang of Hu'nan; 6. 广东德庆 Deqing of Guangdong; 7. 山东临沂 Linyi of Shandong; 8. 浙江长兴 Changxing of Zhejiang; 9. 湖北武当山 Wudangshan of Hubei; 10. 福建武夷山 Wuyishan of Fujian; 11. 上海 Shanghai; 12. 江西南昌 Nanchang of Jiangxi; 13. 甘肃陇南 Longnan of Gansu; 14. 陕西西安 Xi'an of Shaanxi; 15. 江苏南京 Nanjing of Jiangsu; 16. 河南嵩山 Songshan of He'nan; 17. 安徽合肥 Hefei of Anhui.

在很大程度上受贵州居群的影响。

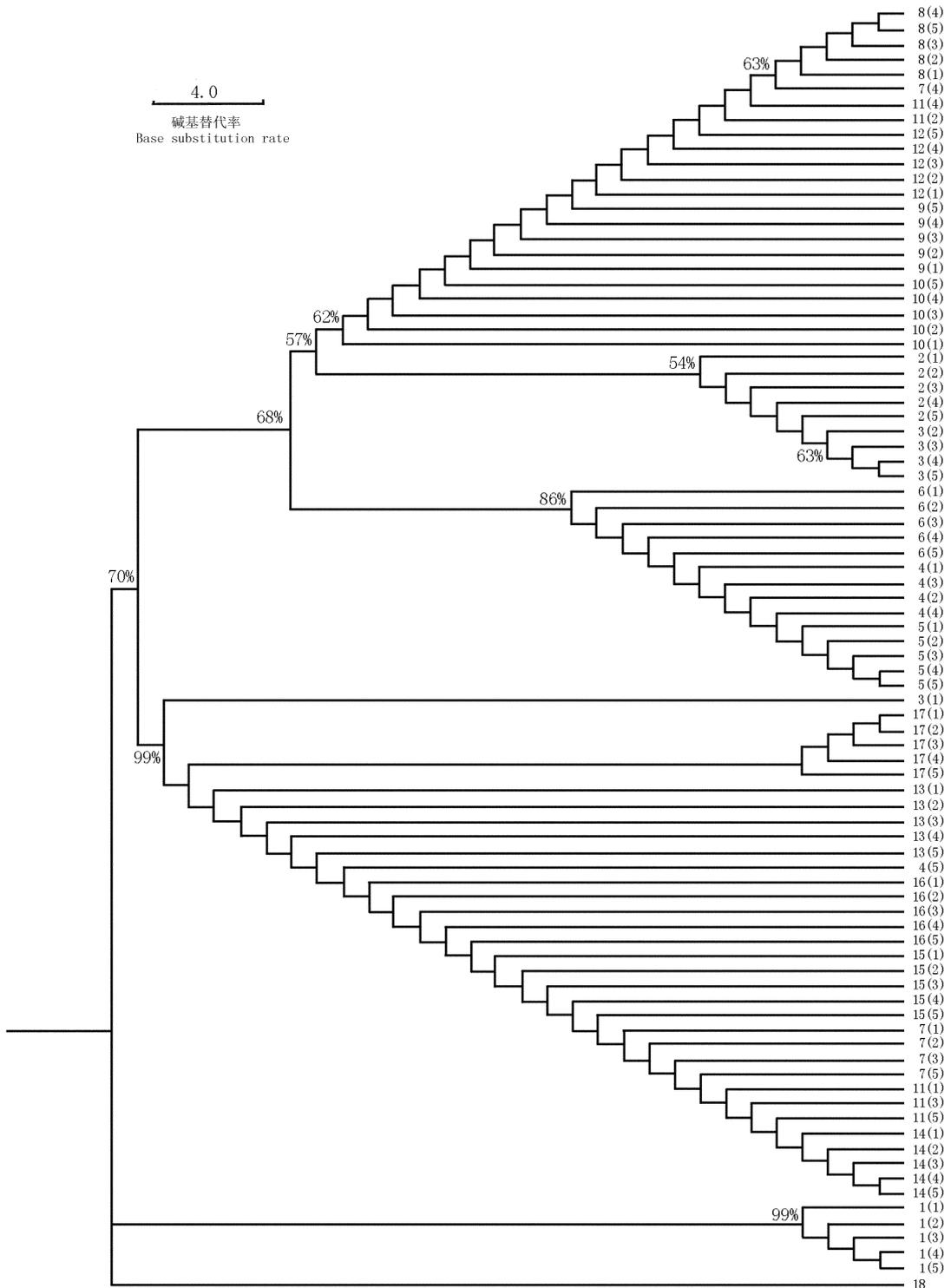
## 2.4 何首乌居群的聚类分析

以蒺藜为外类群,依据遗传距离、采用邻接法(NJ)对何首乌 17 个野生居群进行聚类分析并构建遗传关系树,结果见图 1。由图 1 可看出:17 个何首乌野生居群的 85 个单株可聚成 4 支。浙江、江西、湖北、福建和四川居群的所有单株,山东居群的 4 号单株,上海居群的 2 号和 4 号单株及云南居群的 2~5 号单株聚在一起成为第 1 支,自展支持率达 57%,其中,四川居群的 5 个单株和云南居群的 2~5 号单株又独立成支,与其他居群分离,但自展支持率仅为 54%。广东和湖南居群的所有单株及广西居群的 1~4 号单株聚在一起成为第 2 支,自展支持率达 86%。第 3 支包括安徽、甘肃、河南、江苏和陕西居群的所有单株,云南居群的 1 号单株,广西居群的 5 号单株,上海居群的 1 号、3 号和 5 号单株及山东居群的 1~3 号和 5 号单株,自展支持率达 99%,其中安徽居群相对独立。第 4 支是与其他居群遗传关系较远的贵州居群的 5 个单株,自展支持率为 99%,与其他居群明显分离,但与外类群关系相对较近。

通过比较可见:何首乌野生居群的聚类结果与 *psbA-trnH* 序列分析的划分结果基本一致。

## 3 讨论和结论

遗传多样性是生物在长期进化和发展过程中形成的自然属性,其不仅体现在种群间和种群内,也体现在不同个体间,是种群和个体遗传变异的总和<sup>[15]</sup>。特定物种的遗传多样性是该物种长期生存、进化和适应的结果<sup>[16]</sup>。一般来说,自交物种的核苷酸多样性指数平均值为 0.51,异交物种则小于 0.1<sup>[17]</sup>,而何首乌野生居群的核苷酸多样性指数仅 0.028 56。Buso 等<sup>[18]</sup>认为遗传分化系数大于 0.25 则表示居群间的分化程度很大,而本研究中何首乌居群间的遗传分化系数达到 0.918 68。Slatkin<sup>[19-20]</sup>将基因流分为高(大于或等于 1.000)、中(0.250~0.990)、低(0.000~0.249)3 个等级,本研究中何首乌居群间的基因流为 0.04,属于低等级。因而,总体上看何首乌野生居群整体遗传多样性水平偏低,居群间遗传分化很大,但居群间的基因流远小于标准,说明遗传漂变是影响何首乌居群遗传结构的主导因素<sup>[21]</sup>。而何首乌居群间的基因流不足以完全抵制由遗传漂变而引起的居群分化,这也是何首乌居群遗传多样性水平偏低和居群间遗传分化系数较大的原因。



1-17. 何首乌居群 *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald. population; 1. 贵州贵阳 Guiyang of Guizhou; 2. 四川南充 Nanchong of Sichuan; 3. 云南昆明 Kunming of Yunnan; 4. 广西桂林 Guilin of Guangxi; 5. 湖南邵阳 Shaoyang of Hu'nan; 6. 广东德庆 Deqing of Guangdong; 7. 山东临沂 Linyi of Shandong; 8. 浙江长兴 Changxing of Zhejiang; 9. 湖北武当山 Wudangshan of Hubei; 10. 福建武夷山 Wuyishan of Fujian; 11. 上海 Shanghai; 12. 江西南昌 Nanchang of Jiangxi; 13. 甘肃陇南 Longnan of Gansu; 14. 陕西西安 Xi'an of Shaanxi; 15. 江苏南京 Nanjing of Jiangsu; 16. 河南嵩山 Songshan of He'nan; 17. 安徽合肥 Hefei of Anhui. 18. 蒺藜 *Polygonum aviculare* L. 括号中的数字表示每个居群中的单株编号 Numbers in brackets indicate the individual number in each population. 百分数表示分支的自展支持率 Percentage indicates the bootstrap value of branches.

图1 基于 *psbA-trnH* 序列分析的何首乌 17 个野生居群的 NJ 系统树

Fig. 1 NJ phylogenetic tree of seventeen wild populations of *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald. based on *psbA-trnH* sequence analysis

研究表明:除贵州居群外,供试的其他 16 个居群间的基因流为 0.10,遗传分化系数为 0.837 19;而贵州居群与其周边省区(四川、云南、广西、湖南和湖北)居群间的基因流仅为 0.03,遗传分化系数却达到 0.937 62,明显大于其他 16 个居群间。推测造成这一现象的原因可能是由于云贵高原具有较特殊的喀斯特地貌,由此形成的地理隔离阻碍了基因交流,导致分化较大。因此,何首乌居群的整体多样性水平在很大程度上受贵州居群的影响。从形态上看,17 个居群的何首乌外部形态特征基本一致,但贵州居群植株主、侧叶脉的白斑程度最大,叶窝凹陷程度最小,花序长度最短,叶长宽比和宿存花被长度相对较小,开花期相对较晚(另文发表)。贵州居群在形态上的差异得到了 *psbA-trnH* 序列分析及聚类分析(自展支持率 99%,与供试的其他 16 个居群明显分离)结果的支持,证明贵州居群确实与其他居群存在较大差异,表现出特殊的形态和遗传特性。推测贵州居群可能是何首乌的 1 个新变种,但还需多学科研究验证。

聚类分析结果表明:17 个何首乌野生居群中有 13 个居群各自的 5 个单株聚在一起,仅山东、云南和广西居群各有 1 个单株与同居群大部分单株较远而被聚到其他分支中,而上海居群的 2 号和 4 号单株聚在第 1 支中,1 号、3 号和 5 号单株则聚在第 3 支中。说明各居群不同单株基于 *psbA-trnH* 序列的遗传背景基本一致,仅有少量变异,这一现象可能与这些居群单株间分布的地理环境生态因子不同有关。在进化发展过程中同种不同个体所承受的生境选择存在一定差异,使个体在各自的自然环境下发生了变异。有研究者在黄独(*Dioscorea bulbifera* L.)遗传多样性研究中也观察到这一现象<sup>[22]</sup>,因而,同一居群不同个体间存在变异的情况并不少见。

#### 参考文献:

- [1] WU Z Y, RAVEN P H. Flora of China: Vol. 5 [M]. Beijing: Science Press, 2003: 277-350.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 164-165.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 孙华钦, 罗科, 邹文俊, 等. 穿龙薯蓣、黄山药和盾叶薯蓣

- psbA-trnH* 片段序列分析[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 792-797.
- [6] 邵世光, 韩丽, 马艳红, 等. 枫斗类石斛 cpDNA *psbA-trnH* 的序列分析与鉴别[J]. 药学报, 2009, 44(10): 1173-1178.
- [7] 李永, 杨攀, 李永华. 伏牛山区连翘遗传多样性研究[J]. 西北植物学报, 2011, 31(4): 665-670.
- [8] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19(1): 11-15.
- [9] KUMAR S, TAMURA K, JAKOBSEN I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17(12): 1244-1245.
- [10] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [11] ROZAS J, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, MESSEGUER X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [12] NEI M. Molecular Evolutionary Genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [13] LYNCH M, CREASE T J. The analysis of population survey data on DNA sequence variation[J]. Molecular Biology and Evolution, 1990, 7(4): 377-394.
- [14] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [15] 中国科学院生物多样性委员会. 生物多样性研究的原理与方法 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [16] 文亚峰, 韩文军, 吴顺. 植物遗传多样性及其影响因素[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(12): 80-87.
- [17] HAMRICK J L, GODT M J W. Allozyme diversity in plant species [M]//BROWN A H D, CLEGG M T, KAHLER A L, et al. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 1989: 43-63.
- [18] BUSO G S C, RANGEL P H, FERREIRA M E. Analysis of genetic variability in South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers [J]. Molecular Ecology, 1998, 7(1): 107-117.
- [19] SLATKIN M. Estimating levels of gene flow in natural populations [J]. Genetics, 1981, 99(2): 323-335.
- [20] SLATKIN M. Rare alleles as indicators of gene flow [J]. Evolution, 1985, 39(1): 53-65.
- [21] WALKER C W, VILÀ C, LANDA A, et al. Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (*Gulo gulo*) populations [J]. Molecular Ecology, 2001, 10(1): 53-63.
- [22] 郑玉红, 夏冰, 杭悦宇, 等. 黄独遗传多样性研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(10): 2011-2017.

(责任编辑: 佟金凤)