

青钱柳种质资源 SCoT 分子标记遗传多样性分析*

田 慧, 陈宏夏, 黄 勇, 封 毅, 曾昭清, 梁 雪, 叶盛连, 潘小姣**

(广西中医药大学药学院 南宁 530200)

摘要:目的 采用 SCoT 分子标记技术评价青钱柳的遗传多样性。方法 采集广西、湖南、湖北、江西、安徽和贵州 6 省 22 个居群共 176 份样本, 对不同居群青钱柳的遗传多样性进行研究。结果 筛选出了 5 条引物, 并对 176 个样品进行 PCR 扩增, 扩增出总条带数 69 条, 其中多态性条带数 69 条, 多态性百分比 (PPB) 为 100%。有效等位基因 (Ne) 为 1.4912, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.3017, Shannon's 信息指数 (I) 为 0.4662, 种质间基因分化系数 (Gst) 为 0.3742, 基因流 (Nm) 为 0.8362。NTSYS 聚类分析结果表明, 地域和种质是影响青钱柳样品间遗传相似度的重要因素, 同一种质、同一地域的样品亲缘关系更为接近。结论 不同的青钱柳居群遗传多样性丰富, 其中广西桂林全州县野生和广西柳州三江县栽培的遗传多样性最高, 具有很高的进化潜力。地域和种质 (野生或栽培) 是影响青钱柳各居群间亲缘关系的重要因素, 除此之外, 还有海拔、土壤、气候、水质、光照、甚至微生物等因素互相叠加, 共同对青钱柳产生影响, 从而造成青钱柳种质资源的遗传多样性复杂多样。该结果为青钱柳良种选育及质量评价提供科学依据。

关键词: 青钱柳 种质资源 SCoT 遗传多样性

doi: 10.11842/wst.20220113007 中图分类号: Q949-6 文献标识码: A

青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. 系胡桃科青钱柳属植物, 是中国特有的珍稀植物资源。主要分布于广西、江西、湖南、湖北、安徽、四川、贵州等省份, 分布较广。因青钱柳在降糖、降压、降脂、增强免疫、抗癌等方面确切的功效, 现已成为了国内外研究的热点。已有研究显示, 不同产区、不同品种青钱柳药材主要化学成分种类及含量均存在一定差异^[1-3], 且存在引种混乱、栽培方式不统一的问题, 导致市场上青钱柳产品、主要产区的药材质量良莠不齐, 在一定程度上影响了其疗效。其原因, 可能与地域环境、气候因素以及青钱柳种质的遗传变异有关。

种质资源 (germplasm resources), 一般指亲代传给子代的遗传物质, 在不同的生态条件下, 经过长时间的基础演变而来, 作为人类繁衍生存和发展的物质基础, 它也被称为遗传资源或基因资源^[4]。中药的种质

资源研究一般从农艺性状、化学成分、生物效应、遗传学特性和生态环境等方面入手^[5-7], 从 DNA 分子水平分析其遗传结构、化学成分的变化, 选出优质的种质, 可作为药材品种选育的物质基础。近年来 DNA 分子标记已为研究药用植物种质资源广受关注的新技术之一^[8-9]。

青钱柳的研究涉及范围广, 包括林学、中药与方剂、食品、化学、药学、农业经济等, 其中以林学的研究居多, 中药与方剂也是青钱柳的研究热点^[10], 青钱柳在中药领域方面的研究可追溯到上世纪 90 年代, 冷任轩^[11]通过临床观察, 发现青钱柳有治疗糖尿病、高血压和神经衰弱的作用, 经过多年的研究, 目前青钱柳的研究主要集中在化学成分、药用价值、人工栽培、组织培养、次生代谢等方面^[12-13]。而分子生药学方面的研究很少, 不够系统和深入, 所用手段也比较陈旧, 主要

收稿日期: 2022-01-13

修回日期: 2022-06-09

* 广西中医药大学一流学科建设项目 (2018XK031): 广西不同居群青钱柳的 DNA 条形码研究; 中国中医科学院中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目” (2060302): 巴戟天“紫肉”与“优质”形成的分子机制, 负责人: 田慧。

** 通讯作者: 潘小姣, 教授, 研究生导师, 主要研究方向: 药物分析研究。

是从林学的角度对青钱柳群落结构、遗传分化等进行了研究^[14-18]。通过查阅文献可知,种质资源研究对于优良品种选育、育种及对质量的提高具有影响,种质与质量、功效等存在一定的相关性。现发现针对青钱柳的种质资源的研究较少。种质资源遗传多样性的研究方法主要有形态标记、细胞标记、生理生化标记、分子标记。目前,在种质资源分子标记方面的研究有几种常用的方法,例如 ISSR (Inter-simple sequence repeat)、SSR (simple sequence repeat)、SCoT (start codon targeted polymorphism)、SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) 等,其中目标起始密码子多态性 (SCoT, start codon targeted polymorphism) 分子标记是一种是基于 PCR 扩增的二代分子标记技术,该分子标记技术的扩增引物为单引物,其原理是依据起始密码子 ATG 侧翼序列具有保守性和一致性,来设计引物,从而进行基因扩增,产生偏向候选功能基因区显性多态性标记。SCoT 分子标记均具有操作简单、引物设计简单, DNA 质量要求低、用量少,灵敏度高,多态性高、遗传信息丰富、成本低廉、引物通用性强等优点。目前该种分子标记已在椴子、重楼、金线莲、地黄、血叶兰等的研究中得到了应用^[19-22]。本论文采用 SCoT 技术对不同居群青钱柳的遗传多样性进行分析,为指导青钱柳种质资源合理利用,揭示其亲缘关系,辅助杂交育种等提供参考依据。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

所用青钱柳分别采集于广西(桂林、来宾、南宁、百色、柳州)、江西(上饶、井冈山)、湖南(益阳、张家界、常德)、湖北(宜昌)、安徽(池州)和贵州(贵阳、黔东南)6省22个种源共176份样本,因青钱柳是落叶乔木,冬天叶子掉落,到第二年五月份长出嫩叶,最佳采集样品时间定在2020年5月,采集地海拔64-1182 m,样品经过相应处理后置于密封袋中,于-20℃保存。样品信息见表1。

青钱柳经广西中医药大学药用植物教研室梁子宁教授鉴定为胡桃科青钱柳属青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk.

1.2 实验仪器与试剂

梯度 PCR 仪 (Bio-Rad, T100), 凝胶成像仪 (Bio-Rad DOC, XR+) 新型植物试剂盒 (天根生化科技有限

表1 不同居群青钱柳样品信息表

居群编号	样品来源	样本编号	备注
1	广西桂林龙胜县	1-20	栽培,5年
2	广西桂林龙胜县	21-22	野生
3	广西桂林全州县	23-32	栽培,4年
4	广西桂林全州县	33-37	野生
5	广西来宾金秀县大瑶山	38-40	野生
6	广西来宾金秀县长垌乡	41-43	野生
7	广西南宁青秀区	44-47	栽培,4年
8	广西凌云县	48-61	栽培,6年
9	广西三江县	62-72	栽培,10年
10	江西上饶市广信区	73-74	野生
11	江西上饶市广信区	75-80	栽培,5年
12	江西井冈山拿山镇	81-89	栽培,6年
13	江西井冈山拿山镇	90-99	野生
14	湖南益阳资阳区	100-108	栽培,5年
15	湖南张家界桑植县	109-127	栽培,4年
16	湖南常德石门县	128-132	栽培,4年
17	湖北宜昌五峰县	133-141	栽培,4年
18	湖北宜昌五峰县	142-148	野生
19	安徽池州石台县	149-158	栽培,5年
20	安徽池州石台县	159-163	野生
21	贵州贵阳花溪区	164-171	栽培,4年
22	贵州黔东南	172-176	栽培,5年

公司),双向电泳仪(北京六一生化DYY-6C),GelRed核酸凝胶染料(Biotium),5×TBE buffer(国拓生物)DM2000(康为世纪),2×ES Taq Master MIX(康为世纪)。

2 方法

2.1 总DNA提取及检测

根据试剂盒操作步骤对青钱柳嫩叶进行总DNA的提取,并采用1%琼脂糖电泳检测DNA质量;超微量核酸测定仪检测提取得到的总DNA纯度及其浓度,并将其稀释到浓度为20 ng·μL⁻¹,保存于-20℃冰箱备用。

2.2 引物筛选

SCoT引物参照Mackill等^[23]开发的36条通用引物及18条自设引物,由上海生工生物有限公司合成。用176份青钱柳样品对54条SCoT引物进行PCR扩增及引物筛选,对产物进行检测,实验结果筛选出了5条带清晰、明亮、且条带数多及多态性好的引物。名称和序列见表2。

2.3 PCR扩增与产物检测

反应体系 20 μL: 10.0 μL 2×Es Taq PCR Master Mix; 0.5 μL 引物; 1.5 μL 模板 DNA; 8.0 μL ddH₂O。扩增程序为: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 45 s, 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 34 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。取 7 μL 的 PCR 产物置于 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 将电压设置为 100 V, 电泳为 60 min, 用 DNA Marker (DNA 分子标记) 作为标准参照。电泳结束后, 在紫外凝胶成像仪中观察并拍照保存。

2.4 数据与统计

SCoT 作为显性标记, 同一引物扩增出来的 PCR 产物, 在凝胶图上, 将电泳迁移率一致的条带认为是同一点点的产物。对凝胶电泳图进行分析, 同一位点有相同的扩增条带记为“1”, 无则记为“0”, 从而建立了

表2 SCoT引物扩增结果表

引物名称	引物序列
S5	CAACAATGGCTACCACGA
S10	CAACAATGGCTACCAGCC
S17	ACCATGGCTACCACCGAG
S37	CAACAATGGCTACCAGCT
S44	ACCATGGCTACCACCGAT

表3 各引物扩增结果与遗传多样性统计表

引物	等位基因数 (Na)	有效等位基因 (Ne)	Nei's 基因多样性指数 (H)	Shannon's 信息指数 (I)	TNB (总扩增条带/条)	NPB (多态性条带/条)	PPB (多态性比率/%)
S5	1.518 1	1.2651	0.1621	0.2494	17	17	100.00
S10	1.5346	1.3713	0.2060	0.3011	10	10	100.00
S17	1.5237	1.2827	0.1688	0.2571	13	13	100.00
S37	1.5237	1.2827	0.1688	0.2571	13	13	100.00
S44	1.5385	1.2926	0.1747	0.2657	16	16	100.00

“1”、“0”矩阵表。利用 POPGENE 软件对“1”、“0”矩阵表进行数据处理和分析: 有效等位基因、等位基因数、Shannon's 信息指数、Nei's 基因多样性指数等参数, 居群内基因多样性 (Hs)、居群总基因多样性 (Ht)、居群间遗传分化系数 (Gst) 以及基因流 (Nm) 等遗传分化指标。利用 NTSYS2.10 软件做聚类分析。

3 结果与分析

3.1 扩增产物的多态性

采用筛选得到的 5 条引物对 176 份青钱柳样品进行 PCR 扩增, 以下图 1 为筛选出的 5 条引物中 S44 PCR 部分扩增图, 表 3 为扩增结果表, 结果显示, 筛选出的 5 条引物总共扩增出了 69 条条带, 其中多态性条带为 69 条, 多态性百分比 (PPB) 为 100%。

3.2 不同居群的样品遗传多样性分析

本实验所得的遗传多样性分析的具体结果及数据见下表 4。遗传多样性的相关指数主要是反映基因的多样性以及基因的分化程度, 当 I 和 H 数值越大时, 说明该样品的遗传多样性水平就越高。其中 Shannon 信息指数 (I) 则是主要用来评价物种居群内和居群间的遗传多样性的高低, 当 I 指数越大, 表明该物种的居

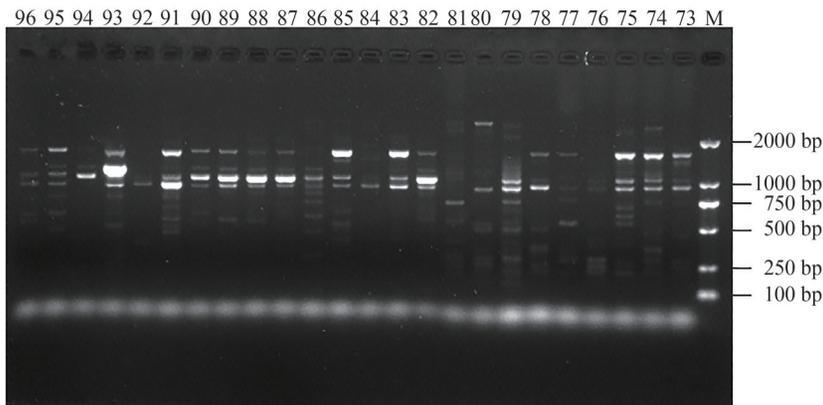


图1 SCoT引物S44对部分样品扩增结果图

注: M: D2000 Marker; 从右至左依次为样品 73-96。

群遗传多样性越高。由整体样本的物种水平可知,青钱柳的Na值为2.000,Ne值为1.4816,H值为0.2975,I值为0.4612。此数据说明青钱柳样品的整体遗传多样性水平非常高。其中居群4来自广西桂林全州县大西江镇野生种,其I值和H值最大,分别为0.4030和0.2636,其次为居群1、居群17、居群15、居群14,居群4的遗传多样性最高,可以作为青钱柳种质的保存和品种选育备选对象。

3.3 种质的遗传分化

遗传分化分析数据具体结果见表5,种质的基因多样性可分解为种质内基因多样性(Hs)和种质间基因多样性(Dst)。其中青钱柳居群总基因多样性为0.2972,居群内基因多样性为0.1860,居群间遗传分化系数为0.3742。其中Gst>Hs,说明居群间遗传分化度

比居群内遗传分化度更高。基因流为0.8362,说明居群间遗传分化水平较高,不同产地居群间基因交流较频繁,并且具有一定的遗传分化。

3.4 相似度与遗传距离的分析

对不同居群的青钱柳进行遗传距离和相似度分析,青钱柳的遗传相似度和遗传距离见表6。由表中数据可知,不同居群的青钱柳其遗传相似度在0.6469-0.9681,平均为0.8596,遗传距离在0.0324-0.4355,平均为0.1539。从相似度分析看,居群9和居群4的青钱柳遗传相似度为0.9681,遗传相似度最高,说明两者的亲缘关系最近。其次为居群13和居群9的遗传相似度为0.9651、居群8和居群11的遗传相似度为0.9572、居群13和居群19遗传相似度为0.9515,居群22和居群2的青钱柳遗传相似度为0.6469,遗传

表4 22个居群遗传多样性统计表

居群编号	样品来源	样本编号	等位基因数 (Na)	有效等位基因 (Ne)	Nei's 基因多样性指数 (H)	Shannon's 信息指数 (I)	NPB (多态性条带/条)	PPB (多态性比/%)
1	广西桂林龙胜县栽培	1-20	1.9130	1.4036	0.2510	0.3925	63	91.30
2	广西桂林龙胜县野生	21-22	1.2464	1.1742	0.1021	0.149	17	27.64
3	广西桂林全州县栽培	23-32	1.5652	1.3402	0.1963	0.2945	39	56.52
4	广西桂林全州县野生	33-37	1.8406	1.4393	0.2636	0.4030	58	84.06
5	广西来宾金秀县大瑶山野生	38-40	1.4348	1.2850	0.1658	0.2458	30	43.48
6	广西来宾金秀县长垌野生	41-43	1.3043	1.1988	0.1158	0.1717	21	30.43
7	广西南宁青秀区栽培	44-47	1.4638	1.3261	0.1833	0.2683	32	46.38
8	广西百色凌云县栽培	48-61	1.7826	1.3762	0.2290	0.3536	54	78.26
9	广西柳州三江县栽培	62-72	1.7246	1.3219	0.2016	0.3160	50	72.46
10	江西上饶市广信区野生	73-74	1.1739	1.1230	0.0720	0.1052	12	17.39
11	江西上饶市广信区栽培	75-80	1.4783	1.2395	0.1442	0.2228	33	47.83
12	江西井冈山栽培	81-99	1.5942	1.2955	0.1763	0.2713	41	59.42
13	江西井冈山野生	90-99	1.7971	1.3734	0.2284	0.3553	55	79.71
14	湖南益阳资阳区栽培	100-108	1.7246	1.3832	0.2298	0.3509	50	72.46
15	湖南张家界桑植县栽培	109-127	1.7681	1.4160	0.2455	0.3720	53	76.81
16	湖南常德石门县栽培	128-132	1.5797	1.3203	0.1898	0.2888	40	57.97
17	湖北宜昌五峰县野生	133-141	1.7536	1.4247	0.2486	0.3750	52	75.36
18	湖北宜昌五峰县栽培	142-148	1.6087	1.3108	0.1902	0.2927	42	60.87
19	安徽池州石台县栽培	149-158	1.7536	1.3220	0.2067	0.3267	52	75.36
20	安徽池州石台县野生	159-163	1.4058	1.2670	0.1523	0.2252	28	40.58
21	贵州贵阳花溪区栽培	164-171	1.6377	1.3758	0.2162	0.3238	44	63.77
22	贵州黔东南栽培	172-176	1.2319	1.1440	0.0832	0.1243	16	23.19
	总计	176	2.000	1.4816	0.2975	0.4612	69	100.0

表5 遗传分化统计表

指标(index)	居群总基因多样性(Ht)	居群内基因多样性(Hs)	居群间遗传分化系数(Gst)	基因流(Nm)
平均(Mean)	0.2972	0.1860	0.3742	0.8362
标准差(St.Dev)	0.0189	0.0059		

表6 不同居群青钱柳遗传距离表

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	0.8702	0.8923	0.9137	0.8854	0.8649	0.8842	0.9498	0.9242	0.9248	0.9502
2	0.139	****	0.7441	0.7512	0.7551	0.7381	0.7075	0.8258	0.7601	0.8012	0.7815
3	0.114	0.2955	****	0.9284	0.8492	0.8633	0.8852	0.8988	0.9136	0.8649	0.878
4	0.0902	0.2861	0.0743	****	0.8701	0.8672	0.9453	0.94	0.9681	0.8617	0.9189
5	0.1217	0.2809	0.1635	0.1392	****	0.8459	0.8498	0.8692	0.8559	0.8515	0.8789
6	0.1451	0.3037	0.1469	0.1425	0.1673	****	0.8793	0.8996	0.8606	0.8669	0.885
7	0.1231	0.3461	0.122	0.0562	0.1628	0.1286	****	0.9122	0.9442	0.8575	0.9109
8	0.0516	0.1914	0.1067	0.0619	0.1402	0.1058	0.0919	****	0.9311	0.9268	0.9572
9	0.0788	0.2743	0.0904	0.0324	0.1556	0.1502	0.0574	0.0714	****	0.8657	0.924
10	0.0782	0.2216	0.1452	0.1488	0.1607	0.1428	0.1537	0.076	0.1442	****	0.9505
11	0.051	0.2465	0.1301	0.0845	0.1291	0.1222	0.0933	0.0437	0.079	0.0508	****
12	0.1123	0.2877	0.1415	0.1061	0.1873	0.1862	0.1332	0.1029	0.1197	0.1536	0.1058
13	0.0975	0.313	0.093	0.0403	0.1522	0.1638	0.0879	0.0724	0.0356	0.1616	0.0906
14	0.0592	0.2062	0.1129	0.1024	0.151	0.1383	0.1175	0.0632	0.0908	0.0852	0.0609
15	0.1449	0.3035	0.1916	0.0886	0.2129	0.1764	0.1179	0.125	0.0848	0.2402	0.1623
16	0.1772	0.3688	0.1017	0.0723	0.2374	0.1949	0.0983	0.1478	0.1024	0.2501	0.1839
17	0.1471	0.3182	0.14	0.0655	0.1956	0.2385	0.0977	0.1135	0.086	0.1869	0.1378
18	0.2102	0.3641	0.2074	0.1065	0.3077	0.271	0.122	0.1542	0.0967	0.2819	0.1972
19	0.1025	0.3274	0.0934	0.065	0.1598	0.1479	0.0798	0.0933	0.0545	0.1519	0.0993
20	0.16	0.3972	0.1426	0.1082	0.2356	0.2218	0.1932	0.1272	0.1328	0.1892	0.1531
21	0.1477	0.3093	0.1732	0.0755	0.218	0.2475	0.094	0.1129	0.0917	0.2472	0.1689
22	0.2291	0.4355	0.253	0.1807	0.2749	0.2663	0.305	0.2021	0.2261	0.2597	0.2263
编号	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	0.8938	0.9071	0.9425	0.8651	0.8376	0.8632	0.8104	0.9026	0.8522	0.8627	0.7953
2	0.75	0.7313	0.8136	0.7382	0.6915	0.7275	0.6948	0.7208	0.6722	0.7339	0.6469
3	0.868	0.9112	0.8933	0.8256	0.9033	0.8694	0.8127	0.9109	0.8671	0.841	0.7764
4	0.8994	0.9605	0.9027	0.9152	0.9302	0.9366	0.899	0.937	0.8975	0.9273	0.8347
5	0.8292	0.8588	0.8598	0.8082	0.7887	0.8223	0.7351	0.8523	0.7901	0.8041	0.7596
6	0.8301	0.8489	0.8708	0.8383	0.8229	0.7878	0.7626	0.8625	0.8011	0.7808	0.7662
7	0.8753	0.9158	0.8891	0.8888	0.9063	0.9069	0.8852	0.9233	0.8243	0.9102	0.7372
8	0.9022	0.9302	0.9388	0.8825	0.8626	0.8927	0.8571	0.9109	0.8806	0.8932	0.8171
9	0.8872	0.9651	0.9132	0.9187	0.9027	0.9176	0.9078	0.947	0.8756	0.9124	0.7976
10	0.8576	0.8508	0.9183	0.7864	0.7788	0.8295	0.7544	0.8591	0.8276	0.781	0.7713
11	0.8996	0.9134	0.9409	0.8501	0.832	0.8713	0.821	0.9055	0.858	0.8446	0.7975
12	****	0.9024	0.9424	0.8851	0.8505	0.8835	0.8676	0.8826	0.8897	0.8549	0.7956
13	0.1026	****	0.9089	0.8986	0.909	0.916	0.9022	0.9515	0.924	0.9137	0.832
14	0.0593	0.0955	****	0.8617	0.8279	0.8665	0.8378	0.9052	0.8564	0.8317	0.7982
15	0.122	0.1069	0.1488	****	0.8504	0.8943	0.8944	0.8746	0.8576	0.8863	0.7628
16	0.1619	0.0955	0.1889	0.162	****	0.8686	0.8532	0.8698	0.8591	0.8603	0.7778
17	0.1239	0.0877	0.1433	0.1117	0.1409	****	0.9365	0.8928	0.8766	0.934	0.7911
18	0.142	0.1029	0.177	0.1117	0.1588	0.0656	****	0.8813	0.8622	0.9113	0.7818
19	0.1248	0.0497	0.0996	0.134	0.1395	0.1133	0.1263	****	0.8871	0.9048	0.7941
20	0.1168	0.079	0.155	0.1536	0.1519	0.1317	0.1483	0.1198	****	0.836	0.8387
21	0.1568	0.0902	0.1843	0.1207	0.1505	0.0683	0.0929	0.1	0.1791	****	0.7557
22	0.2286	0.1839	0.2254	0.2707	0.2513	0.2343	0.2462	0.2305	0.1759	0.2801	****

注:Nei's 遗传相似度(在****上),Nei's 遗传距离(在****下)。

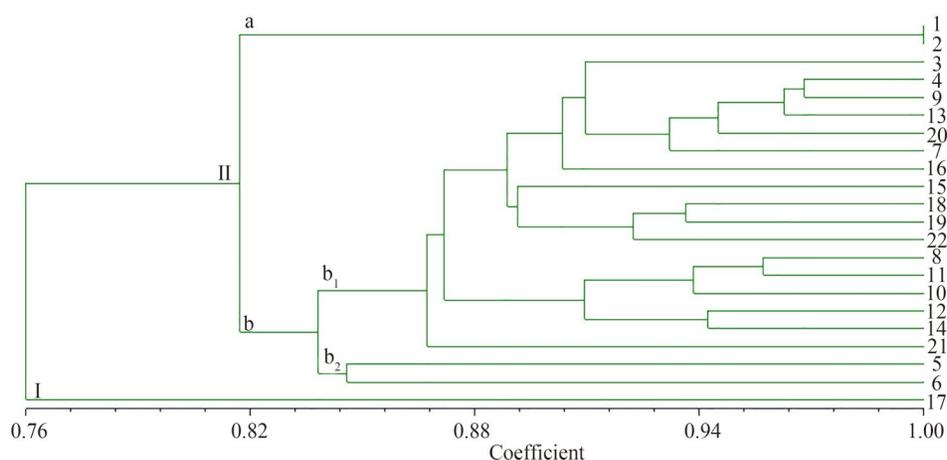


图2 不同居群青钱柳样品聚类图

相似度最低,说明两者的亲缘关系最远。从遗传距离分析看,遗传距离越小,遗传相似度越高,与上述相似度分析相对应,居群4和居群9的青钱柳遗传距离为0.0324,遗传距离最小,居群2和居群22的青钱柳遗传距离为0.4355,遗传距离最大。

相似系数分布在0.9681~0.8596的不同居群青钱柳总数的58%,相似系数小于0.8596的占42%,说明来自不同居群的青钱柳样品遗传多样性较高。

3.5 NTSYS 聚类分析

由图2数据可知,不同居群青钱柳聚类分析如下:22个青钱柳样品的不同居群聚为2大类,第I类仅有1个居群17,第II类较为复杂,包括来自广西、湖南、湖北、贵州、安徽、江西6个省的居群。将第II类分为a和b两个亚类,a包括2个居群1,2;将b再分为 b_1 和 b_2 , b_2 在相似度为0.84处,居群5,6聚为一支; b_1 是不同居群混合而成。有的居群表现出不同程度的地域相关性,如来自龙胜县的居群1,2在相似度0.96水平、金秀县的居群5,6在相似度0.84水平各自聚为一支,全州县的居群3,4相邻,江西的居群10,11,12相邻,表明它们互相之间遗传距离较近。这些数据说明来自同一地域的青钱柳亲缘关系比较接近;有的居群虽然来自同一产地,但未聚在一起,究其原因有生长环境、种质不同造成的影响。

当相似度为0.95,居群8,11聚为一支;遗传相似度在0.94时,居群12,14聚为一支;当相似度为0.89,居群15,18,19,22;当遗传相似度在0.84时,居群5,6聚为一支;以上为来自各地的栽培居群,包括湖北五峰县、安徽石台县等地。以上数据表明各栽培居群在不同的相似度水平聚在一起,说明同是人工栽培的样

品之间遗传距离较近。居群4、9、13、20在相似度0.94水平聚为一支,居群4、13、20都是野生品,居群9虽然为三江栽培品,但它是野生种苗移植过来的,可能因此导致居群9与其它三个野生居群聚为一支。由此可见,同为野生居群或同为栽培居群的样品之间遗传相似度更高,亲缘关系更近。

从上述分析可知,影响不同居群青钱柳遗传多样性的原因较为复杂,不是单一的某个因素,而是多种因素的综合作用,其中比较重要的因素有地域、种质的影响,除此之外还有生长环境、海拔、气候等。

4 讨论

SCoT标记作为一种新型的基因分子标记,综合了ISSR和RAPD的优点,具有操作简单、DNA质量要求低、灵敏度高、多态性高、遗传信息丰富、引物通用性强等多种优点。广泛地应用于植物的遗传多样性、亲缘关系和遗传图谱分析等。

本研究采用SCoT分子标记方法对不同居群青钱柳样品进行遗传分析,从基因水平上揭示了不同居群青钱柳其种质资源的遗传差异。通过建立SCoT-PCR扩增体系,筛选出扩增效果好的5条引物,能满足本次的实验。扩增所得到的多态性条带多达69条,多态性百分比为100%,说明青钱柳居群具有非常高的遗传变异水平; N_e 为1.4816, H 为0.2975和 I 为0.4612,说明本实验的22个不同种源青钱柳样品具有非常丰富的遗传多样性,其中居群9和居群4的青钱柳遗传相似度为0.9681,遗传多样性最高,具有很高的进化潜力,从不同的野生和栽培青钱柳居群按遗传多样性水平分析,野生居群以居群2最高,其次是居群4,最低的

为居群 10;栽培居群以居群 1 最高,其次是居群 15,最低的为居群 22。说明青钱柳这个物种通过产地的引种、迁移种植使得青钱柳的居群资源遗传多样性丰富。从基因交流值 N_m 值为 0.8362 可知,说明不同产地青钱柳的居群间基因交流较频繁,居群间具有一定的遗传分化,且遗传分化水平较高。

通过不同居群青钱柳样品的聚类分析得知,种质(野生或栽培)、地域是影响青钱柳各居群间亲缘关系的重要因素。同样的种质或来自同一地域的样品亲缘关系较近,常聚为一支。但是,也有不聚在一起的,

究其原因有:植物的生长环境是一个复杂的系统,包括海拔、土壤、气候、水质、光照、甚至微生物等因素,除地域和种质外,还有其他多种因素的影响,因此导致部分同样种质的样品或者同一地域的样品不能聚在一起。本文的实验结果还要结合后续的不同居群青钱柳成分分析、药效深入研究,对其质量进行探讨,从而找出优质的种质资源。

本研究为青钱柳种质资源的保护、良种繁育和栽培,揭示青钱柳居群间和居群内的遗传分化程度以及青钱柳药材的质量评价提供科学依据。

参考文献

- 1 朱贲峰,贺肇东,王政峰,等.不同产地青钱柳的总黄酮含量比较.海峡药学,2004,16(3):88-89.
- 2 杨万霞.不同种源青钱柳苗期生长及叶药用成分含量的差异性研究.南京:南京林业大学博士学位论文,2013.
- 3 章发盛,张学英.野生树和人工种植青钱柳叶黄酮类物质含量的比较分析.中国标准化,2018,20:161-164.
- 4 李晓春.基于 ISSR 和 SSR 标记的青钱柳天然群体结构及遗传多样性研究.南京:南京林业大学硕士学位论文,2017.
- 5 钱润,李慧,华中一,等.栽培天麻农艺性状的数量分类学研究.中国中药杂志,2020,45(13):3085-3090.
- 6 余文霞,雷胃熙,袁媛,等.铁皮石斛种质资源 DNA 身份证的构建及遗传相似性分析.中国实验方剂学杂志,2019,25(1):16-21.
- 7 朱凤洁,杨健,袁媛,等.金银花种质资源化学指纹图谱及代谢物相似性分析.中国中药杂志,2018,43(12):2575-2579.
- 8 家仕,李先民,黄展文,等.基于 SCoT 分子标记的金花茶组植物种质资源遗传多样性分析.中草药,2021,52(20):6357-6364.
- 9 姜雨昕,肖春萍,孙金,等.基于 ISSR 标记的北苍术种质资源亲缘关系分析.种子,2021,40(12):32-38.
- 10 陈淑慧,纵伟.基于文献计量学的青钱柳研究进展.安徽农学通报,2019,25(24):34-35.
- 11 冷任轩.青钱柳的基础理论研究和临床观察.江西中医药,1994,2:64-65.
- 12 张娟,王齐瑞.青钱柳的研究进展.河南林业科技,2021,41(2):14-16.
- 13 方升佐,洪香香.青钱柳资源培育与开发利用的研究进展.南京林业大学学报(自然科学版),2007,31(1):95-100.
- 14 陈秀娟,柏明娥,王丽玲,等.青钱柳种质资源亲缘关系的 ISSR 分析评价.中国林副特产,2016,4:6-10.
- 15 叶林江.江西三种森林植物遗传结构和进化热点初步研究.南昌:江西农业大学硕士学位论文,2015.
- 16 程珊梅.中国特有属植物青钱柳谱系地理学研究.南昌:江西农业大学硕士学位论文,2013.
- 17 周一昶,洪香香,尚旭岚,等.青钱柳种质资源多样性 SRAP 初步分析.基因组学与应用生物学,2011,30(1):40-46.
- 18 潘媛,陈大霞,宋旭红,等.基于 SCoT 标记的栽培栀子种质资源遗传多样性研究.中草药,2018,49(14):3376-3381.
- 19 程虎印,王艳,颜永刚,等.陕西产重楼属种质资源的 SCoT 遗传多样性分析.中草药,2019,50(16):3917-3922.
- 20 顾浩栋,吴梅,孔向军,等.基于 SCoT 标记的金线莲遗传多样性分析.分子植物育种,1-18 [2022-01-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210529.1622.006.html>
- 21 石海霞,肖承鸿,周涛,等.地黄种质资源的 SCoT 分子标记遗传多样性分析.中药材,2018,41(7):1577-1580.
- 22 郑涛,蔡坤秀,杨俊杰,等.基于 SCoT 标记血叶兰资源的亲缘关系分析.中草药,2020,51(15):4011-4018.
- 23 Mackill DJ, Septiningsih E, Pamplona, AM, et al. Marker assisted selection for submergence tolerance in rice. 分子植物育种,2007,5(2):207-208.

Genetic diversity of Germplasm Resource SCoT of *Cyclocarya paliurus* (batal.)

Iljinsk by molecular markers

Tian Hui, Chen Hongxia, Huang Yong, Feng Yi, Zeng Zhaoqing, Liang Xue, Ye Shenglian, Pan Xiaojiao

(Guangxi University of Chinese Medicine Nanning 530200)

Abstract: Objective To evaluate the genetic diversity of *Cyclocarya paliurus* (batal.) Iljinsk using SCoT molecular marker technology. Methods A total of 176 samples from 22 populations in 6 provinces of Guangxi, Hunan, Hubei, Jiangxi, Anhui and Guizhou were collected to study the genetic diversity of *Cyclocarya paliurus* in different populations. Results Five primers were screened out, and 176 samples were amplified by PCR. The total number of amplified bands was 69, including 69 polymorphic bands, and the percentage of polymorphism (PPB) was 100%. Effective allele (N_e) was 1.4912, Nei's gene diversity index (H) was 0.3017, Shannon's information index (I) was 0.4662, gene differentiation coefficient (G_{st}) between germplasm was 0.3742, and gene flow (N_m) was 0.8362. The results of NTSYS cluster analysis showed that the region and germplasm were important factors affecting the genetic similarity among the samples of *C. chinensis*, and the samples with the same germplasm and the same region were more closely related. Conclusion The different populations of *Cyclocarya paliurus* are rich in genetic diversity. Among them, Quanzhou County, Guilin, Guangxi, and Sanjiang County, Guangxi, have the highest genetic diversity and have high evolution potential. Region and germplasm (wild or cultivated) are important factors that affect the genetic relationship among the populations of *Cyclocarya paliurus*. In addition, factors such as altitude, soil, climate, water quality, light, and even microorganisms are superimposed on each other, which together have an impact on *Cyclocarya paliurus*, resulting in the complex and diverse genetic diversity of *Cyclocarya paliurus* germplasm resources. The results provide a scientific basis for the selection and quality evaluation of *Cyclocarya paliurus* varieties.

Keywords: *Cyclocarya paliurus*, Germplasm resources, Scot, Genetic diversity

(责任编辑: 周阿剑、李青, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)