

网络出版时间:2018-03-09 17:09

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.07.003

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180309.1708.006.html

米槁天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析

李丽霞,刘济明,黄小龙,骆 畅,熊 雪,柳嘉佳,邓明明,李 佳

(贵州大学 林学院,贵州 贵阳 550025)

[摘 要] **【目的】**评价米槁(*Cinnamomum migao* H. W. Li)天然种群的遗传多样性,为其遗传资源的保护和利用提供理论依据。**【方法】**采用 ISSR 分子标记,对采自贵州的 8 个米槁天然种群及其 62 株个体的遗传多样性和遗传结构进行分析,基于遗传相似系数和遗传距离对 8 个种群进行 UPGMA 聚类分析,并对 62 株米槁建立 PCoA 散点聚类图。**【结果】**米槁 8 个天然种群通过 19 条引物扩增出 167 个多态性条带,多态性条带比例为 89.78%。米槁种群间平均观测等位基因数为 1.572 6,有效等位基因数为 1.390 9,Nei's 基因多样性指数为 0.223 3,Shannon's 多样性指数为 0.328 2,多态性条带比例为 57.26%,基因分化系数为 0.263 6,米槁不同天然种群上述遗传多样性指标均显示为物种水平>种群水平;8 个米槁种群的遗传距离均不高(0.046 4~0.241 3),种群间的遗传变异程度较低;米槁种群间的基因流为 1.396 8>1,说明种群间存在基因流动,但种群间的遗传分化较小。UPGMA 聚类结果显示,8 个种群中镇宁(ZN)单独为一类,罗甸 1(LD1)、罗甸 2(LD2)、望谟 1(WM1)、望谟 2(WM2)聚为一类,册亨(CH)、荔波(LB)、贞丰(ZF)聚为一类,聚类结果反映出地理距离近的种群聚在一起;PCoA 散点聚类图显示,62 株米槁明显分为 2 个谱系,谱系 1 为罗甸 2 个种群,谱系 2 包含镇宁(ZN)、贞丰(ZF)、册亨(CH)、荔波(LB),望谟 2 个种群兼具 2 个谱系的遗传信息。**【结论】**米槁种群间和种内遗传多样性丰富,具有进一步改良的潜力。

[关键词] 米槁;天然种群;ISSR 标记;遗传多样性

[中图分类号] Q319⁺.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2018)07-0015-08

Genetic diversity of *Cinnamomum migao* populations using ISSR markers

LI Lixia, LIU Jiming, HUANG Xiaolong, LUO Chang, XIONG Xue,
LIU Jiajia, DENG Mingming, LI Jia

(College of Forestry, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: **【Objective】** This study evaluated the genetic diversity of natural *Cinnamomum migao* H. W. Li populations to provide theoretical basis for protection and rational utilization of *C. migao* genetic resources. **【Method】** The genetic diversity and genetic structure of 8 natural populations and 62 individuals of *C. migao* from Guizhou were analyzed using ISSR molecular markers. Based on genetic identity and genetic distance, UPGMA cluster analysis was performed on the 8 populations and PCoA scatter point cluster diagram was established on the 62 plants. **【Result】** A total of 167 polymorphic bands were amplified by 19 primers from 8 natural *C. migao* populations, and the polymorphic band ratio was 89.78%. The mean observed number of alleles, effective number of alleles, Nei's gene diversity, Shannon's information index, polymorphic band ratio, and gene differentiation coefficient were 1.572 6, 1.390 9, 0.223 3, 0.328 2,

[收稿日期] 2017-05-05

[基金项目] 贵州省科学技术厅项目(黔科合 SY 字[2015]3023);贵州大学研究生创新基金项目(研农 2016011);黔南州社会发展科技计划项目;贵州省林业厅重大项目(黔林科合[2010]重大 04 号)

[作者简介] 李丽霞(1992—),女,贵州黔西人,在读博士,主要从事植物生态学研究。E-mail:18798006671@163.com

[通信作者] 刘济明(1963—),男,重庆人,教授,主要从事植物生态学研究。E-mail:karst0623@163.com

57.26%, and 0.263 6, respectively. Above genetic diversity indexes of different natural populations in species level were larger than those in population level. The genetic distances of the 8 populations were not high (0.046 4—0.241 3), and the genetic variations among populations were low. The gene flow among populations of 1.396 8 was larger than 1, indicating that there was a gene flow among populations, but the genetic differentiation among populations was small. UPGMA clustering showed that Zhenning (ZN) was one class, Luodian 1 (LD1), Luodian 2 (LD2), Wangmo 1 (WM1) and Wangmo 2 (WM2) belonged to one class, while Ceheng (CH), Libo (LB) and Zhenfeng (ZF) belonged to one class, which showed the populations with less distances clustered together. Principal coordinates analysis showed that 62 samples were divided into two ancestries. Ancestry 1 had two populations of Luodian, ancestry 2 contained Zhenning (ZN), Zhenfeng (ZF) and Ceheng (CH), while the two Wangmo populations had genetic information of both ancestries. 【Conclusion】 *C. migao* has abundant genetic diversity among populations and species, and it has the potential for further genetic improvement.

Key words: *Cinnamomum migao* H. W. Li; natural population; ISSR marker; genetic diversity

米槁(*Cinnamomum migao* H. W. Li)系樟科(Lauraceae)樟属(*Cinnamomum*)常绿乔木^[1],主要分布于云南、贵州和广西等省(自治区),垂直分布海拔 300~1 000 m^[2]。米槁为贵州省地道中药材,其干燥果实大果木姜子是贵州十大苗药之一^[3]。除药用外,米槁还可用作香料和工业原料,是一种多用植物。赵山等^[2]、冉光德^[4]、郑亚玉等^[5]认为,由于近年来对米槁不合理的乱砍滥伐,加上长期只收不种、不保护的恶性循环,以及该物种坐果率低、果实有大小年之分,致使米槁种群天然更新不良,种群数量急剧下降。目前有关米槁的研究主要集中在药用化学成分分离与鉴定、化学成分的生物活性与药理特性等方面^[6-11],而对其基础生物特性、生态特性以及针对其种群退化机制原因的探究却鲜有报道。遗传多样性是物种长期进化的结果,是种群生存和发展的前提,对于米槁等生命周期相对较长的林木植物来说,遗传多样性决定了其适应能力,是维持森林生态系统长期稳定的基础^[12-13]。分子标记是 DNA 水平遗传多态性的直接反映,分子标记中简单序列重复区间扩增(Inter-simple sequence repeat, ISSR)结合了 RAPD 和 SSR 的优点,目前已广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、分类、进化及遗传多样性等方面的研究中,通过分子标记可以有效地指示植物的遗传结构与分化情况,探索植物在物种水平和种群水平的遗传多样性情况^[14-15]。在米槁具备良好应用价值的情况下,无论是从保护的角度还是从开发利用的角度,开展米槁种群生存现状和遗传多样性研究,不仅能为米槁遗传资源的遗传改良、有效保护和合理利用提供理论依据,还可为米槁种群退化机制的探讨奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料来源于贵州省罗甸县(LD1、LD2)、册亨县(CH)、贞丰县(ZF)、望谟县(WM1、WM2)、荔波县(LB)、镇宁县(ZN)的 8 个米槁天然种群(表 1),从中采集 62 株米槁无病虫害的幼嫩叶片,采集时间为 2016 年 7—8 月。将采摘的米槁新鲜叶片立即放入装有硅胶的自封袋中,将其带回实验室再置于一 70 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取与检测 采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取米槁(8 个天然种群 62 株单株)叶片的 DNA,放入—20 ℃ 保存备用。用 Eppendorf 公司的 Biophotometer 核酸蛋白分析仪检测所提 DNA 的含量和纯度,用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳,用 G-BOX 紫外凝胶成像系统观察并拍照记录,检测 DNA 品质。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增 参照哥伦比亚大学(UBC)2006 年公布的 100 条 ISSR 引物序列,由上海英俊生物技术有限公司进行引物合成。从 100 条 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性高、稳定性好的 19 条引物用于米槁的 ISSR 分析(引物编号及序列见表 2)。反应体系总体积为 20 μL,包含 MgCl₂ 1.8 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 引物 0.7 μmol/L, 模板 DNA 90 ng, Taq DNA 聚合酶 1 U。ISSR-PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 53.0 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物于 4 ℃ 保存。

表 1 米槁采样地概况

Table 1 Description of sampling locations of *Cinnamomum migao*

采样地点 Position	种群 Population	海拔/m Altitude	坡位 Slope position	坡向 Slope aspect	坡度/(°) Slope grade	年平均 温度/℃ Mean annual temperature	年平均 降雨量/mm Mean annual precipitation
贞丰 Zhenfeng	ZF	996	中 Middle slope	北坡 North slope	25	16.6	1 100
册亨 Ceheng	CH	741	上 Upper slope	东坡 East slope	26	19.2	1 200
镇宁 Zhenning	ZN	980	下 Lower slope	西坡 West slope	38	16.2	1 276
罗甸 Luodian	LD1	710	中 Middle slope	西北坡 Northwest slope	38	20.0	1 335
罗甸 Luodian	LD2	783	中 Middle slope	东北坡 Northeast slope	45	20.0	1 335
望谟 Wangmo	WM1	827	下 Lower slope	西坡 West slope	20	19.0	1 222
望谟 Wangmo	WM2	880	下 Lower slope	西南坡 Southwest slope	34	19.0	1 222
荔波 Libo	LB	652	中 Middle slope	东北坡 Northeast slope	32	18.3	1 320

1.2.3 ISSR-PCR 扩增产物的检测 采用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,缓冲液为 1×TAE,电压 5 V/cm。在溴酚蓝指示剂距离前沿 2~3 cm 时停止电泳,采用 G-BOX 紫外凝胶成像系统观察并拍照记录。

1.2.4 数据分析 采用人工计带法判读电泳图谱中的扩增产物和分子量。相同迁移位置上条带有或无分别计为“1”和“0”,构成“0,1”矩阵。将每个位点视为等位基因 M 和 m,数据“1”代表基因型 MM 或 Mm,数据“0”代表基因型 mm,并且假定种群内基因频率处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,用 POP-GENE32 软件计算多态性条带比例(PPL)、观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Shannon’s 多样性指数(H')、Nei’s 基因多样性指数(H)、基因分化系数(G_{st})、基因流(Nm)、遗传相似系数(I)、Nei’s 遗传距离(D)等 9 个相关遗传参数^[16]。

采用 AMOVA1.55 软件对 8 个米槁种群 62 株个体进行遗传变异的分子方差分析;用 NTSYSpc V2.10e 软件对 8 个米槁种群采用非加权算术平均法(unweighted pair group with arithmetic average, UPGMA)进行聚类分析,建立聚类图;运用 GenA-lex 软件对 62 株米槁个体进行主坐标轴分析,建立 PCoA 散点聚类图。

2 结果与分析

2.1 米槁物种和种群的遗传多样性

由表 2 可知,用 19 条引物对 8 个米槁种群的 62 株 DNA 样品进行 PCR 扩增,共扩增出 186 条重复性高的清晰条带,条带大小为 200~3 000 bp,其中

多态性条带有 167 条,多态性条带比例为 89.78%。平均每个引物可扩增出 9 条多态性条带,其中引物 UBC846 扩增的条带数最多(15 条),且扩增条带多态位点比例高达 100.00%,引物 UBC810 扩增条带数最少(6 条)。

由表 3 可知,米槁在物种水平上的多态性条带比例(PPL)为 90.86%,在种群水平上的 PPL 平均为 57.26%,其中 WM1 种群的 PPL 最高,为 70.97%,ZN 种群的 PPL 最低,为 30.65%。按 PPL 排序,各个种群遗传多样性高低的顺序为 WM1>LD2=WM2>ZF>LB>CH>LD1>ZN。种群平均观测等位基因数(N_a)为 1.572 6, N_a 最高的种群为 WM1(1.709 7),最低的种群为 ZN(1.306 5),各种群 N_a 大小顺序为 WM1>WM2=LD2>ZF>LB>CH>LD1>ZN;物种水平 N_a 为 1.908 6。种群有效等位基因数(N_e)平均为 1.390 9,最高为 WM1(1.469 6),最低为 ZN(1.245 2),各种群 N_e 大小顺序为 WM1>WM2>LB>ZF>LD2>CH>LD1>ZN;物种水平 N_e 为 1.520 9。Nei’s 基因多样性指数(H)最高的种群是 WM1(0.269 1),最低的是 ZN(0.136 2),平均为 0.223 3,8 个米槁种群 H 顺序为 WM1>WM2>LB>LD2>ZF>CH>LD1>ZN;物种水平的 H 为 0.303 2。Shannon’s 多样性指数(H')种群水平平均值为 0.328 2,最高的是 WM1 种群(0.397 4),最低的是 ZN 种群(0.195 1),各种群排序为 WM1>WM2>LD2>LB>ZF>CH>LD1>ZN。 H' 物种水平(0.453 9)>种群水平(0.328 2), H 指数物种水平(0.303 2)>种群水平(0.223 3), N_e 物种水平

(1.520 9) > 种群水平(1.3909), 由此可见, 米槁物 种水平遗传多样性较为丰富。

表 2 62 株米槁单株的 ISSR 扩增结果

Table 2 ISSR amplification of 62 individuals of *Cinnamomum migao*

引物编号 Primer number	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	总条带数 Total number strips	多态性条带数 Polymorphic bands number	多态性条带比例/% Polymorphic band ratio
UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	10	8	80.00
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	10	9	90.00
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	6	5	83.33
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	12	10	83.33
UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	8	7	87.50
UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	8	7	87.50
UBC821	GTG TGT GTG TGT GTG TT	9	9	100.00
UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	8	8	100.00
UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	10	10	100.00
UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	9	6	66.67
UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	10	10	100.00
UBC846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	15	15	100.00
UBC847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	13	13	100.00
UBC853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	9	6	66.67
UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	10	10	100.00
UBC859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	10	9	90.00
UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A	12	12	100.00
UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA	8	7	87.50
UBC891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	9	6	66.67
总数或平均 Total/Average		186	167	89.78

表 3 8 个米槁天然种群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of 8 *Cinnamomum migao* populations

种群 Population	样本数 Sample number	多态性条带 比例(PPL)/% Polymorphic band ratio	观测等位 基因数(N_a) Observed number of alleles	有效等位 基因数(N_e) Effective number of alleles	Nei's 基因 多样性指数(H) Nei's gene diversity	Shannon's 多样性指数(H') Shannon's information index
LD1	13	54.84	1.548 4	1.353 4	0.203 2	0.301 1
LD2	12	65.59	1.655 9	1.402 6	0.235 1	0.351 1
WM1	11	70.97	1.709 7	1.469 6	0.269 1	0.397 4
WM2	7	65.59	1.655 9	1.441 6	0.252 8	0.372 8
ZF	5	58.06	1.580 6	1.407 0	0.233 1	0.341 6
LB	5	56.99	1.569 9	1.419 0	0.235 7	0.342 7
ZN	3	30.65	1.306 5	1.245 2	0.136 2	0.195 1
CH	6	55.38	1.553 8	1.388 4	0.221 0	0.323 8
种群水平 Population level	8	57.26	1.572 6	1.390 9	0.223 3	0.328 2
物种水平 Species level	62	90.86	1.908 6	1.520 9	0.303 2	0.453 9

2.2 米槁种群的遗传结构与分化

利用 AMOVA 对所有的 ISSR 标记数据按种群间、种群内两因素阶层进行分子方差分析, 结果见表 4。由表 4 可知, 米槁总的遗传变异中有 16.14% 存在于种群间, 83.86% 存在于种群内 ($P < 0.001$), 表明种群间和种群内遗传分化均极显著, 该分析结果与 2.1 节分析结果相似。

根据 Nei's 基因多样性指数(H)估算的米槁 8 个天然种群间的基因分化系数(G_{st})为 0.263 6, 即

表示种群间变异占总遗传变异的 26.36%, 种群内变异占比为 73.64%。根据 Shannon's 多样性指数(H')估算的种群间遗传多样性所占比例为 27.69%, 即表示种群间变异占总遗传变异的 27.69%, 种群内变异占比 72.31%。根据 H' 分析的种群间遗传多样性占比虽略高于根据 H 估算的 G_{st} 值, 但两类指数估算的米槁种群遗传分化结果一致, 即均以种内遗传变异为主。根据 G_{st} 计算出的米槁种群水平上的基因流(Nm)为 1.396 8。

表 4 8 个米槁天然种群的分子方差分析

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) for 8 *Cinnamomum migao* populations

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	总方差 Sum of squares	方差组分 Variance components	变异百分比/% Percentage of variation	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
种群间 Among populations	7	421.003	4.738 4	16.14	<0.001
种群内 Within populations	54	1 326.387	24.560 9	83.86	<0.001
总和 Total	61	1 747.29	29.289 2		

2.3 米槁种群间的遗传距离和聚类结果

基因分化系数(G_{st})只能评估种群间的分化程度,不能定量分析种群间的遗传分化,为了进一步分析种群之间的分化程度,利用 POPGENE 软件计算出种群间的遗传相似系数(I)和 Nei's 遗传距离

(D),结果见表 5。由表 5 可知, I 在 0.785 6~0.954 6,这表明种群间的亲缘关系很近。8 个米槁种群的 D 都不高,最大的为 LD2 和 ZN 两种群间,但也只有 0.241 3,最小的为 WM1 和 WM2 两种群间,仅 0.046 4。

表 5 8 个米槁天然种群的 Nei's 遗传相似系数和遗传距离

Table 5 Nei's genetic identity and genetic distance among 8 *Cinnamomum migao* populations

种群 Population	LD1	LD2	WM1	WM2	ZF	LB	ZN	CH
LD1		0.953 5	0.916 3	0.906 0	0.849 3	0.844 1	0.789 3	0.830 6
LD2	0.047 6		0.931 5	0.916 5	0.871 1	0.850 8	0.785 6	0.845 8
WM1	0.087 5	0.071 0		0.954 6	0.904 8	0.883 8	0.837 4	0.887 0
WM2	0.098 7	0.087 2	0.046 4		0.898 1	0.883 8	0.835 6	0.889 9
ZF	0.163 4	0.138 0	0.100 0	0.107 4		0.909 6	0.834 1	0.917 7
LB	0.169 5	0.161 6	0.123 5	0.123 5	0.094 8		0.840 8	0.902 1
ZN	0.236 6	0.241 3	0.177 5	0.179 7	0.181 4	0.173 4		0.810 5
CH	0.185 6	0.167 4	0.119 9	0.116 6	0.085 8	0.103 0	0.210 1	

注:表中右上部分为遗传相似系数(I),左下部分为遗传距离(D)。

Note:The data above diagonal are genetic identity (I),while the data below diagonal are the genetic distance (D).

根据种群间的遗传相似系数(I)和 Nei's 遗传距离(D),使用 NTSYSpcV2.10e 软件采用 UPGMA 法构建了米槁种群的遗传关系聚类图,结果见图 1。由图 1 可知,米槁种群间的遗传距离较小,在遗传距离 0.08 处,8 个种群被划分为 2 类,即 ZN 单独为一类,其余 7 个种群为一类;在遗传距离 0.07

处,7 个种群又被划分为 2 类,即 LD1、LD2、WM1、WM2 聚为一类,CH、LB、ZF 聚为一类;在遗传距离 0.05 处,LD1、LD2 聚为一类,WM1、WM2 聚为一类。

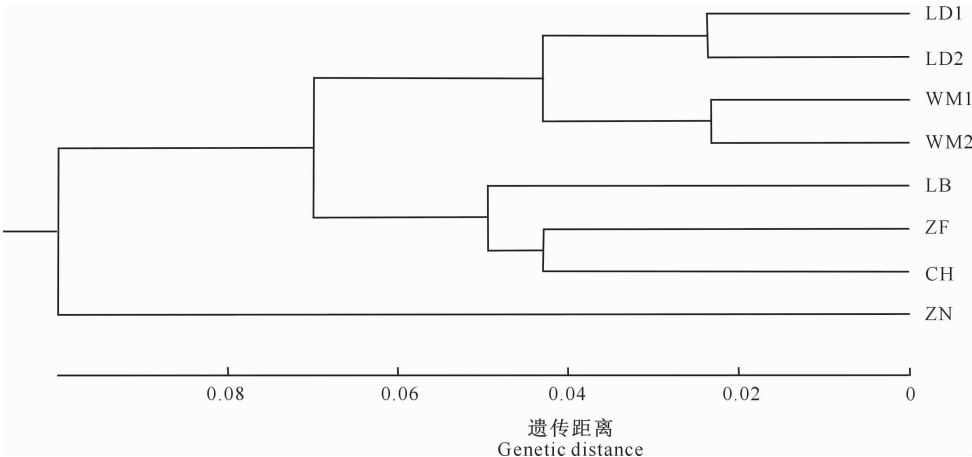


图 1 基于 ISSR 标记的 8 个米槁天然种群的 UPGMA 聚类图

Fig.1 UPGMA dendrogram for 8 natural populations of *Cinnamomum migao* based on ISSR markers

PCoA 散点聚类图体现了个体间的遗传关系。由图 2 可见,62 株米槁个体可明显分为 2 个谱系,

谱系 1 为 LD(LD1、LD2),谱系 2 包含 ZN、ZF、CH、LB,而 WM(WM1、WM2)兼具 2 个谱系的遗传信息,个体之间可能存在一定差异。

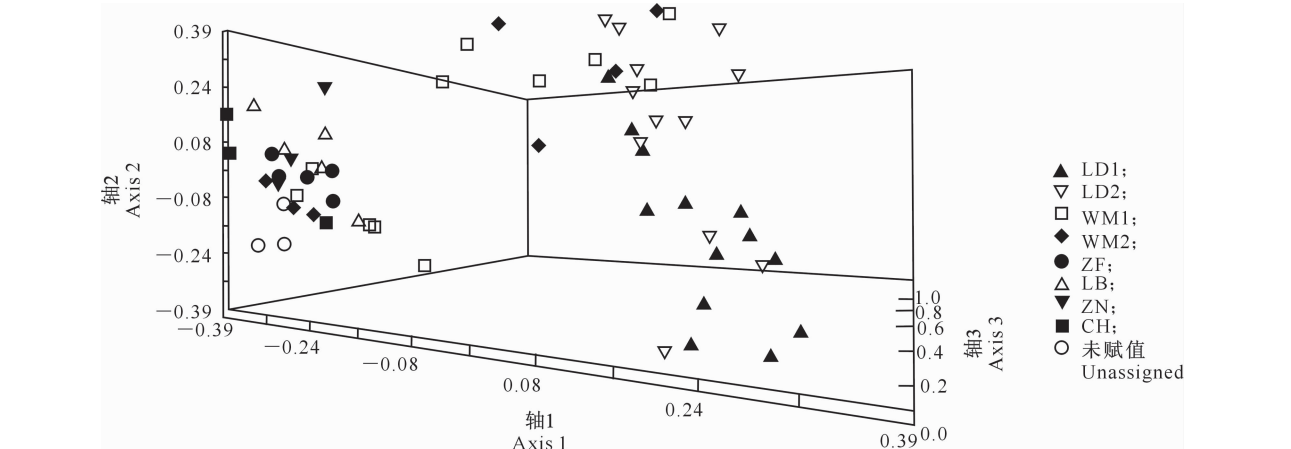


图 2 米槁 62 株个体的 PCoA 散点图

Fig. 2 Principal coordinates analysis (PCoA) of 62 samples of *Cinnamomum migao*

3 讨论与结论

遗传多样性是物种长期进化的产物,也是生存和发展的前提,遗传变异大小决定了一个物种的进化潜力和抗逆境能力,遗传多样性越丰富,其对环境变化的适应能力越强,分布范围也就越广^[17]。本试验采用 ISSR 标记对米槁 8 个天然种群的遗传多样性及遗传结构进行研究,从条带检测结果可以看出多态性条带比例为 89.78%。在米槁种群水平上平均 N_a 为 1.572 6, N_e 为 1.390 9, H 为 0.223 3, H' 为 0.328 2, PPL 为 57.26%,米槁不同天然种群各遗传多样性指标均显示为物种水平>种群水平,说明米槁物种水平遗传多样性较为丰富,进一步证实了陈美兰等^[18]对米槁果实大果木姜子遗传多样性的研究结论,即认为米槁在种群间的遗传多样性较低,而在种群内的分化较高,大部分变异存在于种群内,且种群水平的 H 指数(0.223 3)也与陈美兰等^[18]的 H 指数(0.228 0)大致相当。在物种水平上,与樟科其他植物相比,米槁 Shannon's 多样性指数为 0.453 9,低于孙林^[19]用微卫星 SSR 标记的天目木姜子(*Litsea auriculata*)(0.515 0),高于冷欣等^[20]应用 ISSR 标记的红楠(*Machilus thunbergii*)(0.385)、慈秀芹^[21]应用 RAPD 标记的思茅木姜子(*Litsea szemaonis*)(0.264 2)、江香梅等^[22]应用 RAPD 标记的闽楠(*Phoebe bournei*)(0.368 8)和王中生等^[23]标记的舟山新木姜子(*Neolitsea sericea*)(0.282 0)。米槁种群平均 Shannon's 多样性指数 H' (0.328 2)高于潘晓华^[24]应用 RAPD 标记的樟树

(*Cinnamomum camphora*)(0.249 6)。可见,米槁遗传多样性属于中偏高水平,说明米槁的遗传多样性较丰富。

通过对 8 个米槁种群的 ISSR 数据进行 AMOVA 分析,表明米槁总的遗传变异中有 16.14%存在于种群间,83.86%存在于种群内,种群间和种内遗传分化均极显著。樟科其他植物的研究结果表明:天目木姜子(*Litsea auriculata*)有 28.36%的遗传变异存在于种群间,71.64%的遗传变异存在于种群内^[19];思茅木姜子(*Litsea szemaonis*)表现为 27.01%的遗传变异存在于种群间,72.99%的遗传变异存在于种群内^[25];舟山新木姜子(*Neolitsea sericea*)的总遗传变异中种群间占 36.46%,种群内占 63.54%^[23]。由此可见,米槁种群间的遗传变异比例较其他樟科植物的低,而种内遗传变异比例较其他樟科植物的高,进一步说明米槁遗传多样性较为丰富。遗传分化系数是判断遗传变异的主要来源,米槁基于 Nei's 基因多样性指数的基因分化系数 G_{st} 为 0.263 6,略低于基于 Shannon's 多样性指数估计的分化系数 0.276 9,但均说明米槁种群内的遗传多样性较种群间高,同时也说明由于地理隔离的存在,米槁种群间存在一定的遗传分化。

种群间遗传相似系数(I)和 Nei's 遗传距离(D)指示 8 个米槁天然种群间的遗传变异程度较低。基因流(N_m)是影响种群内部和种群间遗传变异程度的重要因素,大的基因流能够阻止种群间的遗传分化,基因流大的物种,种群间的遗传分化小,基因流小的物种,种群间的遗传分化大^[26]。当

$Nm>1$ 时,说明种群间存在一定的基因流动^[27]。本试验结果表明,米槁种群水平上的 Nm 为 $1.396\ 8>1$,说明米槁种群间存在基因流动,种群间的遗传分化较小,该结果与本试验所得的种群间、种群内的遗传多样性和遗传分化系数的分析结果一致。米槁 8 个种群 62 株个体的 PCoA 散点聚类图显示,62 株个体明显分为 2 个谱系,谱系 1 为 LD 的 2 个种群,谱系 2 包含 ZN、ZF、CH、LB、WM 的 2 个种群兼具 2 个谱系的遗传信息,这揭示了 2 个遗传谱系之间可能存在不对称的基因流。谱系 2 中 6 个种群个体分布在一个狭窄区域,6 个种群个体各自紧密聚集在一起;而谱系 1 所有个体分布在一个较广泛的区域内,并且同一种群的个体都广泛分布在区域中,表明谱系 1 种群中的个体之间遗传距离也较大。UPGMA 聚类分析结果基本支持上述结果,8 个种群划分为 3 大类,ZN 单独为一类,LD 2 个种群和 WM 2 个种群聚为一类,CH、LB、ZF 聚为一类;LD1 与 LD2、WM1 与 WM2、CH 与 ZF 间遗传距离都较小,遗传相似度较高。聚类图显示地理距离近的种群聚在一起,反映出米槁的遗传变异与生境有一定的关系,从米槁种群的空间分布格局来看,种群遗传变异分布模式基本上与其地理生态格局一致,这与吴雪琴^[28]对观光木(*Michelia odora*)种群遗传多样性研究的结论一致。

[参考文献]

[1] 李永康. 贵州植物志 [M]. 3 版. 贵阳:贵州人民出版社,1986: 75.
Li Y K. Guizhou flora [M]. 3rd ed. Guiyang:Guizhou People's Press,1986:75.

[2] 赵 山,李鸿玉,邱德文,等. 大果木姜子资源、生态调查:贵州、桂北及湘黔桂接壤区 [J]. 贵阳中医学院学报,1991,3(4):59-61.
Zhao S,Li H Y,Qiu D W,et al. The investigation of resources and ecology on *Cinnamomum migao*:Guizhou,north Guangxi, and contiguous areas of Hunan,Guizhou,Guangxi [J]. Journal of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine,1991,3 (4):59-61.

[3] 邱德文,李鸿玉,赵 山,等. 米槁的本草学研究 [J]. 中国医药学报,1993,8(2):19-21.
Qiu D W,Li H Y,Zhao S,et al. Study on herbalism of *Cinnamomum migao* [J]. Journal of Chinese Medicine,1993,8(2): 19-21.

[4] 冉光德. 中华药海 [M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,1993.
Ran G D. Chinese medicine sea [M]. Harbin:Harbin Press, 1993.

[5] 郑亚玉,邱德文,梁光义,等. 贵州苗药大果木姜子的研究及产

业化 [J]. 世界科学技术(中医药现代化),2005,7(2):112-114.
Zheng Y Y,Qiu D W,Liang G Y,et al. Research and industrialization on Guizhou miao medicine *Cinnamomum migao* [J]. Science and Technology (Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica),2005,7(2):112-114.

[6] 隋艳华,邱德文,谢春风. 大果木姜子油抗实验性心律失常作用 [J]. 中国中药杂志,1998,23(8):495-497.
Sui Y H,Qiu D W,Xie C F. *Cinnamomum migao* fruit oil impact on resistance of experimental arrhythmia [J]. China Journal of Chinese Materia Medica,1998,23(8):495-497.

[7] 梁光义,邱德文,魏慧芬,等. 大果木姜子的甘油三脂组成 [J]. 天然产物研究与开发,1992,4(4):19-22.
Liang G Y,Qiu D W,Wei H F,et al. Research on *Cinnamomum migao* essential oils of the chemical composition [J]. Natural Product Research and Development,1992,4(4):19-22.

[8] 魏慧芬,任永全,贺祝英,等. 大果木姜子精油无机元素的研究 [J]. 微量元素与健康研究,1995,12(4):38.
Wei H F,Ren Y Q,He Z Y,et al. Research essential oils of inorganic element on *Cinnamomum migao* [J]. Research of Trace Elements and Health,1995,12(4):38.

[9] 孙学惠,隋艳华,邱德文,等. 大果木姜子油对离体内脏平滑肌的药理作用 [J]. 中药药理与临床,1990(2):32.
Sun X H,Sui Y H,Qiu D W,et al. Pharmacological effects of *Cinnamomum migao*'s oil on visceral smooth muscle *in vitro* [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica,1990 (2):32.

[10] 邱德文. 民族药米槁多学科综合研究的实践和体会 [C]. 中国药理学会. 中药研究与开发学术会议论文汇编. [出版地不详]:[出版者不详],1994.
Qiu D W. Draft practice and experience of multidisciplinary comprehensive research on national medicine *Cinnamomum migao* [C]. Chinese Pharmacological Society. Traditional Chinese medicine research and development of academic conference proceedings. [S. l.]:[s. n.],1994.

[11] 孙学惠,隋艳华,邱德文. 大果木姜子油对急性实验性心肌缺血的保护作用 [J]. 中国药学杂志,1995,30(6):341.
Sun X H,Sui Y H,Qiu D W. *Cinnamomum migao*' fruit impact on the protection of acute experimental myocardial ischemia [J]. Pharmaceutical Journal of China,1995,30(6):341.

[12] Feres J M,Guidugli M C,Mestriner M A. Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hynenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Leguminosea), an endangered tropical tree:recommendation for conservation [J]. Genetic Resources Crop Evolution,2009,56(6):797-807.

[13] Ferreira D K,Nazareno A G,Mantovani A,et al. Genetic analysis of 50-year old Brazilian pine (*Araucaria augustifolia*) plantations:implications for conservation planning [J]. Conservation Genetics,2012,13(2):435-442.

[14] Esselman E J,Li J Q,Crawford D J,et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amp lified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR)

- markers [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 443-451.
- [15] Ruela M, Rubio J, Cubero J I, et al. Phylogenetic analysis in genus cicer and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 643-651.
- [16] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, et al. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis [M]. *Molecular Biology and Biotechnology Centre*, Canada: Press of University of Alberta, 1997.
- [17] Solits P S, Solits D E. Genetic variation in endemic and wide-spread plant species [J]. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 1991, 3: 215-223.
- [18] 陈美兰, 周涛, 江维克, 等. 苗药大果木姜子的遗传分化及其化学变异的相关性分析 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(11): 1409-1415.
- Chen M L, Zhou T, Jiang W K, et al. Correlation analysis of genetic differentiation and chemical variation on *Cinnamomum migao* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36(11): 1409-1415.
- [19] 孙林. 中国特有珍稀植物天目木姜子遗传多样性与亲缘地理学研究 [D]. 南京: 南京大学, 2014.
- Sun L. The genetic diversity and phylogeography of *Litsea auriculata*, an endemic and rare plant in China [D]. Nanjing: Nanjing University, 2014.
- [20] 冷欣, 王中生, 安树青, 等. 岛屿地理隔离对红楠种群遗传结构的影响 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2006, 30(2): 20-24.
- Leng X, Wang Z S, An S Q, et al. The influence of insular geographical isolation on population genetic structure of *Machilus thunbergii* [J]. *Journal of Nanjing Forestry University(Natural Science Edition)*, 2006, 30(2): 20-24.
- [21] 慈秀芹. 樟科濒危植物思茅木姜子(*Litsea szemaois*)的保护遗传学研究 [D]. 云南西双版纳: 中国科学院研究生院, 2007.
- Ci X Q. Studies on conservation genetics of endangered species *Litsea szemaois* (Lauraceae) [D]. Xishuangbanna, Yunnan: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2007.
- [22] 江香梅, 温强, 叶金山, 等. 闽楠天然种群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *生态学报*, 2009, 29(1): 438-444.
- Jiang X M, Wen Q, Ye J S, et al. RAPD analysis on genetic diversity in eight natural populations of *Phoebe boumei* from Fujian and Jiangxi province, China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1): 438-444.
- [23] 王中生, 安树青, 冷欣, 等. 岛屿植物舟山新木姜子种群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *生态学报*, 2004, 24(3): 414-422.
- Wang Z S, An S Q, Leng X, et al. Population genetic diversity of the insular plant *Neolitsea sericea* based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3): 414-422.
- [24] 潘晓华. 樟树种群遗传多样性及遗传结构的 RAPD 分析 [D]. 福州: 福建师范大学, 2004.
- Pan X H. RAPD analysis of population genetic diversity and genetic structure of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2004.
- [25] 陈俊秋, 慈秀芹, 李巧明, 等. 樟科濒危植物思茅木姜子遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *生物多样性*, 2006, 14(5): 410-420.
- Chen J Q, Ci X Q, Li Q M, et al. Genetic diversity of *Litsea szemaois*, an endangered species endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Biodiversity Science*, 2006, 14(5): 410-420.
- [26] Slatkin M. Gene flow and geographic structure of natural populations [J]. *Science*, 1987, 236: 787-792.
- [27] Wright S. Evolution in mendelian population [J]. *Genetics*, 1951, 16: 97-159.
- [28] 吴雪琴. 南岭地区观光木种群遗传多样性的 ISSR 分析 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2013.
- Wu X Q. ISSR analysis on genetic diversity of *Michelia odora* populations from the Nanling mountains [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2013.