

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2020.40525

吴丽新, 龚洵, 潘跃芝. 姜状三七遗传多样性和遗传分化研究[J]. 植物科学学报, 2020, 38(4): 525~535

Wu LX, Gong X, Pan YZ. Study on genetic diversity and differentiation of *Panax zingiberensis* C. Y. Wu et K. W. Feng[J]. *Plant Science Journal*, 2020, 38(4): 525~535

姜状三七遗传多样性和遗传分化研究

吴丽新^{1,2}, 龚洵¹, 潘跃芝^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所资源植物与生物技术重点实验室, 昆明 650201; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 利用 5 个 DNA 片段及 12 个微卫星标记 (SSR) 对姜状三七 (*Panax zingiberensis* C. Y. Wu et K. W. Feng) 的遗传多样性和遗传分化进行分析。结果显示, 与其他人参属 (*Panax*) 植物相比: 姜状三七具有相对较高物种水平的核苷酸多态性和等位基因数; 在居群水平上, 景谷居群具有最高的核苷酸多态性和等位基因数, 而江城居群最低。AMOVA 分析结果表明, 姜状三七在物种水平上具有一定程度的遗传分化, 但不显著; 在居群水平, 江城居群与其他居群间的分化程度最高, 其他居群间遗传分化不明显。Structure 分析结果也显示江城居群与其他居群被聚类到不同分组, 且形态特征相近的样本并未聚到一起, 同一分布点的样本遗传成分更相似。

关键词: 姜状三七; 遗传多样性; 遗传分化; SSR 标记; DNA 测序

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2020)04-0525-11

Study on genetic diversity and differentiation of *Panax zingiberensis* C. Y. Wu et K. W. Feng

Wu Li-Xin^{1,2}, Gong Xun¹, Pan Yue-Zhi^{1*}

(1. Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Panax zingiberensis* C. Y. Wu et K. W. Feng is a perennial herbaceous plant belonging to the genus *Panax* (Araliaceae). It is an endangered species mainly distributed in southeastern and southern Yunnan, China. Like other species of *Panax*, *P. zingiberensis* (otherwise known as “Yesanqi”) has high medicinal value and is used as a substitute of *P. notoginseng* by local people. In this study, the genetic diversity and genetic differentiation of *P. zingiberensis* was analyzed using data obtained from five DNA fragments and 12 microsatellite (SSR) markers. Results showed that the total nucleotide diversity of *P. zingiberensis* was just 0.00068 at the species level based on the combined analyses of four chloroplast fragments (*psbA-trnH*, *psbM-trnD*, *rps16*, and *trnL-trnF*), whereas the nucleotide diversity of nuclear ITS ($P_i = 0.01011$) was high. In the 12 polymorphic microsatellite loci, a total of 89 alleles were identified, and the average number of alleles per locus was 7.417. Compared to other *Panax* species, *P. zingiberensis* had a relatively high level of nucleotide diversity and number of alleles. At the population level, population JG had the highest nucleotide diversity and number of alleles, whereas population JC had the lowest. AMOVA indicated that genetic variation among populations (55.03%) in the cpDNA fragment was

收稿日期: 2019-10-25, 退修日期: 2019-12-26。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31570339)。

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (31570339).

作者简介: 吴丽新(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物资源评价(E-mail: 610858160@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: pan Yuezhi@mail.kib.ac.cn)。

greater than that within populations (44.97%). However, for the ITS fragment and SSR locus, genetic variation among populations (30.23% and 35.90%, respectively) was much lower than that within populations (69.77% and 64.10%, respectively). This indicated that *P. zingiberensis* had a certain degree of genetic differentiation at the species level, but it was not significant ($P = 0.01$ or 0.05). At the population level, based on genetic differentiation indices (F_{st}' , G_{st}' (Nei), and Rho) inferred from SSR data, population JC exhibited high differentiation from the other four populations, whereas no differentiation was observed among these populations. Structure analysis showed that JC and other populations were clustered into different genetic groups, respectively. Combined with phenotypic characteristics of the samples, structure analysis also showed that those individuals with similar morphological characteristics were not clustered together, whereas individuals of the same population had more similar genetic components. This study should help in the conservation of wild resources of *P. zingiberensis*.

Key words: *Panax zingiberensis*; Genetic diversity; Genetic differentiation; SSR markers; DNA sequencing

姜状三七 (*Panax zingiberensis* C. Y. Wu et K. W. Feng) 为五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax*) 多年生草本植物。与栽培三七 (*P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 纺锤状或胡萝卜状的根不同, 姜状三七肉质根增厚为非常典型的姜块状, 且其小叶无柄或近无柄^[1]。《中国植物志》^[2]、《云南植物志》^[3] 和 *Flora of China*^[4] 的记载信息和标本资料显示姜状三七主要分布于云南东南部及南部, 如马关、普洱、镇沅和江城等地, 分布范围十分狭窄。我们在野外调查中发现不同分布地点的一些样本形态上存在差异。如采自镇沅的植株样本一般比较高大, 块根呈现明显的姜块状, 但其小叶柄明显较长, 而有些样本则小叶柄短近无, 但其地下部分又不呈现典型的姜状。虽然其形态与植物志中描述有区别, 但前期的研究结果表明这些样本仍然属于姜状三七的范畴^[5]。与人参 (*P. ginseng* C. A. Meyer) 和三七一样, 姜状三七也具有非常高的药用价值, 因此有较好的开发前景^[6]。在民间, 姜状三七常被作为云南道地药材三七的替代品而加以利用。因此, 姜状三七不仅分布范围狭窄, 而且由于民众无节制的采挖, 其野生资源也已经非常的稀少。姜状三七物种水平上的核苷酸多态性比栽培三七和野生屏边三七 (*P. stipuleanatus* H T Tsai et K M Feng) 更高^[7]。

以往关于人参属植物遗传多样性的研究主要

采用等位酶^[8]、RAPD^[9]、ISSR^[10]、AFLP^[11] 和 DNA 片段测序^[12] 等技术手段进行分析。而 SSR 分子标记具有标记位点含量丰富、多态性高和共显性的特点, 且检测方法简单、模板 DNA 需要量少以及具有良好的稳定性和重复性等优势^[13], 因此近些年来采用 SSR 分子标记进行植物遗传多样性的研究也开展较多^[14]。自 2007 年以来, 人参、三七和西洋参 (*P. quinquefolius* L.) 的 SSR 引物被陆续开发^[15, 16], 他们被应用于人参属植物的遗传多样性研究中^[17]。为了更加全面地认识和了解姜状三七遗传多样性在不同居群间的分布情况, 以及不同居群间是否存在遗传分化, 本研究以分布于云南的姜状三七为材料, 采用叶绿体片段 (*psbA-trnH*、*psbM-trnD*、*rps16*、*trnL-trnF*)、核 ITS 数据及 SSR 分子标记数据对姜状三七的遗传多样性及其分布式样进行分析, 以期为该物种的资源保护以及后续开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以采自云南东南部的镇沅、景谷、马关和江城地区的 5 个居群共计 66 份姜状三七为材料 (表 1, 图 1)。材料涵盖其现有主要分布区, 其中来自马关的样本只有 2 株, 该地区姜状三七资源已十分稀少, 不易采集。姜状三七的两种形态详见图 2。

表1 姜状三七材料采集信息
Table 1 Sampling information on *Panax zingiberensis*

居群编号 Population ID	样本数 Sample number	采集地点 Sample site	经纬度 Altitude and longitude	样本编号 Sample ID	根/根茎类型 Root/Rootstock type	小叶 Leaflet
JC	15	普洱市江城县	22.586°N, 101.862°E	JC1~JC15	非典型姜块状	小叶无柄或近无柄
JG	22	普洱市景谷县	23.498°N, 100.703°E	JG1~JG3 JG4~JG22	非典型姜块状 非典型姜块状	小叶柄明显且长 小叶无柄或近无柄
MG	2	文山州马关县	23.016°N, 104.393 °E	MG1, MG2	非典型姜块状	小叶无柄或近无柄
X	19	普洱市景谷县	23.408°N, 100.663°E	X1、X2、X4、X9、 X15、X16	非典型姜块状	小叶无柄或近无柄
				X14	典型姜块状	小叶柄明显且长
				X3、X6、X7、X8、 X10、X11、X13、 X17、X18、X19	非典型姜块状	-
				X5 X12	典型姜块状 - 典型姜块状	- 小叶柄明显且长
ZY	8	普洱市镇沅县	24.007°N, 101.108°E	ZY1 ~ ZY5 ZY6 ~ ZY8	典型姜块状 非典型姜块状	小叶柄明显且长 小叶无柄或近无柄

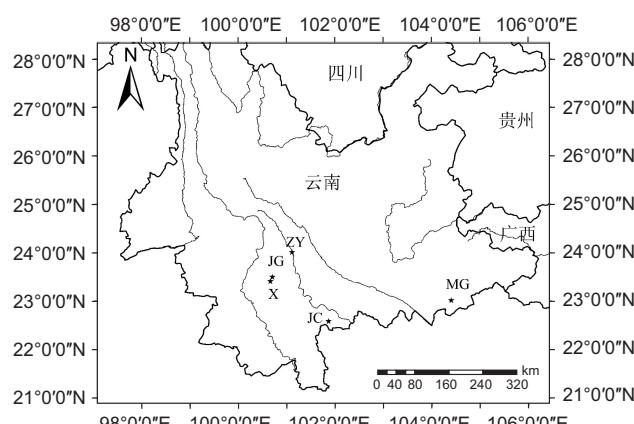
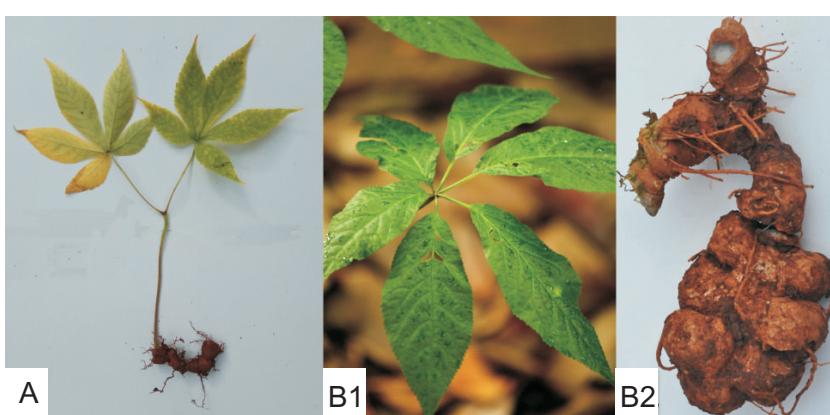


图1 姜状三七样本地理分布
Fig. 1 Location of samples of *Panax zingiberensis*



A: 小叶无柄或近无柄而根茎为非姜块状。B1: 小叶柄明显且长; B2: 根茎为典型的姜块状。
A: Sessile or subsessile leaflet and non-ginger rootstock. B1: Petiole 1.5 cm long; B2: Ginger-like rootstock.

图2 姜状三七的两种形态类型
Fig. 2 Two morphological types of *Panax zingiberensis*
© Plant Science Journal <http://www.plantscience.cn>

1.2 实验方法

1.2.1 总DNA的提取、分子标记的筛选及测序

采用改良的CTAB法^[18]提取姜状三七的DNA。依据Zhou等^[7]的方法对筛选出的4个叶绿体DNA片段(*psbA-trnH*、*psbM-trnD*、*rps16*和*trnL-trnF*)和核糖体ITS序列^[19]进行PCR扩增(表2)，扩增产物送公司测序。

从人参属其他物种开发的SSR引物中筛选出12个具有多态性的SSR位点^[15-17]用于本实验(表3)。PCR扩增反应的体系为：1 μL DNA模板，17.8 μL的双蒸水，2.5 μL 10 × PCR buffer, 2 μL MgCl₂, 0.5 μL dNTP, 正、反向引物各0.5 μL以及0.2 μL的Taq DNA聚合酶。扩增反应程序为：94℃预变性4 min, 94℃变性40 s, 57.8℃ ~

表2 引物序列及PCR信息表
Table 2 Information on primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'—3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	大小 Size (bp)
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA</i> : GTTATGCATGAACGTAATGCTC <i>trnH</i> : CGCGCATGGTGGATTCAAAATC	52	493
<i>psbM-trnD</i>	<i>psbM</i> : AGCAATAATGCRAGAATATTTACTCCAT <i>trnD</i> : GGGATTGTAGYTCATTGGT	52	1167
<i>rps16</i>	<i>rps16-F</i> : GTGGTAGAAAGCAACGTCGCACTT <i>rps16-R</i> : TGCGGATCGAACATCAATTGCAAC	52	821
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL</i> : CGAAATCGGTAGACGCTACG <i>trnF</i> : ATTGAACTGGTGACACGAG	53	907
ITS	F: GTTCTTTCCCTCCGCT R: AGGAGAAGTCGTAACAAAG	51	651

表3 用于姜状三七遗传多样性分析的12个微卫星引物及PCR信息
Table 3 SSR-information on 12 primers used for genetic diversity analysis of *Panax zingiberensis*

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'—3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	大小 Size (bp)
PG465	F: CATTAAATACAAACCCCTTCTTC R: TTGGGTGTAATGTAATAGCTCTG	60	114~135
PG628	F: CAGAATTACTGTGGAGGGAGGAG R: AGCAAAAGCACAAGCCACAGCC	62	119~137
PG770	F: CCTCTTGCGGGCAGGGATATTG R: CCAGCAAACCCAAACCCCTCCTC	60	300~315
PG946	F: GAATCGAAGTGTAAAGTTGAT R: CTTAAATCGATGATAACACC	56	281~299
RS12	F: CGCACAGTGAGGAAGAAGAA R: CCATAATCTCCGCTGTGGT	58	162~171
PG1335	F: AGAGACAAAGTGAAGCACCAACGG R: AATACGTGCATTCAAGGCAATCACG	58	184~190
PG1419	F: ACTCAAAATTCTACAGCTTCCTC R: GATACCCCAGGCAGTGTGATGAC	56	110~134
PG1481	F: GGAGGTGATTGATGTAGTGGAAATCC R: GGCTCTCCTATACTCACTATTCCC	58	97~124
RS25	F: AGAATCTGCTGTATTCGCCG R: AATAACGGGATCGGTAAAGGC	58	346~400
RS36	F: GGGCCGCACAGTGAGGAAGA R: GCCGGCTTCTGTGCGCT	64	220~229
XS3	F: TCCAGAGGGCGGAGGACGGTT R: GGCCACCGGGCAAGTCACAA	64	239~248
RS22	F: TACCTAATTGCCAGCGGTTC R: TGGGAAGTGGAGAGGATTG	58	248~260

63.95℃退火 25 s, 72℃延伸 30 s, 共 30 次循环; 最后 72℃延伸 10 min。然后采用 ABI3770 测序仪进行毛细管电泳, 利用 GeneMapper 软件读取扩增片段的大小。

1.2.2 数据分析

1.2.2.1 叶绿体 DNA 及 ITS 序列分析

采用 DNASTAR 软件包^[20]里的 SeqMan 进行序列编辑和拼接, 利用 BioEdit 软件^[21]进行多序列比对和手工调整排序。利用 PAUP* 4.0b10 软件将 4 个叶绿体序列进行片段联合分析。利用 DnaSP ver.5.0 软件里的 phase 进行 ITS 序列的简并碱基拆分并计算核苷酸多态性参数 P_i 值。采用 MrModeltest 2.3 软件^[22]进行进化模型的选择后利用贝叶斯分析法 (Bayesian inference, BI)^[23] 分别对 cpDNA 和核 ITS 片段构建系统树, 随后在 Figtree 软件中对产生的树进行查看与编辑。利用 Arlequin ver.3.0 软件中的 AMOVA (Analysis of molecular variance) 功能计算遗传变异在姜状三七居群内和居群间的分布情况。

1.2.2.2 微卫星数据分析

我们前期的流式细胞术分析结果表明, 来自不同分布点的姜状三七样本的基因组大小约为 3900 Mb; 而四倍体人参和西洋参的基因组大小分别为 3120 Mb^[24] 和 4910 Mb^[25]; 二倍体三七的基因组大小约为 2400 Mb^[26], 因此我们推断姜状三七为四倍体。本研究中 SSR 基因分型分析也证实了这个推测。

利用 GenoDive ver2.0 软件^[27] 分别计算居群的等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (A_e)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和总的杂合度 (H_t) 等遗传多样性指数, 统计遗传分化系数 F_{st}' 、 G_{st}' (Nei) 和 Rho 。 F_{st}' 为遗传分化系数 F_{st} 的相对值^[28]; G_{st}' (Nei) 为 G_{st} 的相对值, 在每个位点具有两个等位基因的情况下, G_{st} 和 F_{st} 的含义是相同的, 而当每个位点具有多个等位基因时, G_{st} 相当于加权的 F_{st} 平均值^[29]; Rho 则是不受物种倍性影响的遗传分化系数, 常用于估计多倍体遗传分化的选择统计量^[30]。同时, 利用此软件进行 AMOVA 分析。姜状三七 66 个样本的聚类分析采用软件 Structure ver.2.24 软件^[31] 进行分析, 聚类分组 K 值分别取 1 ~ 5, 每个 K 值运算 20 次。通过计算连续 K 值之间 $\ln P(D)$ 变化率 (ΔK) 来作折线图

选择最佳 K 值, ΔK 的计算在 Structure Harvester V0.6.8 软件^[32] 中执行。

2 结果与分析

2.1 DNA 序列及 SSR 位点特征

2.1.1 叶绿体片段序列特征

研究结果显示, 姜状三七 5 个居群 66 个样本的 *psbA-trnH* 基因间隔区的序列长度为 493 bp, 共检测到 2 个多态位点, 全为碱基颠换。经排序后 *psbM-trnD* 基因间隔区长度为 1167 bp, 共检测到 2 个多态位点, 其中 1 个位点是碱基颠换, 另 1 个为碱基置换。经排序后 *rps16* 基因间隔区长度为 821 bp, 共检测到有 5 个多态位点, 其中包含 3 个碱基颠换位点和 2 个插入/缺失位点。经排序后 *trnL-trnF* 基因间隔区的序列长度为 907 bp, 共检测到 4 个多态位点, 均为碱基颠换。在 4 个叶绿体片段中, *rps16* 的核苷酸多态性最高 ($P_i = 0.00121$), *psbA-trnH* ($P_i = 0.00063$)、*psbM-trnD* ($P_i = 0.00029$) 和 *trnL-trnF* ($P_i = 0.00073$) 相对较低。

2.1.2 核 ITS 序列特征

姜状三七 5 个居群 66 个样本的 ITS 序列长度为 651 bp, 共检测到 26 个多态位点, 其中有 3 个位点是插入/缺失, 有 3 个位点属于碱基置换, 还有 2 个位点是属于碱基颠换, 其余的 18 个含有简并碱基, 且核苷酸多态性 P_i 值为 0.01011。

2.1.3 SSR 分子标记位点

12 个微卫星位点在姜状三七中的遗传多样性分析共检测到 89 个等位基因(表 4), 等位基因数最高的是位点 PG1419, 含有 18 个等位基因数, 最低的位点 RS36 的等位基因数仅含有 2 个, 这 12 个 SSR 位点的平均等位基因数是 7.417。位点 PG1335 的观测杂合度和期望杂合度均为最低值, 分别是 $H_o = 0.011$ 和 $H_e = 0.023$; 位点 PG465 的观测杂合度为最高值 ($H_o = 0.941$), 而期望杂合度最高的位点是 PG1419。

2.2 遗传多样性分析

本研究将姜状三七每个样本的叶绿体片段进行联合分析, 发现联合后的序列总长度为 3388 bp, 共检测到 13 个具有多态性的位点。基于这个数据矩阵, 姜状三七在物种水平上的总的核苷酸多态性指数 ($P_i = 0.00068$)。在居群水平上, 居群

ZY($P_i = 0.00135$)和MG($P_i = 0.00118$)具有高的核苷酸多样性,其次是居群JG($P_i = 0.00044$),居群X($P_i = 0.00015$),而居群JC的核苷酸多样性最低($P_i = 0$)。

基于核ITS序列,在物种水平上姜状三七具有较高的总的核苷酸多样性($P_i = 0.01011$)。在居群水平上,居群JG具有最高的核苷酸多样性($P_i = 0.01151$),其次是居群X($P_i = 0.01127$),居群MG($P_i = 0.00386$),居群ZY($P_i = 0.00233$),而居群JC的15个样本不存在核苷酸的变异($P_i = 0$)。

利用12个SSR位点对姜状三七的5个居群样本进行分析的结果见表5。每个居群的等位基因数在1.917~5.083之间,居群JG具有最高的等位基因数,居群MG具有最低的等位基因数。5个居群的观测杂合度在0.417~0.722之间,期望杂合

度在0.458~0.540之间,总杂合度在0.458~0.540之间。

2.3 聚类及遗传分化分析

2.3.1 系统树的构建

本研究利用贝叶斯分析法分别对cpDNA和核ITS片段构建系统树,分析结果表明(图3),大部分样本的拓扑结构型呈现梳齿状结构,未能解决不同居群样本间的遗传关系。但是在cpDNA片段构建的系统树中,来自江城居群的样本(JC1~JC15)、镇沅居群的3个样本(ZY6~ZY8)和马关居群样本中的MG1聚为一支;来源于镇沅居群的ZY1~ZY4样本和MG2聚为一支。在ITS系统树中,镇沅居群的ZY6~ZY8聚为一小支且获得高支持率(100%),所有江城居群样本聚为一支,支持率为86%。

表4 姜状三七5个居群12个微卫星位点遗传多样性分布
Table 4 Summary of 12 microsatellite loci used to study population genetics among five populations of *Panax zingiberensis*

位点 Locus	等位基因数 N_a	有效等位基因数 A_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	总杂合度 H_t
PG465	4	2.642	0.941	0.666	0.652
PG628	4	1.583	0.422	0.411	0.466
PG770	7	1.739	0.609	0.492	0.660
PG946	11	2.847	0.543	0.724	0.797
RS12	4	1.282	0.256	0.258	0.323
PG1335	3	1.019	0.011	0.023	0.337
PG1419	18	3.809	0.736	0.812	0.874
PG1481	4	1.348	0.317	0.286	0.336
RS25	16	2.877	0.772	0.720	0.749
RS36	2	1.156	0.096	0.159	0.153
XS3	5	2.391	0.820	0.642	0.749
RS22	11	3.566	0.864	0.790	0.861
平均值	7.417	2.187	0.532	0.497	0.578

注: N_a , 等位基因数; A_e , 有效等位基因数; H_o , 观测杂合度; H_e , 期望杂合度; H_t , 总杂合度。下同。

Notes: N_a , allele number; A_e , efficient allelic number; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; H_t , total heterozygosity. Same below.

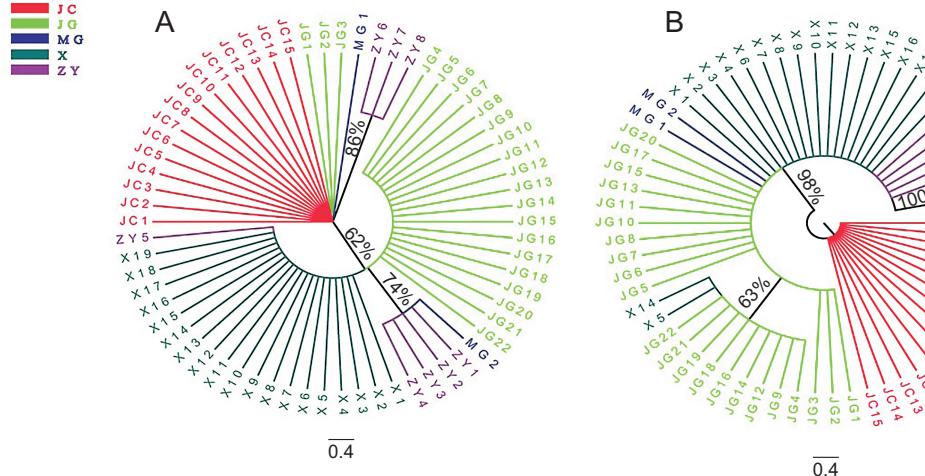
表5 姜状三七5个居群的遗传多样性分布
Table 5 Genetic diversity within populations of *Panax zingiberensis*

居群编号 Population ID	等位基因数 N_a	有效等位基因数 A_e	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	总杂合度 H_t
JC	3.417	2.619	0.722	0.540	0.540
JG	5.083	2.933	0.521	0.486	0.486
MG	1.917	1.831	0.417	0.511	0.511
X	5.000	2.686	0.522	0.477	0.477
ZY	3.083	2.368	0.479	0.458	0.458

2.3.2 Structure 分析

本研究利用 Structure 软件对姜状三七 5 个居群的 66 个个体进行了聚类分析。分析所得的最佳聚类分组值以 ΔK 值的大小来表示。当分组为 2 时, ΔK 值最大, 即当 $K=2$ 为最优分组值; $K=4$ 时, ΔK 值次之。为了更深入的了解 5 个居群样本的遗传组成和聚类情况, 本研究分别对 $K=2 \sim 5$

时的 Structure 聚类情况进行了展示(图 4)。当 $K=2$ 时, 江城居群(JC)的样本聚为一组, 其他 4 个居群的样本聚为一组; 当 $K=3$ 时, 江城居群(JC)的样本聚为一组, 马关居群(MG)、镇沅居群(ZY)的样本以及景谷居群的 JG1 ~ JG3 和 JG22 聚为一组, 景谷居群(JG)其他样本和居群(X)样本的遗传成分更相似; 当 $K=4$ 或 5 时, 江



分支上的数字为后验概率, 居群编号同表 1。

Numbers on branches stand for posterior probability, population number is same as in Table 1.

图 3 基于 cpDNA(A)和核 ITS(B)数据对姜状三七 5 个居群构建的贝叶斯树

Fig. 3 Bayesian tree based on cpDNA (A) and ITS (B) data

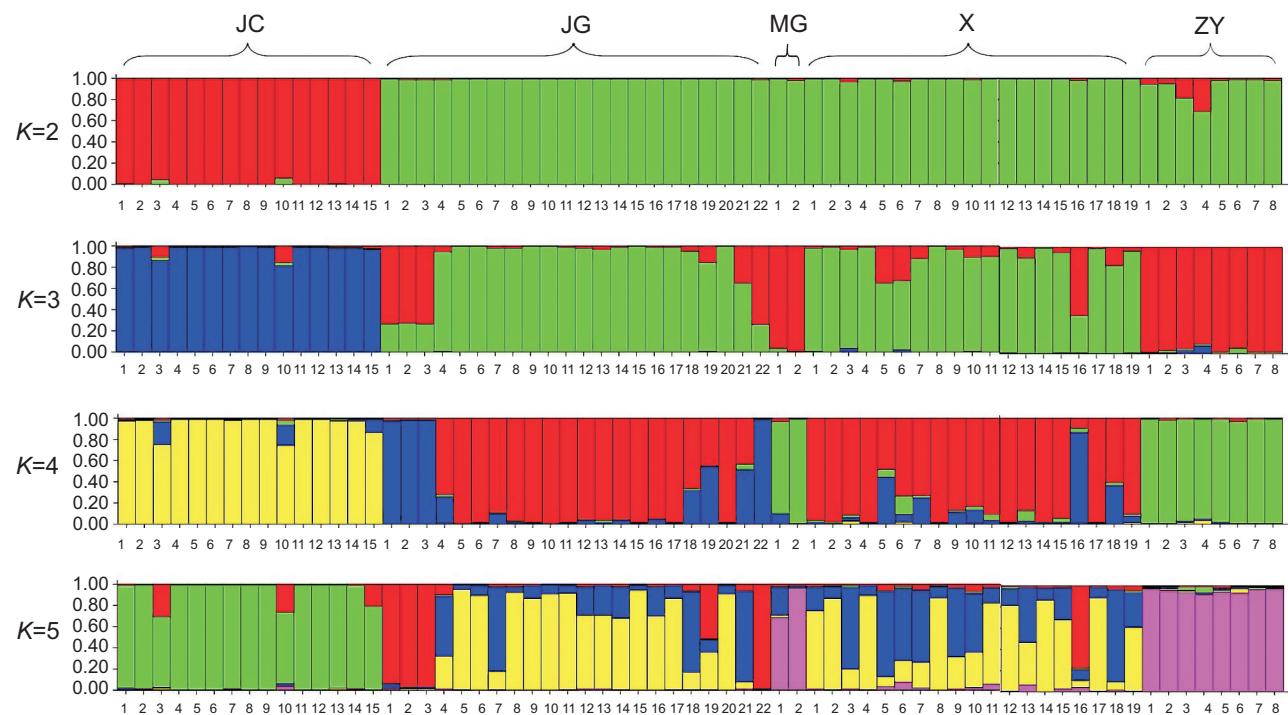


图 4 基于微卫星标记位点对姜状三七 5 个居群 66 个样本的 Structure 聚类分析

Fig. 4 Structure clustering analysis of 66 individuals in five groups of *Panax zingiberensis* based on microsatellite marker sites

城居群(JC)的样本聚为一组, 马关居群(MG)和镇沅居群(ZY)的样本聚为一组, 景谷居群的JG1~JG3、JG22和X16聚为一组, 相比较而言来自于JG和X的样本遗传杂合度更高。

2.3.3 遗传分化

为了探究姜状三七的遗传变异分布情况, 本研究分别对cpDNA、核ITS片段及SSR位点进行了AMOVA分析。结果显示(表6), 姜状三七cpDNA片段显示居群间的遗传变异(55.03%)大于居群内的遗传变异(44.97%), 而核ITS片段和SSR数据的遗传变异大部分分布在居群内($V_{ITS} =$

69.77%, $V_{SSR} = 64.1\%$), 只有小部分的遗传变异分布在居群间($V_{ITS} = 30.23\%$, $V_{SSR} = 35.9\%$)。

依据SSR数据, 分别计算5个居群的遗传分化系数 F_{st}' 、 G_{st}' (Nei)和 Rho 的值(表7)。从这些数值中, 可以看到基于 F_{st}' 值的遗传分化取值范围在-0.00242~0.398051之间, 基于 G_{st}' 值的取值范围在-0.00414~0.162708之间, 而基于 Rho 值的取值范围在0.151655~0.569666之间。无论是基于 F_{st}' 值、 G_{st}' (Nei)值还是 Rho 值进行遗传分化的估计, 居群JC与其他居群间的遗传分化均明显。

表6 基于cpDNA、核基因序列及SSR位点对姜状三七居群的AMOVA分析

Table 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) based on cpDNA, ITS, and SSR loci for populations of *Panax zingiberensis*

DNA片段 DNA fragment	变异分布 Source of variation	自由度 df	总方差 Sum of squares	变异成分 Variance components	变异占有百分数(V) Percentage of variation (%)	固定指数 F_{st}
cpDNA	居群间	4	47.134	0.90596	55.03	0.55034*
	居群内	61	45.154	0.74023	44.97	
ITS	居群间	4	114.540	1.07302	30.23	0.30232*
	居群内	127	314.482	2.47624	69.77	
SSR	居群间	4	313.346	5.606	35.90	0.359**
	居群内	61	609.957	9.999	64.10	

Notes: *, $P = 0.05$; **, $P = 0.01$.

表7 基于SSR的姜状三七居群间3个遗传分化系数 F_{st}' 、 G_{st}' (Nei)和 Rho 的值

Table 7 Genetic differentiation coefficients of F_{st}' , G_{st}' (Nei), and Rho for *Panax zingiberensis* based on SSR data markers

居群编号 Population ID	江城居群 JC	景谷居群 JG	马关居群 MG	景谷居群 X	镇沅居群 ZY
JC	0	0.395493/	0.398051/	0.379533/	0.381121/
		0.162708/	0.139286/	0.156385/	0.150599/
		0.510413	0.569666	0.516228	0.527416
JG	0.395493/ 0.162708/ 0.510413	0.091835/	0.091835/	-0.00242/	0.073127/
		0	0.023342/	-0.00365/	0.027043/
		0.224081	0.224081	0.006759	0.160047
MG	0.398051/ 0.139286/ 0.569666	0.091835/		0.091175/	0.051267/
		0.023342/	0	0.021439/	-0.00414/
		0.224081		0.224651	0.151655
X	0.379533/ 0.156385/ 0.516228	-0.00242/	0.091175/		0.071297/
		-0.00365/	0.021439/	0	0.025716/
		0.006759	0.224651		0.159071
ZY	0.381121/ 0.150599/ 0.527416	0.073127/	0.051267/	0.071297/	
		0.027043/	-0.00414/	0.025716/	
		0.160047	0.151655	0.159071	0

3 讨论

3.1 姜状三七的遗传多样性

遗传多样性是物种抵御外界不良环境压力的基础, 同时也是物种多样性的物质基础, 因此开展物种遗传多样性的评价和分析有助于了解物种的进化潜力和其适应能力, 从而为物种保护政策制定奠定基础^[33]。在人参属植物的研究中, Zhou 等^[7]采用 3 个 cpDNA 片段、ITS 片段及 3 个低拷贝核基因 (*PZ15*、*PZ8* 和 *PW28*) 对栽培三七、屏边三七、越南三七 (*P. vietnamensis* Ha et Grushv.)、姜状三七和竹节参 (*P. japonicus* C. A. Meyer) 5 种人参属植物物种水平的单核苷酸多态性 (P_i) 进行了统计, 结果表明姜状三七高于屏边三七和三七, 低于越南三七和竹节参。本研究统计得到的姜状三七 cpDNA 的 P_i 值为 0.00068, 该数值虽然低于上述研究中姜状三七 cpDNA 的 P_i 值, 但高于三七的统计值。此外, 姜状三七 ITS 的 P_i 值为 0.01011, 明显高于上述研究中屏边三七、三七和越南三七。同时研究结果也高于 Zhou 等^[7]的研究中得到的姜状三七 ITS 单核苷酸多态性统计值, 原因可能是由两个研究样本的大小差异造成的。Zhou 等^[11]曾利用核糖体 ITS 序列比较了栽培三七 (24 个样本) 和屏边三七 (51 个样本) 的核苷酸多态性, 结果显示栽培三七 P_i 值为 0, 而屏边三七为 0.00340。Pan 等^[34]采用 RAD (Restriction-site associated DNA) 测序技术对 12 个不同地点的 36 个栽培三七样本进行分析, 发现在物种水平上栽培三七具有较低的遗传多样性。从以上数据可以看出, 与同一属的物种相比, 姜状三七的遗传多样性高于栽培三七和屏边三七, 但低于竹节参, 处于中等水平。除了评价序列的单核苷酸多态值以外, 本研究中 12 个微卫星位点共检测到姜状三七具有 89 个等位基因, 其中每个位点的平均等位基因个数为 7.417, 而在越南三七中, 每个位点的平均等位基因个数为 6.3^[17], 人参为 4.5^[35, 36], 说明姜状三七具有较高的遗传多样性。

而从居群水平看, 江城居群的 15 个样本, 形态上表现为小叶无柄或近无柄、地下根为非典型的姜块状, 并且 3 种数据均显示该居群无核苷酸多态性, 仅具有 1 种单倍型。镇沅居群 cpDNA 序列的多态性最高但景谷的两个居群依据 ITS 序列分析的

核苷酸多态性最高, 可能与这两个居群的 ITS 片段测序结果中显示的 DNA 序列变异含有许多的简并碱基有关。由于马关居群只有两个样本, 统计值不具有代表性, 因此不在比较之列。

3.2 姜状三七的遗传分化

关于姜状三七的遗传变异分布, AMOVA 分析显示核 ITS 和 SSR 的遗传变异大都发生在居群内, 居群间所占比例小, 仅 cpDNA 遗传变异更多地发生在居群间。且叶绿体片段 ($F_{st} = 0.55034$)、核 ITS 片段 ($F_{st} = 0.30232$) 及 SSR 位点 ($F_{st} = 0.359$) 的 F_{st} 值均大于 0.25, 依据 Wright^[37] 对 F_{st} 值与遗传分化关系给出的解释, 表明姜状三七在物种水平上有一定的遗传分化, 但分化不显著 ($P = 0.01$ 或 0.05)。

一般情况下, 种群间的 Rho 值要大于 F_{st}' 值和 G_{st}' (Nei) 值^[38]。本研究统计的两两居群间遗传分化系数值显示, 江城居群与其他 4 个居群间的遗传分化系数值是最高的 (> 0.13), 而其余 4 个居群间的遗传分化系数值都偏小。说明江城居群与其他居群间存在一定程度的遗传分化, 其他 4 个居群间基本不存在遗传分化。Structure 分析结果也表明, 不论 K 取何值, 居群 JC 的样本都与其他居群的样本被聚类到不同的分组里, 进一步支持了这一推测。在形态特征上居群 JC 和居群 MG 的样本都比较一致, 都具有非典型姜块状的根, 小叶近无柄, 而其余 3 个居群的样本则具有形态上的变异, 但 Structure 分析还显示, 形态特征相近的样本并未聚类到一起, 而是同一分布点的样本遗传成分更相似。

姜状三七在中国境内的分布范围极其狭窄, 仅在云南东南部有发现, 野外资源非常稀少且人为采挖严重。如云南文山州马关县及麻栗坡县曾经有大量的分布, 但近 20 年来森林栖息地逐渐减少, 野生资源也遭到严重采挖, 该地区已经极难发现野生居群。此外, 姜状三七为多年生植物, 从种子萌发到开花结果需要 3 年的时间, 且种子萌发前需要经历 3~5 个月的后熟期, 这些特征都不利于其在野外的自我繁殖和资源更新。姜状三七野生资源亟待保护。依据本研究的分析结果, 在对姜状三七制定保护策略时, 建议可将江城居群和其他居群作为两个保护单元加以保护, 同时要尽可能多地保护具有不同形态特征的样本个体。其次, 要加强对当地居

民的宣传工作,减少人为破坏对其造成的影响,在开展就地保护的基础上还可以通过建立种质资源苗圃和人工种苗繁殖的方式进行异地保护。

参考文献:

[1] 吴征镒,冯国楣,周俊.人参属植物的三萜成分和分类系统、地理分布的关系[J].植物分类学报,1975,13(2):29-48.
Wu ZY, Feng GM, Zhou J. Triterpenoids from *Panax* Linn. and their relationship with taxonomy and geographical distribution[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 1975, 13(2): 29-48.

[2] 何景,曾沧江.中国植物志:第54卷[M].北京:科学出版社,1978.

[3] 冯国楣,李雅茹.云南植物志:第2卷[M].北京:科学出版社,1979.

[4] Xiang QB, Lowry P, Wu CY. Flora of China: Vol 13[M]. Beijing: Science Press, 2007.

[5] 周明媚.DNA测序技术在三七及其野生近缘种鉴定中的应用[D].北京:中国科学院大学,2017.

[6] 吴其国,符德欢,毛小明,胡叶青,高丽.姜状三七水提物的止血镇痛作用和急性毒性反应研究[J].安徽农业科学,2016,44(3):138-140.
Wu QG, Fu DH, Mao XM, Hu YQ, Gao L. The analgesic hemostatic action and acute toxicity reaction of water extracts from *Panax zingiberensis*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(3): 138-140.

[7] Zhou MM, Gong X, Pan YZ. *Panax* species identification with the assistance of DNA data[J]. *Genet Resour and Crop Evol*, 2018, 65(7): 1839-1856.

[8] Zhuravlev YN, Koren OG, Reunova GD, Muzarok TI, Gorpenchenko TY, et al. *Panax ginseng* natural populations: their past, current state and perspectives[J]. *Acat Pharmacol Sin*, 2008, 29(9): 1127-1136.

[9] Artyukova EV, Kozyrenko MM, Koren OG, Muzarok TI, Reunova GD, et al. RAPD and allozyme analysis of genetic diversity in *Panax ginseng* C. A. Meyer and *P. quinquefolius* L. [J]. *Russ J Genet*, 2004, 40(2): 178-185.

[10] Vasyutkina EA, Adrianova IY, Reunova GD, Nguyen TPT, Zhuravlev YN. A comparative analysis of genetic variability and differentiation in *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. and *P. ginseng* C. A. Meyer using ISSR markers[J]. *Russ J Genet*, 2018, 54(2): 262-265.

[11] Zhou SL, Xiong GM, Zhong YL, Wen J. Loss of genetic diversity of domesticated *Panax notoginseng* F H Chen as evidenced by ITS sequence and AFLP polymorphism: a comparative study with *P. stipuleanatus* H T Tsai et K M Feng[J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(1): 107-115.

[12] Fushimi H, Komatsu K, Namba T, Isobe M. Genetic heterogeneity of ribosomal RNA gene and *matK* gene in *Panax notoginseng* [J]. *Planta Med*, 2000, 66 (7): 659-661.

[13] Yang TT, Mu LQ, Wang J. Optimizing SSR-PCR system of *Panax ginseng* by orthogonal design[J]. *J Forestry Res*, 2007, 18(1): 31-34.

[14] Huang XM, Chen JM, Yang XQ, Duan SH, Long C, et al. Low genetic differentiation among altitudes in wild *Camellia oleifera*, a subtropical evergreen hexaploid plant[J]. *Tree Genet Genomes*, 2018, 14(2): 21.

[15] Kim J, Jo BH, Lee KL, Yoon ES, Ryu GH, et al. Identification of new microsatellite markers in *Panax ginseng*[J]. *Mol Cells*, 2007, 24(1): 60-68.

[16] 杨维泽,金航,崔秀明,沈涛,杨美权,张金渝.三种人参属植物的EST-SSR信息分析及其在三七中的应用[J].基因组学与应用生物学,2011,30(1):62-71.
Yang WZ, Jin H, Cui XM, Shen T, Yang MQ, et al. Analysis on EST-SSR of three species in genus *Panax* and the application in *Panax notoginseng*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2011, 30(1): 62-71.

[17] Reunova GD, Kats IL, Muzarok TI, Nguyen CTP, Dang TT, et al. Diversity of microsatellite loci in the *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (Araliaceae) population[J]. *Dokl Biol Sci*, 2011, 441(4): 408-411.

[18] Doyle J. DNA Protocols for Plants-CTAB Total DNA Isolation[M]. Berlin: Springer, 1991.

[19] Zuo YJ, Zhong JC, Kondo K, Funamoto T, Wen J, et al. DNA barcoding of *Panax* species[J]. *Planta Med*, 2011, 77(2): 182-187.

[20] Swindell SR. Sequence Data Analysis Guidebook [M]. New York: Springer, 1997.

[21] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, 41(41): 95-98.

[22] Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14 (9): 817-818.

[23] Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(4): 978-989.

[24] Hong CP, Lee SJ, Park JY, Plaha P, Park YS, et al. Construction of a BAC library of Korean ginseng and initial analysis of BAC-end sequences[J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271(6): 709-716.

[25] Choi HI, Waminal NE, Park HM, Kim NH, Choi BS, et al. Major repeat components covering one-third of the ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) genome and evidence for allotetraploidy[J]. *Plant J*, 2014, 77(6): 906-916.

[26] 潘跃芝,张亦驰,龚洵,李富生.4种人参属植物基因组大小的测定[J].植物分类与资源学报,2014,36(2):233-236.

Pan YZ, Zhang YC, Gong X, Li FS. Estimation of genome size of four *Panax* species by flow cytometry [J]. *Plant Diversity and Resources*, 2014, 36(2): 233–236.

[27] Meirmans PG, Tienderen PHV. Genotype and Genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms [J]. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4 (4): 792–794.

[28] Meirmans PG. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure [J]. *Evolution*, 2006, 60(11): 2399–2402.

[29] Hedrick PW. A standardized genetic differentiation measure [J]. *Evolution*, 2005, 59(8): 1633–1638.

[30] Ronfort J, Jenczewski E, Bataillon T, Rousset F. Analysis of population structure in autotetraploid species [J]. *Genetics*, 1998, 150(2): 921–930.

[31] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945–959.

[32] Earl DA, VonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method [J]. *Conserv Genet* Resour, 2012, 4(2): 359–361.

[33] Belletti P, Diana F, Andrea P, Monteleone I. Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy [J]. *Eur J Forest Res*, 2012, 131(4): 1127–1138.

[34] Pan YZ, Wang XQ, Sun GL, Li FS, Gong X. Application of RAD sequencing for evaluating the genetic diversity of domesticated *Panax notoginseng* (Araliaceae) [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): 0166419.

[35] Jo BH, Suh DS, Cho EM, Kim J, Ryu GH, et al. Characterization of polymorphic microsatellite loci in cultivated and wild *Panax ginseng* [J]. *Genes Genom*, 2009, 31 (2): 119–127.

[36] Ma KH, Dixit A, Kim YC, Lee DY, Kim TS, et al. Development and characterization of new microsatellite markers for ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) [J]. *Conserv Genet*, 2007, 8(6): 1507–1509.

[37] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

[38] 崔相艳. 野生油茶潜在分布及纬度梯度遗传分化格局 [D]. 南昌: 南昌大学, 2017.

(责任编辑: 周媛)