

·分子生药·

华细辛转录组 SSR 标记的开发及其在华细辛遗传多样性分析中的应用

陈梦颖¹, 戴瑞贤^{1,2}, 范玉玲^{1,3}, 刘忠^{1*}(1. 上海交通大学 药学院, 上海 200240; 2. 福建中医药大学 药学院, 福建 福州 350122;
3. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488)

摘要 为探索华细辛的遗传多样性,该研究基于转录组测序结果进行 SSR 标记的开发,并以来自不同地区的华细辛 5 个种群为分析样本,利用 GenALEX 6.5、NTSYS 2.1 和 Structure 2.3.4 等软件进行遗传多样性评估。结果显示,从华细辛转录组中筛选得到的 16 个多态性丰富且重复性好的 SSR 标记,以其两侧序列为模板设计引物,能够对华细辛 5 个种群的 150 个个体样本进行稳定扩增,共得到 56 个多态片段,平均每对引物扩增 3.5 个多态片段,变化范围为 2~8 个,检测到平均期望杂合度 (H_e)、Shannon's 多样性指数 (I)、Nei's 基因多样性指数 (H)、多态性信息含量指数 (PIC) 的均值分别为 0.172、0.281、0.429、0.382。种群间遗传分化系数 (F_{ST}) 均值为 0.588,与分子方差分析 (AMOVA) 结果 [华细辛种群间变异程度 (69%) 大于种群内变异程度 (31%)] 相一致,各种群的多态位点百分率 (PPL) 范围从大到小依次为 SNJ>LN>SY>SZ>TB。主成分分析 (PCoA) 和 UPGMA 聚类分析进一步显示,华细辛个体样本均按地理分布进行遗传聚类,与 Structure 聚类分析结果一致。综上所述,从转录组中开发的 SSR 标记能够有效评估华细辛自然分布种群间的遗传分化程度和种群遗传结构,揭示华细辛遗传多样性较为贫乏,遗传变异主要体现在种群水平,以及种群间遗传分化程度与地理距离存在相关性。

关键词 华细辛; 转录组; SSR 标记; 遗传多样性; 种群遗传结构

Exploration of transcriptome SSR markers and its application in genetic diversity assessment of *Asarum sieboldii*

CHEN Meng-ying¹, DAI Rui-xian^{1,2}, FAN Yu-ling^{1,3}, LIU Zhong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 3. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] To explore the genetic diversity of *Asarum sieboldii* this study developed SSR markers based on transcriptome sequencing results and five populations of *A. sieboldii* from different regions were used as samples for genetic diversity assessment using software such as GenALEX 6.5, NTSYS 2.1, and Structure 2.3.4. The results showed that 16 SSR markers with high polymorphism and good repeatability were selected from the *A. sieboldii* transcriptome. Primers designed based on the flanking sequences of these markers successfully amplified 56 polymorphic fragments from 150 individual samples of the five *A. sieboldii* populations. On average, each primer amplified 3.5 polymorphic fragments, ranging from 2 to 8. The mean values of expected heterozygosity (H_e), Shannon's diversity index (I), Nei's gene diversity index (H), and the polymorphic information content (PIC) were 0.172, 0.281, 0.429, and 0.382, respectively. The mean population differentiation coefficient (F_{ST}) was 0.588, consistent with the analysis of molecular variance (AMOVA) results, which indicated greater genetic variation among *A. sieboldii* populations (69%) than that within

收稿日期 2023-04-08

基金项目 国家自然科学基金面上项目(32270384,31570325)

通信作者 * 刘忠, 研究员, 主要从事中药资源与分子生药学研究, Tel: (021) 34208148, E-mail: liuzhong@sjtu.edu.cn

作者简介 陈梦颖, 硕士研究生, 主要从事中药资源与分子生药学研究, E-mail: crystal_chen_0126@sjtu.edu.cn

populations (31%). The percentage of polymorphic loci (PPL) ranged from highest to lowest as SNJ>LN>SY>SZ>TB. Principal coordinate analysis (PCoA) and UPGMA clustering analysis further revealed genetic clustering of *A.sieboldii* individuals based on their geographical distribution, consistent with the results of the structure clustering analysis. In summary, the SSR markers developed from the transcriptome effectively assessed the genetic differentiation and population structure of natural *A.sieboldii* populations, revealing a relatively low genetic diversity in *A.sieboldii*, with genetic variation primarily observed at the population level and a correlation between population differentiation and geographic distance.

[Key words] *Asarum sieboldii*; transcriptome; SSR markers; genetic diversity; population genetic structure

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20230623.101

马兜铃科 Aristolochiaceae 细辛属 *Asarum* L. 植物全世界约 100 种,多数具有药用价值^[1]。其中,作为中药细辛的基原植物之一,华细辛 *A.sieboldii* Miq. 是有最早药用历史和最多记载的正品细辛^[2]。在我国,华细辛以秦岭-大巴山区为中心,广泛分布在东至山东崂山,西达甘肃陇南,南抵长江中下游诸省市的华中和华东地区^[3]。南北朝以来的历代本草学著作多有记载“华州(今陕西省华阴市)细辛好”,华细辛也因此得名,并且华阴市所产细辛长期被视为细辛的道地药材^[4]。根据本课题组前期研究结果,湖北神农架林区及其毗邻地区的华细辛在主要活性成分特征上与其他地区的华细辛存在显著差异,主要体现在挥发油中甲基丁香酚(有效成分)含量高于黄樟醚(毒性成分),而其他地区均为甲基丁香酚含量低于黄樟醚^[5],显示不同产地来源的华细辛在药材品质上存在差异。

遗传基础是药材品质形成的内在因素^[6],物种遗传多样性分析则是揭示物种遗传分化特征、活性成分产生与积累规律的基础。在基因组中广

泛分布的简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)具有高重现性、强特异性和共显性等优势^[7],已成为物种遗传多样性研究中有效的分子标记,可直接反映遗传基础水平上的多态性^[8]。尤其是基于转录组测序开发的 SSR 标记,被成功运用于植物遗传多样性、品种鉴定和遗传图谱构建的研究中^[9]。

本研究基于转录组测序数据开发 SSR 标记,并利用不同产地的华细辛为研究材料,进行遗传多样性评估,检测该方法在华细辛遗传多样性分析、物种进化、种质资源鉴别与保护等方面的适用性,同时,获得华细辛遗传多样性信息。

1 材料

1.1 植物

本研究以神农架为中心点,选择该地域四周不同地理分布点,采集华细辛野生种群为样本,每个种群采集 30 个个体,5 个种群共计 150 个个体(表 1)。所采样本均由上海交通大学药学院刘忠研究员鉴定为华细辛 *A.sieboldii*。

表 1 华细辛 5 个种群的来源信息

Table 1 Source information of 5 populations of *Asarum sieboldii*

种群代码	采集地点	经度(E)	纬度(N)	海拔/m
TB	陕西省宝鸡市太白县	107°32'17.34"	34°2'11.37"	1 739.8
LN	陕西省商洛市洛南县	109°50'11.72"	34°16'18.22"	1 857.6
SZ	湖南省张家界市桑植县	110°68'13.45"	29°69'58.42"	1 381.4
SY	湖北省十堰市	110°41'40"	32°23'24"	1 209.5
SNJ	湖北省神农架林区	110°40'16"	31°61'31"	1 357.9

注:种群代码使用采样地点名称的汉语拼音首字母缩写(表 5、8,图 2、5、6 同)。

1.2 试剂

引物、琼脂糖、四甲基乙二胺[生工生物工程(上海)股份有限公司],5'-FAM/HEX 荧光引物(苏州金唯智生物科技有限公司),50×TAE(上海碧云天生物技术有限公司),FastPure® Plant DNA Isola-

tion Mini Kit 试剂盒、2×Taq Master Mix、10×DNA Loading Buffer、DL2 000 Plus DNA Marker(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),亲和硅烷、剥离硅烷(上海源叶生物科技有限公司),丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(武汉赛维尔生物科技有限公司),尿素

(上海麦克林生化科技股份有限公司), 乙二胺四乙酸二钠、乙酸(北京伊诺凯科技有限公司), 硝酸银标准溶液(哈尔滨道外区多利生物试剂销售部), 氢氧化钠、硼酸、过硫酸铵、乙醇、甲醛(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 仪器

Milli-Q Reference 超纯水系统(Merck, 德国), LDZX-30KBS 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂), ALC-310.3 型电子分析天平(Sartorius, 德国), JXFSTPRP-24 型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司), AG 22331 Hamburg 台式高速离心机、Mastercycler nexus GX2 PCR 仪(Eppendorf, 德国), DYY-6C 型电泳仪、DK-8D 型电热恒温水槽(北京六一生物科技有限公司), 1600 凝胶成像分析系统(上海天能电池集团股份有限公司), NanoDrop 2000 核酸定量分析仪(Thermo, 美国), 96 通道全自动 ABI3730XL 遗传分析仪(Applied Biosystems, 美国)。

2 方法

2.1 SSR 位点统计

华细辛样品的转录组测序由北京百迈客生物科技有限公司进行。利用 MISA 软件对 1 kb 以上 unigene(16 445 条), 按照重复基元的重复次数在 5 次以上为标准, 进行 SSR 位点筛选。以 SSR 位点两侧序列作为初筛引物序列来源, 并采用 Primer 5 进行引物设计^[14]。

2.2 华细辛基因组 DNA 的提取

将新鲜、健康无病害的华细辛叶片用液氮研磨成粉末, 利用 FastPure[®] Plant DNA Isolation Mini Kit 分别提取 150 个个体的 gDNA, 使用 2% 琼脂糖凝胶电泳、核酸定量分析仪检测 DNA 的纯度和浓度, 并统一稀释至质量浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 保存于 -20°C 冰箱, 备用^[11]。

2.3 多态性引物的筛选

首先, 利用 3% 琼脂糖凝胶电泳进行普筛。供试样本为华细辛各种群的混合样本(30 个个体 gDNA 混合)。PCR 扩增体系: $2 \times \text{Taqa}$ Master Mix $10.8 \mu\text{L}$, 上下游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1.6 \mu\text{L}$, gDNA($100 \sim 1\,000 \text{ ng}$) $4 \mu\text{L}$, ddH₂O $2 \mu\text{L}$, 总体积 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序: 95°C 预变性 5 min ; 95°C 变性 15 s , 不同退火温度 30 s , 72°C 延伸 30 s , 循环 30 次; 72°C 延伸 5 min 。扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 选取有清晰扩

增片段的引物进行进一步验证。

其次, 利用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行复筛。供试样本为华细辛各种群的混合样本(30 个个体混合)。PCR 扩增体系和程序同上。扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳前需要变性处理, 即每管 PCR 扩增产物中混合 $20 \mu\text{L}$ Loading Buffer, 95°C 变性 5 min , 打开 DNA 双链后立刻转移到冰浴中冷却 $15 \sim 20 \text{ min}$, 使 DNA 保持单链状态。采用 $1 \times \text{TBE}$ 为电泳缓冲液, 恒定电压 $3\,000 \text{ V}$, 电流 180 mA , PCR 扩增产物上样量为 $7.5 \mu\text{L}$, 电泳时间为 $2 \sim 3 \text{ h}$ 。电泳结束后, 经过固定、染色、漂洗和显影等步骤观察结果。二次筛选得到稳定扩增且多态性高的引物。

最后, 利用 TP-M13F-SSR 结合毛细管电泳检测法^[13], 对华细辛 150 个个体的 gDNA 样本进行 PCR 扩增, 扩增时使用 3 条引物: 第 1 条为荧光引物($5'$ -FAM 和 $5'$ -HEX); 第 2 条为 TP-M13 引物, 即在初筛的正向引物 $5'$ 端加上 M13F 接头($5'$ -TGTA-AAACGACGCCAGT- $3'$); 第 3 条为反向引物。PCR 扩增体系: $2 \times \text{Taqa}$ Master Mix $10 \mu\text{L}$, 荧光引物 $0.5 \mu\text{L}$, 上下游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $0.8 \mu\text{L}$, gDNA($100 \sim 1\,000 \text{ ng}$) $4 \mu\text{L}$, ddH₂O $3.9 \mu\text{L}$, 总体积 $20 \mu\text{L}$, PCR 扩增程序同上, 扩增产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。调整好浓度的样本各取 $1 \mu\text{L}$ 到上机板, 每孔加入 HiDi-Liz 500($250:1$) $9 \mu\text{L}$, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 s , 振荡混匀后, 再以 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 s , 95°C 变性 5 min , 迅速降到 4°C , 上样于 ABI3730XL 遗传分析仪, 进行毛细管电泳。通过 GeneMapper 软件分析毛细管电泳荧光检测原始数据, 利用 DataFormatter^[13] 软件和 CREATE^[14] 软件进行“01 型/bp 型”转化。

2.4 数据分析

2.4.1 遗传多样性 利用 GenALEx 6.5^[15] 和 Popgene 1.32^[16] 软件计算各 SSR 位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、固定指数(F)、Shannon's 多样性指数(I)、Nei's 基因多样性指数(H)、近交系数(F_{is})、总体近交系数(F_{it})、遗传分化系数(F_{ST})、基因流(N_m), 同时用分子方差分析(AMOVA)确定遗传变异在种群间和种群内所占比例; Powermarker 3.25^[17] 计算多态性信息含量指数(PIC); HP-RARE^[18] 软件计算经稀化处理后的各种群的等位基因丰富度(A_R)和私有等位基因丰富度(P_A)。

基于 GenALEx 6.5 软件的转化公式,根据华细辛不同种群采样点的经纬度计算种群间地理距离,以标准化的遗传分化系数 F'_{ST} [即 $F_{ST}/(1+F_{ST})$] 作为种群间的遗传距离。Mental test(设置 999 次随机置换)以种群间地理距离的自然对数值为 X 轴,遗传距离为 Y 轴,进行线性相关性分析,判断华细辛不同种群地理距离和遗传距离之间的相关性^[14]。同时,通过主成分分析(PCoA)和聚类分析来评估遗传分化程度与地理分布之间的相关性。

2.4.2 种群遗传结构 利用 Popgene 1.32 和 Powermarker 3.25 软件获得不同种群间的 Nei's 遗传距离和遗传一致性参数,设置 Bootstrap 重复抽样 1 000 次,对各分支进行自检,确定 95% 置信水平。根据 Nei's 遗传距离,使用 NTSYS 2.1^[21] 软件的 SAHN 程序和非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析,并通过 Tree Plot 模块生成聚类图,验证聚类结果。

应用 Structure 2.3.4^[21] 的贝叶斯聚类法对华细辛种群进行遗传结构分析,将种群数量 K 设定为 1~10,每个 K 迭代重复计算 20 次,MCMC 和 burn in 分别设置为 1 000 000 和 100 000。将分析结果压缩后导入 Structure Harvester(<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/#>)^[23] 中,以 K 为横坐标, ΔK 为纵坐标绘制曲线,根据拐点确定最佳 K (即

最适种群数),其归类标准是对每份华细辛个体进行每个个体属于每个特定亚群的概率(Q)分析,当个体的 $Q \geq 0.6$ 时,认为遗传背景相对单一, $Q < 0.6$ 则代表遗传结构多样化,遗传背景比较复杂^[23]。

3 结果与分析

3.1 SSR 位点统计及多态引物筛选

华细辛转录组测序结果共获得 42.29 Gb clean data,Q30 碱基占比在 94.21% 以上,组装后共获得 43 672 条 unigene,共发现 4 599 个 SSR 位点,分布在 3 769 条 unigene 中,发生频率(含 SSR 的 unigene 数与 unigene 总数之比)为 22.92%,出现频率(SSR 数与 unigene 总数之比)为 27.97%。此外,有 848 条 unigene 含 1 个以上的 SSR 位点,209 条 unigene 含有复合型 SSR 位点。

华细辛转录组 SSR 类型丰富,单核苷酸至六核苷酸重复类型均存在(表 2)。随机选择各重复类型 SSR 引物共 239 对,通过 3% 琼脂糖凝胶电泳,初步筛选到 191 对成功扩增的引物。根据扩增多态性,68 对引物为有效引物,占引物总数 28.45%。进一步使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,筛选出有产物、主带明显的引物。最终经毛细管电泳筛选,得到 16 对多态性丰富、重复性好,并且能稳定扩增出清晰条带的引物,用于正式实验(表 3)。

表 2 华细辛转录组 SSR 的数量及分布
Table 2 Number and distribution of SSRs based on transcriptome of *Asarum sieboldii*

重复类型	总数	占比/%	重复次数										
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	≥15
单碱基(p1)	2 132	43.36	0	0	0	0	0	1 222	425	209	93	60	123
双碱基(p2)	1 402	30.48	0	520	361	270	168	66	17	0	0	0	0
三碱基(p3)	764	16.61	506	181	70	7	0	0	0	0	0	0	0
四碱基(p4)	28	0.61	22	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
五碱基(p5)	6	0.13	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
六碱基(p6)	9	0.20	3	3	1			1					1
复合型(c)	255	5.54	0	0	0	0	0	8	12	29	24	21	161
多复合(c*)	3	0.07							1				2

3.2 SSR 标记的多态性

16 对多态性好的 SSR 引物在华细辛 150 个个体样本中共扩增得到 56 个多态片段(表 4),平均每对引物扩增得到 3.5 个,变化范围为 2~8 个。其中,引物 5、6、8、10、12、15、16 的多态性较高,相应的平均等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测

杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)等也高于其他引物,说明能更有效地检测到华细辛遗传多样性信息。所有位点的 H_e 均大于 H_o ,且固定指数(F)多为正值,Shannon's 多样性指数(I)为 0.029~0.556,均值为 0.281;Nei's 基因多样性指数(H)为 0.201~0.777,均值为 0.429;多态性信息含量指数(PIC)为 0.181~

表 3 16 对 SSR 引物相关信息

Table 3 Information of 16 pairs of SSR primers

No.	引物名称	重复单元	引物序列(5'-3')	片段/bp	荧光标记
1	p1-c118214. 1	(A) ₁₂	F: CTTGCTCACTTGCCCTCTCT R: AGTGTGTTTGTGTCGGGCAAT	189	FAM
2	p2-53-c205790. 3	(AG) ₇	F: ATGGGTGAGAGGAGCTGAGA R: CACAGCATCTCCTTTCTTTTATCA	205	
3	p2-60-c206421. 1	(CT) ₈	F: CTCCCTGGGACTTTTCTCTC R: GAGAGAGAGAGGGGATTGGG	294	
4	p2-62-c207576. 1	(TC) ₈	F: CTCGTTGGTAGATGGAAGCC R: CATAGAATTTCGGTCGCACCT	164	
5	p2-77-c209019. 3	(GA) ₇	F: TCACGCCCGTATAGAAATCC R: GCTTCAATTGTTTCTGCGTT	185	
6	95/p2-c209917. 1	(AG) ₁₀	F: CTTTCATCTCCCCCTTCCTTC R: GAGAGAGATTGAGATGCCGC	275	
7	p3-12-c177248. 2	(ACC) ₇	F: TGA CTGCTCTAAGCCTCCGT R: TCGCGTAACAGGTACCATCA	199	
8	13-p3-c182832	(AAG) ₆	F: CCTTCAACCTCTCGCTCAAC R: AGCGCCTCTTGCAATTTTAA	222	
9	14/p3-c182832. 2	(GGA) ₆	F: TAGTGGGGAGGAGGAGGATT R: AGCGACGACAAAAGCTACCAT	274	HEX
10	p3-22-c193300. 2	(TCT) ₅	F: CTCCACCACCTTCCTCAAAG R: CCAATCGATCTTTCCCTGAA	355	
11	p3-52-c210556. 1	(TCT) ₇	F: TTTTCACCCCAAGATCCAAG R: TCTTCTGTGTTGTTGCTGCC	258	
12	53/p3-c210556. 2	(AAG) ₇	F: TTCACCAACCAAAATAGGGA R: GCAGAAAGAAGCTTCATGGG	236	
13	p4-14-c206083	(CTAT) ₅	F: AATACATGGCTTGACTCGGC R: AGACGAGGCCATGGAAATTA	176	
14	p4-18-c209892	(TCCA) ₆	F: GCATGGCATAAATGGAGTGA R: TTGCTAAGGCACATTCGTTG	218	
15	p5-c188418	(GCGAG) ₅	F: TTCGTTCAAGCTAAGCGGAT R: GGGATGAGAACGCTGAAGAA	169	
16	p6-c181398	(CTGAGC) ₅	F: TAGTACCGGTTGATCCTGGC R: GGTCTAGGTGATCCAACCGA	172	

0.746,均值为 0.382。高度多态位点($PIC > 0.50$)有 5 个,占比 31.25%,其中引物 10 的 PIC (0.746) 最高;中度多态位点($0.25 < PIC < 0.5$)有 8 个,占比 50.00%;低度多态位点($PIC < 0.25$)有 3 个,占比 18.75%。可见,基于转录组 SSR 位点开发的 16 对 SSR 引物,在整体上具有较高的多态性,对本实验的展开具有较好的有效性,可以满足后续对华细辛遗传多样性分析的要求。

3.3 华细辛的遗传多样性

在种群水平上(表 5),每个 SSR 位点的等位基因数(N_a)为 1.250 (TB) ~ 2.250 (SNJ),均值为

1.792;有效等位基因数(N_e)为 1.020 (TB) ~ 1.535 (SNJ),均值为 1.304;经过稀化处理后计算得到的等位基因丰富度(A_R)为 1.110 (TB) ~ 1.960 (SNJ),均值为 1.582;私有等位基因丰富度(P_A)为 0.070 (TB) ~ 0.510 (SNJ),均值为 0.272;Shannon's 多样性指数(I)为 0.038 ~ 0.455,均值为 0.276。观测杂合度(H_o)为 0.019 (TB) ~ 0.123 (LN),均值为 0.071,期望杂合度(H_e)为 0.018 (TB) ~ 0.273 (SNJ),均值为 0.167,大部分种群的 H_o 均明显小于 H_e 且固定指数(F)为正值。依据多态位点百分率(PPL)对华细辛不同种群的遗传分化程度进行排

表 4 不同 SSR 位点的遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters of various SSR loci

位点	等位基因	N_a	N_e	H_o	H_e	F	I	H	PIC
1	2.000	1.200	1.193	0.053	0.098	0.457	0.137	0.201	0.181
2	2.000	1.800	1.115	0.093	0.098	0.020	0.188	0.336	0.279
3	3.000	1.600	1.185	0.073	0.121	0.267	0.200	0.288	0.248
4	2.000	1.800	1.271	0.153	0.172	0.018	0.278	0.428	0.336
5	4.000	2.200	1.766	0.120	0.352	0.734	0.556	0.633	0.560
6	5.000	2.000	1.462	0.027	0.249	0.903	0.406	0.690	0.637
7	3.000	1.400	1.303	0.047	0.168	0.688	0.243	0.413	0.374
8	4.000	1.600	1.189	0.020	0.123	0.837	0.208	0.374	0.334
9	2.000	1.200	1.014	0.013	0.013	-0.034	0.029	0.312	0.263
10	8.000	2.800	1.654	0.047	0.312	0.848	0.558	0.777	0.746
11	2.000	1.200	1.014	0.013	0.013	-0.034	0.029	0.328	0.274
12	7.000	2.800	1.534	0.113	0.234	0.273	0.452	0.284	0.277
13	2.000	1.400	1.273	0.093	0.162	0.407	0.237	0.201	0.181
14	2.000	1.600	1.250	0.120	0.170	0.403	0.270	0.351	0.289
15	4.000	1.800	1.436	0.080	0.251	0.663	0.382	0.610	0.567
16	4.000	2.000	1.425	0.060	0.211	0.487	0.321	0.640	0.564

注: N_a . 平均等位基因数; N_e . 有效等位基因数; H_o . 观测杂合度; H_e . 期望杂合度; F . 固定指数; I . Shannon's 多样性指数; H . Nei's 基因多样性指数; PIC. 多态性信息含量指数(表 5 同)。

序,从大到小依次为 SNJ>LN>SY>SZ>TB,SNJ 种群亦表现出最高的 N_a 、 N_e 、 A_R 、 P_A ,而 LN 种群表现出最大的 H_o 。以上研究结果能在一定程度上显示华

细辛不同种群的遗传多样性,但研究所采用的标记类型、取样方法和样本量^[24]等都会对遗传多样性评估的准确性产生影响。

表 5 华细辛遗传多样性分析

Table 5 Genetic diversity assessment of *Asarum sieboldii*

种群代码	PPL/%	N_a	N_e	A_R	P_A	I	H_o	H_e	F
TB	18.75	1.250	1.020	1.110	0.070	0.038	0.019	0.018	-0.049
LN	68.75	2.000	1.415	1.780	0.350	0.368	0.123	0.220	0.319
SZ	50.00	1.625	1.317	1.530	0.260	0.282	0.069	0.183	0.576
SY	56.25	1.750	1.301	1.530	0.170	0.262	0.027	0.164	0.575
SNJ	68.75	2.250	1.535	1.960	0.510	0.455	0.115	0.273	0.522

注: A_R . 等位基因丰富度; P_A . 私有等位基因丰富度; PPL. 多态位点百分率。

基于 150 个华细辛个体样本,对 SSR 位点进行 F -统计与基因流计算(表 6)。华细辛近交系数(F_{is})为-0.034~0.893,均值为 0.471,其中,位点 6 近交系数最大,杂合不足现象最为明显,只有位点 9 和 11 的近交系数(F_{is})小于 0,可能出现杂合子过剩现象。总体近交系数(F_{it})为 0.601~0.961,均值为 0.805;遗传分化系数(F_{ST})为 0.176~0.961,均值为 0.588;16 个位点计算得出的基因流(N_m)为 0.010~1.170,均值为 0.272。

分子方差分析(AMOVA)显示(表 7),华细辛的遗传变异主要发生在种群间(69%, $P<0.01$),31%发生在种群内,表明华细辛种群间有明显的异质化,种群分化程度大。Mantel test 经 999 次随机置换计算的结果显示,本实验选取的华细辛 5 个种群的遗传距离与地理距离具有相关性(图 1), $Y=0.093\ 1X-0.011\ 8$ ($R^2=0.376\ 9$, $P=0.01<0.05$)说明地理距离较近的种群,可能更具遗传相似性。根据主成分分析(PCoA)结果,绘制的二维坐标图(图 2)亦显示

表 6 16 个 SSR 位点的基因流和 F -统计量Table 6 Gene flow and F -statistics of 16 SSR loci

位点	F_{is}	F_{it}	F_{ST}	N_m
1	0.457	0.735	0.511	0.239
2	0.048	0.722	0.708	0.103
3	0.394	0.745	0.579	0.182
4	0.110	0.642	0.597	0.169
5	0.659	0.810	0.444	0.313
6	0.893	0.961	0.639	0.141
7	0.722	0.887	0.593	0.171
8	0.837	0.946	0.672	0.122
9	-0.034	0.957	0.959	0.011
10	0.850	0.940	0.598	0.168
11	-0.034	0.959	0.961	0.010
12	0.515	0.601	0.176	1.170
13	0.422	0.536	0.196	1.025
14	0.292	0.658	0.516	0.234
15	0.681	0.869	0.589	0.175
16	0.716	0.906	0.670	0.123

注: F_{is} ·近交系数; F_{it} ·总体近交系数; F_{ST} ·遗传分化系数; N_m ·基因流。

地理距离越近的华细辛样本间,遗传相似度越高,个体样本可基本按照地理来源被分为 5 大类。

表 7 华细辛种群的 AMOVA 分析

Table 7 AMOVA of *Asarum sieboldii* populations

变异来源	自由度 (df)	离均差平方和 (SS)	平均的离均差平方和 (MS)	变异组成 (Est. Var.)	变异占比/%
种群间	4	1 235.493	308.873	10.145	69
种群内	145	654.633	4.515	4.515	31

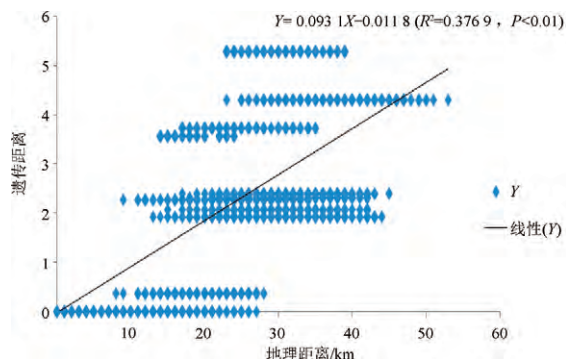


图 1 华细辛 5 个种群间地理距离与遗传距离相关性分析

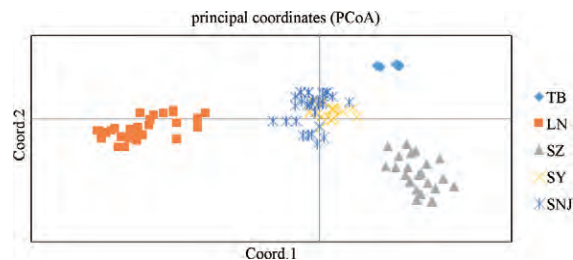
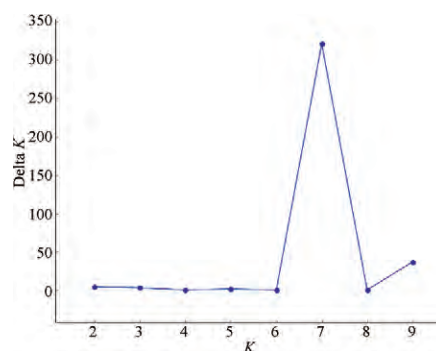
Fig.1 Correlation between genetic distance and geographical distance of 5 *Asarum sieboldii* populations

图 2 华细辛种群间成对遗传距离的二维散点图

Fig.2 Two-dimensional scatter point map of *Asarum sieboldii* based on populations' genetic distance

3.4 华细辛种群遗传结构

利用 Structure 2.3.4 软件对华细辛的 5 个种群进行遗传结构分析,根据 K 与 ΔK 折线图(图 3),当 $K=7$ 时,出现拐点,有明显的峰值,表明华细辛被分为 7 个亚群更为合适。 Q 分析结果显示(图 4),华细辛 150 个个体中有 130 个个体(占 86.7%)的 $Q \geq 0.6$,其遗传背景相对单一,遗传相似度较高;20 个个体(占 13.3%)的 $Q < 0.6$,遗传背景较为复杂,即 SY-2(92)、SY-3(93)、SY-5(95)、SY-12(102)、SY-13(103)、SY-15(105)、SY-19(109)、SY-21(111)、SY-22(112)、SY-24(114)、SY-26(116)、SY-29(119)、SNJ-1(121)、SNJ-3(123)、SNJ-6(126)、SNJ-11(131)、SNJ-14(134)、SNJ-21(141)、SNJ-22(142)、SNJ-26(146)。

图 3 K 与 ΔK 折线图Fig.3 Line graph of K value and ΔK

在 7 个亚群中,第 1 亚群(黄色标记)显示 TB 种群的遗传背景比较单一,具有非常高的纯合子比例,仅包含了少量的 SY 和 SNJ 种群的遗传信息;第 2 亚群(紫色标记)显示 LN 种群包含了另外 4 个种群的遗传信息;第 3 亚群(蓝色标记)显示 SZ 种群的遗传背景中包含有较多的 SY 种群的遗传信息;

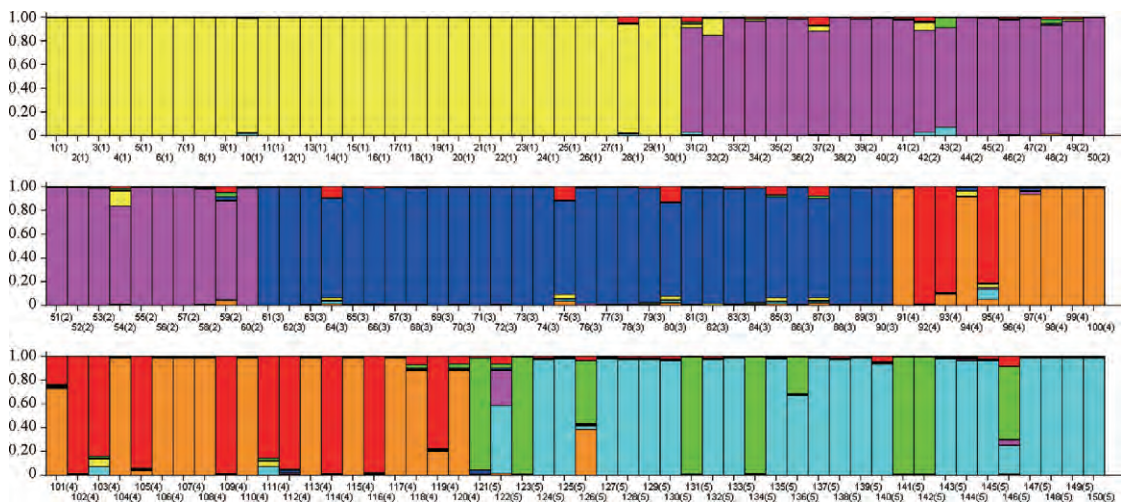


图 4 Structure 聚类分析($K=7$)
Fig.4 Structure clustering analysis($K=7$)

SY 种群和 SNJ 种群分别被分为 2 个亚群,第 4 亚群(橙色标记) 和第 5 亚群(红色标记) 均为 SY 种群,第 6 亚群(绿色标记) 和第 7 亚群(青色标记) 均为 SNJ 种群,表明 SY 种群和 SNJ 种群的遗传背景更为复杂,较其他 3 个种群有更丰富的遗传变异。

每个种群均有独立的遗传背景,又包含其他种群的遗传信息,这反映出物种与环境之间相互作用和适应的过程。华细辛在物种演进过程中,各种群因适应不同生长环境而不断产生和积累遗传变异,而封闭的生态环境和特殊的繁殖系统会导致一些特定的基因型受到自然选择而得到保留,甚至占主导地位。

利用 Popgene 1. 32 软件获得 5 个不同地理来源的华细辛种群间 Nei's 遗传一致性(GI) 和遗传距离(GD) 数据,结果显示(表 8) ,种群间的 Nei's 遗传一致性(GI) 为 0. 409 ~ 0. 833,均值为 0. 613,Nei's 遗传距离(GD) 为 0. 183 ~ 0. 895,均值为 0. 509,其中 SY 和 SNJ 种群间遗传距离最小($GD=0. 183$) ,相应的遗传一致性最大($GI=0. 833$) ,遗传背景较为相似,而 SZ 和 LN 种群间遗传距离最大($GD=0. 894$) ,相应的遗传一致性也最小($GI=0. 409$) 。

根据 Nei's 遗传距离对华细辛 5 个种群(图 5) 和 150 个体样本(图 6) 分别进行 UPGMA 聚类。分析结果显示,华细辛种群间的遗传距离与地理距离有一定相关性,5 个种群被分为 5 个分支,来自 TB 种群、LN 种群、SZ 种群的各 30 个个体各自聚为 1 支,而来自 SNJ 种群的 30 个个体被分聚在 2 支中,有 4 个 SNJ 个体样本与 SY 种群聚在一起。

表 8 华细辛 5 个种群间的 Nei's 遗传一致性和遗传距离
Table 8 Nei's genetic identity and genetic distance of *Asarum sieboldii* populations

种群编号	TB	LN	SZ	SY	SNJ
TB	—	0. 490	0. 591	0. 714	0. 667
LN	0. 713	—	0. 409	0. 597	0. 577
SZ	0. 525	0. 894	—	0. 663	0. 593
SY	0. 336	0. 516	0. 411	—	0. 833
SNJ	0. 405	0. 549	0. 523	0. 183	—

注: Nei's 遗传一致性(对角线上) 和遗传距离(对角线下) 。

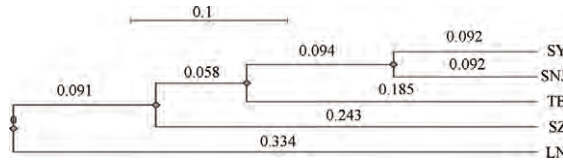


图 5 基于华细辛种群间的 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 聚类图

Fig.5 UPGMA dendrogram for populations of *A. sieboldii* based on Nei's genetic distance

4 讨论

4.1 转录组 SSR 标记在华细辛中的应用性

目前,有很多种开发 SSR 标记的方法,包括基因组文库构建法、磁珠富集法、近缘种引物筛选法和生物信息学分析法^[23]。相比于传统方法,基因组或转录组高通量检索 SSR 位点的生物信息学分析法,省时省力且成功率高,已成为主要的开发方法。其中,转录组开发 SSR 标记的方法在高效率、

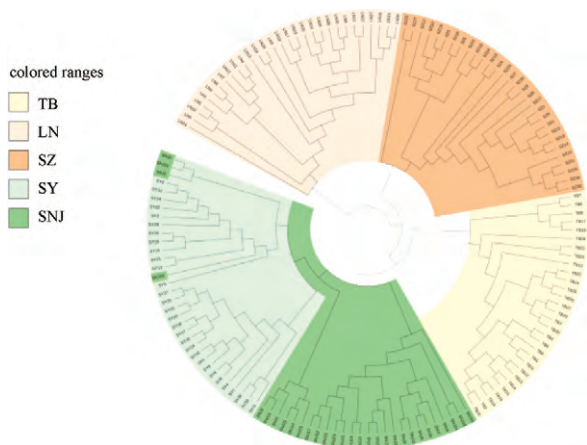


图6 基于华细辛个体间的 Nei's 遗传距离构建的 UPGMA 聚类

Fig.6 UPGMA dendrogram for individuals of *Asarum sieboldii* based on Nei's genetic distance

强转移性以及功能基因强关联性上更胜一筹,近年来备受青睐,如 LIU C Y 等^[24]成功从地黄转录组数据库中开发了 15 个 SSR 专属标记,为地黄的种群遗传学研究提供了有效工具; ZHAO Y 等^[27]首次使用转录组 SSR 标记来分析野生中华小长臂虾的遗传多样性和种群遗传结构;刘曼^[28]基于转录组数据开发了 17 个高多态性 SSR 标记,对 208 份重齿毛当归进行种质资源全面评估,并从 7 个核心种质中选出最佳种质。可见,基于转录组数据大规模开发 SSR 分子标记的方法已十分成熟^[29],并广泛应用于植物遗传多样性评估、亲缘关系鉴定、种质资源鉴定、重要性状基因定位、分子标记连锁图构建和种群遗传学等的研究^[30]。

本研究基于华细辛转录组数据成功开发 16 个 SSR 多态位点,并以 5 个种群为样本,开展了转录组 SSR 标记在华细辛中的应用性评价。研究结果初步显示,华细辛遗传多样性较为贫乏,种群内存在纯合子过剩情况,遗传变异更多地体现在种群间的遗传分化程度,该结果与刘忠等^[3]利用 AFLP 分子标记对采自庐山、西天目山、黄山等华细辛 9 个种群进行的遗传多样性研究结果相一致。另外,王志清等^[31]利用 ISSR 和 SRAP 分子标记相结合的方式,对北细辛和汉城细辛所进行的不同种质间的多态性分析,显示北细辛与汉城细辛遗传差异较小,并且同一产地不同种质个体间的遗传相似性大于同一种质不同产地个体间的遗传相似性,也与本研究结果一致。

以上均说明基于转录组开发的 SSR 标记在华细辛中具有良好的检测能力,可作为华细辛遗传多样性分析的有效工具。

4.2 华细辛遗传多样性分布式样及其形成机制

根据分析结果,华细辛遗传多样性较为贫乏,遗传变异主要体现在种群水平,同时,种群间的遗传分化程度与地理距离有相关性。华细辛的遗传多样性分布式样与溪黄草^[32]、裸芸香^[33]、明党参^[34]、白木香^[35]等类群的非常相似,它们都是在生境单一或片段化后,遭遇到种群内遗传漂变、瓶颈效应、自交或近交衰退等事件。因此,华细辛很可能也经历了类似的变化。

4.2.1 华细辛遗传多样性较为贫乏 华细辛生长对环境条件要求高,同时繁殖缓慢,种子传播力弱,导致其分布范围狭窄,种群规模小。因此,在遭遇生境破坏和滥采滥挖时,极易发生瓶颈效应、近交衰退、遗传漂变等变化,使得种群数量和规模急剧萎缩,资源锐减,遗传多样性趋于贫乏^[36-37]。研究结果进一步显示,华细辛的 Shannon's 多样性指数(H')为 0.276,平均期望杂合度(H_e)为 0.167,低于双子叶植物^[38]($H_e = 0.190$)、一般地表植物^[39]($H_e = 0.220$)、多年生长寿植物^[38]($H_e = 0.250$)的数据,华细辛遗传多样性处于较低水平。

在本研究选取的华细辛 5 个种群中,大部分种群的观测杂合度(H_o)明显小于期望杂合度(H_e),且固定指数(F)为正值,表明华细辛种群内存在杂合子缺失而纯合子过剩现象,可能发生过近交。从另一个方面来看,近交系数(F_{is})表示种群内个体间由于非随机交配而导致杂合度缺失状况,总体近交系数(F_{it})表示物种的杂合度缺失程度^[40](变化范围为 $-1 \sim 1$),华细辛的近交系数(F_{is})和总体近交系数(F_{it})均大于 0,表明华细辛在个体和种群水平上均存在杂合子缺失现象^[41],该现象除与可能存在无效基因和样本容量有关外^[42],还可能与种群退化、近交和人为干扰等因素造成的稀有碱基丢失有关^[43]。

4.2.2 华细辛种群间遗传分化程度大,且与地理分布相关 种群间遗传分化是物种与环境长期相互适应、协同进化的结果。遗传分化系数(F_{ST})是衡量种群遗传分化程度的一项指标^[44],根据 Wright(1978)对遗传分化系数(F_{ST})与遗传分化关系进行的解释,认为 F_{ST} 为 $0 \sim 0.05$ 时,遗传分化程度小; F_{ST} 为 $0.05 \sim 0.15$ 时,遗传分化程度中等; F_{ST} 为 $0.15 \sim 0.25$

时,遗传分化程度较大; F_{ST} 为 0.25 以上时,遗传分化程度很大。华细辛的遗传分化系数(F_{ST}) 为 0.588,表明种群间的遗传分化程度很大。分子方差分析(AMOVA) 结果亦表明华细辛种群间出现了显著的遗传分化,种群间的遗传变异程度(69%) 远大于种群内的遗传变异程度(31%)。同时,Structure、UPGMA 和 PCoA 等分析均能将华细辛个体样本按地理分布进行聚类,地理距离相近的华细辛种群,遗传距离也较小,表明华细辛遗传分化与地理分布能够很好地拟合。

基因流是影响种群间和种群内遗传变异程度的重要因素^[43],较小的基因流将会促进种群间的遗传分化^[44]。由遗传分化系数(F_{ST}) 估算出的基因流指数显示,华细辛种群间基因流($N_m = 0.272 < 1$) 水平较低,明显低于虫媒异交植物的基因流^[45]($N_m = 1.154$)、一般广布种植物的基因流($N_m = 1.881$)、一般风媒传粉植物的基因流^[46]($N_m = 5.240$),说明基因流不足以抵消种群内部的遗传漂变^[47],从而引起种群间各自分化。地理距离、繁育特性,以及人类活动等诸多因素可能共同阻碍了基因流^[54],促进华细辛种群间的遗传分化。

一定程度的地理距离是可降低种群间基因流的,如华木莲^[24]($I = 0.66$ 、 $H_e = 0.34$) 自然种群仅存于湖南省永顺县和江西省宜春市,两地间因地理距离过远而使遗传物质无法直接相互传递,有限的基因流($N_m = 0.323$) 引起华木莲种群间极大的遗传分化。本研究中,华细辛的样本来自 3 个不同省,具有较大的地理距离,推测华细辛($N_m = 0.272$) 种群间的遗传分化可能受到地理距离的影响。这种相关性在基因流缺乏的物种中体现得尤为明显,如四川省 6 个地区的延龄草^[51]($N_m = 0.400$),7 个野生种群间的遗传距离和地理距离有相关性(Mantel test: $r = 0.414$, $P = 0.040$); 采自江西、安徽和湖北三省的永瓣藤^[52]($N_m = 0.18$) 10 个种群的遗传距离和地理距离表现出显著相关性(Mantel test: $r = 0.420$, $P = 0.001$); 华东地区天女花^[53]($N_m = 0.340$) 种群间的遗传距离与地理距离亦有相关性(Mantel test: $r = 0.436$, $P = 0.020$)。

生境片段化亦会降低基因流的强度^[54]。如内蒙古西鄂尔多斯自然保护区的生境片段化是濒危植物半日花^[55]($N_m = 0.658$) 基因流较弱的主要原因,而相对低的基因流造成了半日花自然种群的遗传分

化; 新疆南疆绿洲的生境片段化使得胀果甘草^[56] 种群隔离分化,基因流(N_m) 为 0.439,种群间的分化程度大于种群内; 广西火桐^[57] 赖以生存的石灰岩地区呈岛屿状零星分布,致使其基因流(N_m) 水平仅为 0.183,种群间存在相当程度的遗传分化。本研究采集的华细辛样本来自陕西中南部至川渝鄂之间的秦岭-大巴山山区、武陵山脉、神农架自然保护区等,各大山脉地势起伏悬殊,土地类型多样,复杂的垂直气候变化使得华细辛的生境产生片段化^[37,58-59]。

植物的繁育特性也是制约基因流的关键因素,如黄花倒水莲^[60]($I = 0.250$ 、 $H_e = 0.164$ 、 $N_m = 0.319$) 主要生长在沟谷丛林边等阴湿处,但其种子极易发霉,自然状态下种子质量得不到保证,繁殖能力低下; 连香树^[61]($I = 0.173$ 、 $H_e = 0.116$ 、 $N_m = 0.527$) 的花粉只能进行短距离传播,种子的可食性较差且缺乏坚硬种皮的保护,动物的消化作用会导致种子的活力降低或丧失。相关研究亦表明,华细辛以自花传粉为主,未发现异花传粉现象,是一种以自交为主,兼有异交潜力的物种^[62]。雌性先熟并延迟自花传粉的机制不仅对华细辛有一定的繁殖保护作用,而且使其产生生殖隔离,极大地限制了华细辛种群间的基因交流。此外,细辛种子为短命种子,传播范围有限,动物远距离传播、风媒传播,以及人力携带传播均可能降低种子活力^[63]。因此,华细辛受花粉流与种子流的双重影响,较难在种群间传递遗传物质,导致华细辛种群间遗传分化。

5 结论

引物开发是 SSR 分子标记应用研究的必要前提和技术难点。本研究基于华细辛转录组数据,从 239 个 SSR 位点中成功筛选得到 16 个多态性位点,所设计引物能有效评价华细辛遗传多样性和种群遗传结构。结果表明,华细辛遗传多样性较为贫乏,遗传分化主要发生在种群间,阻碍华细辛种群间基因交流的原因可能包括地理距离、生境片段化、繁育系统障碍等因素。从本研究选取的华细辛 5 个种群来看,SNJ 种群的遗传多样性最丰富,TB 种群的遗传多样性最贫乏。研究结果不仅为华细辛转录组 SSR 标记的开发提供了可行性依据,也为华细辛的遗传多样性评价、遗传结构分析、种质资源保护、优质种源筛选、分子遗传育种等研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 吴征镒, 秦仁昌, 朱维明, 等. 中国植物志. 第 24 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 162.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 240.
- [3] 刘忠, 近藤直子, 徐瞰海, 等. 华细辛遗传多样性的初步分析 [J]. 中国科技论文在线, 2007, 2(11): 808.
- [4] 赵容, 许亮, 谢明, 等. 细辛的本草考证 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(11): 155.
- [5] 古一帆, 刘忠, 何明, 等. 华细辛中药有效成分与土壤理化性质的相关性研究 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(4): 361.
- [6] MOUGEL C, THIOULOUSE J, PERRIERE G, et al. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP [J]. Int J Syst Evol Micr, 2002, 52(2): 573.
- [7] 唐荣华, 张君诚, 吴为人. SSR 分子标记的开发技术研究进展 [J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 106.
- [8] 杨碧穗, 黄秋连, 谢璐欣, 等. 葛根分子生物学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2149.
- [9] 田星, 李中羿, 刘小莉, 等. 基于 SSR 分子标记的灯盏花遗传多样性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 136.
- [10] 李文秀, 李进良, 贺军军, 等. 基于 SSR 标记的砂仁种质资源遗传多样性与群体结构分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4618.
- [11] 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.
- [12] 乔萍, 汪奕衡, 孙嘉惠, 等. 基于 SSR 的人参果色种质资源遗传多样性评估 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2158.
- [13] 樊文强, 盖红梅, 孙鑫, 等. SSR 数据格式转换软件 DataFormatter [J]. 分子植物育种, 2016, 14(1): 265.
- [14] COOMBS J A, LETCHER B H, NISLOW K H. Create: a software to create input files from diploid genotypic data for genetic software programs [J]. Mol Ecol Resour, 2008, 8(3): 578.
- [15] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update [J]. Bioinformatics, 2012, 28(19): 2537.
- [16] YEH F C, BOYLE T. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belg J Bot, 1997, 129(2): 157.
- [17] LIU K, MUSE S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128.
- [18] KALINOWSKI S T. Hp-Rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness [J]. Mol Ecol Notes, 2010, 5(1): 187.
- [19] 孙艺琦, 赵露颖, 朱波, 等. 基于 SSR 分子标记的蔓荆子基原植物的遗传多样性及遗传结构分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(15): 3824.
- [20] ROHLF F J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYSpc), version 2.1 [M]. New York: Exeter Publication Ltd Setauket, 2000.
- [21] FALUSH D, STEPHEN M, PRITCHARD J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies [J]. Genetics, 2003, 164(4): 1567.
- [22] 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.
- [23] 石海霞, 肖承鸿, 周涛, 等. 地黄不同种质的遗传多样性和质量分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4210.
- [24] 刘亚林. 濒危植物华木莲(木兰科)的小尺度空间遗传结构研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2022.
- [25] 夏峰梅. 基于转录组信息的玫瑰 SSR 标记开发及野生玫瑰遗传多样性分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [26] LIU C Y, YUAN C, LI X T, et al. Development of microsatellites from *Rehmannia glutinosa* transcriptome and evaluation of genetic diversity among *Rehmannia* species [J]. Biochem Syst Ecol, 2015, 59: 177.
- [27] ZHAO Y, ZHU X, LI Z, et al. Genetic diversity and structure of Chinese grass shrimp, *Palaemonetes sinensis*, inferred from transcriptome-derived microsatellite markers [J]. BMC Genet, 2019, 20(1): 75.
- [28] 刘曼. 资丘独活的核心种质库构建 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [29] 肖韵铮, 韩世明, 秦昭, 等. 滇黄精转录组测序及类黄酮合成相关基因的分析 [J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(6): 931.
- [30] 杨梦婷, 黄洲, 干建平, 等. SSR 分子标记的研究进展 [J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2019, 18(4): 429.
- [31] 王志清, 刘继永, 李昌禹, 等. 利用 ISSR 和 SRAP 标记分析细辛资源遗传多样性与亲缘关系 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 1035.
- [32] 孟爽爽. 溪黄草药材种质资源遗传多样性分析及 SCAR 标记的开发 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [33] 杨佳, 李晓东, 李新伟, 等. 华中特有珍稀植物裸芸香的 AFLP 遗传多样性分析 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 226.
- [34] 邱英雄, 黄爱军, 傅承新. 明党参的遗传多样性研究 [J]. 植物分类学报, 2000, 38(2): 111.
- [35] 林丹. 白木香遗传多样性分析及核心种质的初步构建 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [36] 周长征, 杨春澍, 王中仁. 细辛类药材主要种质资源植物遗传多样性及生物系统学研究 [J]. 中药研究与信息, 2000(1): 19.
- [37] 顾蔚, 王喆之. 华细辛种质资源保护的研究 [J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2006, 34(1): 81.

- [38] NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Mol Ecol, 2004, 13(5): 1143.
- [39] HAMRICK J L, GODT M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species [J]. Philos T R Soc B, 1996, 351(1345): 1291.
- [40] 朱田田, 张明惠, 王富胜, 等. 基于 SSR 荧光标记的不同品种(系)当归遗传关系分析及分子身份证构建 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3774.
- [41] NAGYLAKI T. Fixation indices in subdivided populations [J]. Genetics, 1998, 148(3): 1325.
- [42] 董颖, 杨瑞, 姜志强, 等. 微卫星标记在人工养殖小体鲟种群的数据分析方法比较和遗传多样性分析 [J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(5): 516.
- [43] 王蕾, 张立冬, 万玉美, 等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析 [J]. 遗传, 2010, 32(10): 1057.
- [44] 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.
- [45] 苏金源, 燕语, 李冲, 等. 通过遗传多样性探讨极小种群野生植物的致濒机理及保护策略: 以裸子植物为例 [J]. 生物多样性, 2020, 28(3): 376.
- [46] 辛静, 高丽云, 徐剑, 等. 基于 SSR 标记的紫溪山华山松种子园无性系遗传多样性分析 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021, 36(5): 898.
- [47] 赵敏, 戎郁萍. 扁蓿豆 24 个居群遗传多样性的 SSR 研究 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(12): 2405.
- [48] KARNOSKY D F, BROWN A, CLEGG M T, et al. Plant population genetics, breeding, and genetic resources [J]. Biosci J, 1990, 41(1): 613.
- [49] 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.
- [50] ESSID A, ALJANE F, NEILY M H, et al. Assessment of genetic diversity of thirty Tunisian fig (*Ficus carica* L.) accessions using pomological traits and SSR markers [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(1): 335.
- [51] 李群, 肖猛, 郭亮, 等. 四川省珍稀濒危植物延龄草遗传多样性分析 [J]. 北京林业大学学报, 2005, 4(1): 1.
- [52] 谢国文, 彭晓瑜, 郑燕玲, 等. 濒危植物永瓣藤遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 林业科学, 2007, 43(8): 48.
- [53] 徐延年, 邵剑文. 华东地区两种植被带内天女花的遗传结构 [J]. 生态学报, 2017, 37(7): 2253.
- [54] 李霖, 李伟. 生境片段化对生物多样性的影响 [J]. 南京晓庄学院学报, 2000, 16(4): 32.
- [55] 魏磊, 乌兰巴特尔, 包会嘎, 等. 濒危植物鄂尔多斯半日花 (*Helianthemum ordosicum*) 遗传多样性和遗传结构的 ISSR 分析 [J]. 南昌: 中国植物学会第十五届会员代表大会暨八十周年学术年会, 2013.
- [56] 王莉莉, 阿力木江·排尔哈提, 李莉伟, 等. 新疆胀果甘草遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6975.
- [57] 骆文华, 代文娟, 刘建, 等. 广西火桐自然种群和迁地保护种群的遗传多样性比较 [J]. 中南林业科技大学学报, 2015, 35(2): 66.
- [58] 张芳芳. 神农架地区巴山冷杉树轮 $\delta^{18}\text{O}$ 、 δD 所记录的大气环流及海温信息 [J]. 武汉: 武汉大学, 2018.
- [59] 朱佳运, 熊康宁, 容丽, 等. 梵净山世界自然遗产提名地裸子植物区系与地理分布分析 [J]. 贵州科学, 2017, 35(4): 9.
- [60] 史艳财, 邹蓉, 韦记青, 等. 黄花倒水莲种子萌发特性研究 [J]. 北方园艺, 2013, 9(19): 159.
- [61] 袁丽洁, 方向民, 崔波, 等. 濒危植物连香树的传粉生物学研究 [J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(6): 647.
- [62] 林懋怡, 郑柳, 刘晋杰, 等. 华细辛苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 38.
- [63] 王勇, 高永强. 华细辛自发自交传粉机制研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(33): 20351.

责任编辑 吕冬梅