

藏药解吉那保基原植物粗茎秦艽品种鉴定及种内遗传多样性分析

宗粉粉¹, 赵志礼^{1*}, 倪梁红¹, 嘎 务², 刘铜华^{2,3}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 西藏藏医药大学, 西藏 拉萨 850000; 3. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: 藏药“解吉那保”(ཉེ་ཇི་ན་པོ་), 能消肿, 治白喉等。基于民族药理学考察、自然分布区广泛取样(6省区20个居群163株个体), 结合模式标本查阅与形态学比较, 将其主流品种之一鉴定为龙胆科龙胆属 *Gentiana crassicaulis*。粗茎秦艽, 我国特有物种, 仅在西藏、云南、四川、贵州、青海及甘肃等省区有分布, 多见于海拔2 100~4 500 m的高山草甸、林下及林缘。应用 AFLP 技术, 以龙胆科花锚属椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* 及龙胆属近缘种麻花苳 *G. straminea* 为外类群, 构建 DNA 指纹谱。从 64 对引物组合中筛选出 12 对, 共扩增出 315 个条带, 其中多态性条带 254 条, 占比为 80.63%。粗茎秦艽种内遗传多样性丰富, 遗传变异主要存在于居群间 (87%), 居群内部遗传变异较小 (13%)。非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 聚类树物种间拓扑结构与经典分类学观点相一致; 物种内分为两大支: 支 I 由西藏、甘肃、青海及四川各居群组成, 支 II 由贵州及云南各居群组成。PCA 分析及 Mantel 检验等均表明粗茎秦艽居群间遗传距离与空间地理距离具有显著的正相关关系。同时, 结合 SSR 与 SNP 标记, 探讨了四川康定县居群 S1 的分化问题。本工作可为藏药“解吉那保”种质资源保护、药材生药学鉴定及道地性探究等提供基础资料。

关键词: 藏药; 解吉那保; 粗茎秦艽; 扩增片段长度多态性; DNA 指纹谱

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1941-10

DNA fingerprinting and genetic diversity in a threatened alpine medicinal plant, *Gentiana crassicaulis* (Gentianaceae) using AFLP

ZONG Fen-fen¹, ZHAO Zhi-li^{1*}, NI Liang-hong¹, GAAWE Dorje², LIU Tong-hua^{2,3}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Tibetan Traditional Medical College, Lhasa 850000, China; 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Jieji Nabao is a common Tibetan herb. According to our ethnobotanical studies, one of its original plants is identified as *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. (Gentianaceae). Endemic to the Qinghai-Tibet Plateau, this medicinal alpine plant is a threatened species. In this study, 163 individuals from 20 populations of *G. crassicaulis* were collected throughout its geographical range and amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to investigate genetic variation in this species. A cluster analysis was performed on the AFLP data with *Halenia elliptica* and *Gentiana straminea* as the outgroups. From 64 pairs of AFLP primer combinations, 12 pairs were selected for amplification and a total of 315 bands were amplified, of which 254 bands were polymorphic, accounting for 80.63%. High genetic differentiation was detected between populations (87%), and low within populations (13%). The UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) tree was topologically consistent with the traditional taxonomic treatments at the species level, and the populations of *G. crassicaulis* were divided into two branches: one from Yunnan and Guizhou, the other from Tibet, Qinghai, Sichuan and Gansu. PCA analysis and the Mantel test showed that there was a positive correlation between genetic distance and geographical distance.

收稿日期: 2020-03-06; 修回日期: 2020-03-30.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81173654); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81503354); 藏医药区域协同创新中心项目 (2018XTCX005).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322202, E-mail: zhilzhao@sohu.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0246

In addition, combined with SSR and SNP markers within cpDNA, the genetic differentiation within the Sichuan population S1 was validated.

Key words: Tibetan herb; Jieji Nabao; *Gentiana crassicaulis*; amplified fragment length polymorphism; DNA fingerprinting

青藏高原复杂的地质历史、多样化的生境及气候条件, 蕴育出丰富的动植物资源, 是研究物种分化和物种形成机制的理想地区; 同时, 高山植物常具有独特的次生产物结构类型及生物活性特质, 为寻找安全、高效的临床药物提供了更为广阔的研究空间。

龙胆科龙胆属 *Gentiana* 秦艽组 Sect. *Cruciata* 植物多分布于我国青藏高原^[1], 物种及遗传背景丰富多样。该组多个物种常作为中药秦艽及“解吉那保”(ཉེ་ཇེ་ནམ་པོ།) 等藏药材的基原植物, 具有重要的药用价值^[2, 3]。

藏医药学是祖国民族医药学的重要组成部分, 具有悠久的发展历史及丰富的科学与藏族文化内涵。深入开展藏药品种整理, 探讨高山植物物种遗传多样性及藏药材品质与具体产地的相关性等问题, 可为藏药材客观、准确的品种鉴定、活性物质基础研究、质量标准的完善、濒危藏药植物的就地保护及栽培学研究等工作打下坚实基础, 具有重要的科学意义。但由于种种原因, 藏药品种整理等工作尚不能适应藏医药学发展的需要, 当务之急是开展相关深入的基础性研究工作。藏药“解吉那保”, 花、根入药, 能消肿, 治白喉等^[3, 4]。课题组前期与西藏藏医药大学合作开展了相关民族药物学考察、基原植物标本采集、物种分类学鉴定及遗传背景初步分析等工作^[5-10]。

粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk., “解吉那保”主流品种之一, 也是中药秦艽基原植物之一。我国特有物种, 自然分布区涉及西藏、云南、四川、贵州、青海及甘肃等省区, 多见于海拔 2 100~4 500 m 的高山草甸、林下及林缘^[1]。

近年来, 野生资源状况不容乐观, 粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 及其秦艽组近缘物种麻花艽 *G. straminea* Maxim.、小秦艽 *G. dahurica* Fisch. 及大叶秦艽 *G. macrophylla* Pall. 均被列入《国家重点保护野生药材物种名录》^[11]。药用植物种质资源是中药生产的源头, 也是中药可持续利用的物质基础。对粗茎秦艽及其近缘药用种类开展深入的遗传背景分析, 进而开展种质资源评价与就地保护工作, 紧迫性不言而喻。

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 是一种新的分子标记技术, 通过对基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择性地扩增而揭示其多态性, 具有灵敏、稳定、多态性丰富等优点^[12]。

近年来, 该技术在中药种质资源的遗传多样性研究等领域得到广泛应用, 如对枸杞属 *Lycium*^[13]、滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*^[14]、短柄乌头 *Aconitum brachypodum*^[15] 及三叶木通 *Akebia trifoliata*^[16] 等药用植物的遗传多样性分析等。为此, 在品种整理、自然分布区广泛取样及分类学鉴定基础上, 采用 AFLP 技术, 对 163 份粗茎秦艽种质样本遗传背景进行深入分析, 构建 DNA 指纹谱; 以为高山药用植物粗茎秦艽核心种质构建、深入开展藏药“解吉那保”及秦艽类品种的种质资源保护、药材生药学鉴定及道地性研究等提供基础资料。

材料与方法

民族植物学考察及分类学鉴定 自 2010 年起与西藏藏医药大学合作开展藏药“解吉那保”主流品种整理工作, 在西藏及云南等 6 省区粗茎秦艽 *G. crassicaulis* 自然分布区广泛采样, 共计 20 个居群, 163 份种质样本 (图 1 和表 1); 同时, 取新鲜叶片硅胶快速干燥, 备用。采集外类群标本, 麻花艽 *G. straminea* 2 份、椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* 2 份。去英国皇家植物园 (Kew) 植物标本馆查阅粗茎秦艽 *G. crassicaulis* 及其近缘物种的模式标本, 以确保物种各居群样本分类学鉴定的准确性。凭证标本存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室。

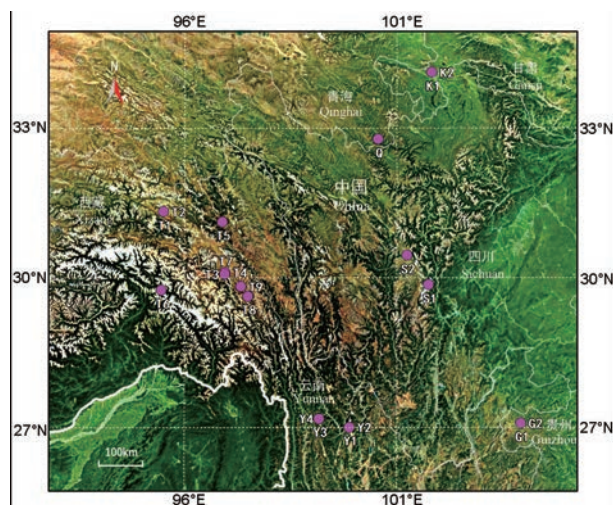


Figure 1 Map of the geographical distribution and sampled populations of *G. crassicaulis*

总 DNA 提取 取适量干燥叶片, 加入液氮研磨成细粉状, 参考 Doyle 的 CTAB 法^[17]并适当改良提取粗茎秦艽基因组 DNA。

接头和引物 参考 Vos 等^[18]方法合成 AFLP 接头和引物。EcoRI 接头 1: 5'-CTCGTAGACTGCGCGTACC-3', 接头 2: 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'; MseI 接头 1: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 接头 2: 5'-TAC TCAGGACTCAT-3'。预扩增引物: EcoRI+A: 5'-GAC TCGGTACCAATTCA-3'; MseI+C: 5'-GATGAGTCCT

GAGTAAC-3'。从 64 对引物中筛选出 12 对带型分布均匀、多态性高且分辨力强的引物进行 AFLP 分析。

酶切和连接 酶切、连接一步进行, 反应体系: 模板 DNA 500 ng, 10×Cut Smart Buffer 3 μL, EcoRI-HF 0.5 μL, MseI 0.5 μL, 10×T4 DNA Ligase Buffer 3 μL, T4 DNA Ligase (350 U·μL⁻¹) 0.1 μL, 5 μmol·L⁻¹ EcoRI 双链接头 2 μL, 50 μmol·L⁻¹ MseI 双链接头 1 μL, ddH₂O 补充至 30 μL, 混匀。反应程序: 37 °C, 4 h; 65 °C, 20 min。酶切-连接产物稀释 10 倍进行预扩增。

Table 1 Samples and voucher specimens. *cultivated; **outgroup. M: *Gentiana straminea*; H: *Halenia elliptica*

Pop. ID	Sample No.	Voucher specimens	Locality	Pop. ID	Sample No.	Voucher specimens	Locality
T1	1	Ni L. H. et al XZ201214-4	Dingqing, Tibet	46	46	Ni L. H. et al GZ201602-5	Weining, Guizhou
	2	Ni L. H. et al XZ201214-5	Dingqing, Tibet		47	Ni L. H. et al GZ201602-6	Weining, Guizhou
	3	Ni L. H. et al XZ201214-6	Dingqing, Tibet		48	Ni L. H. et al GZ201602-7	Weining, Guizhou
T2	4	Yang Y. H. 2012XZ014-A	Dingqing, Tibet	49	49	Ni L. H. et al GZ201602-8	Weining, Guizhou
	5	Yang Y. H. 2012XZ014-B	Dingqing, Tibet		50	Ni L. H. et al GZ201602-9	Weining, Guizhou
	6	Yang Y. H. 2012XZ014-C	Dingqing, Tibet		51	Ni L. H. et al GZ201602-10	Weining, Guizhou
K1	7	Ni L. H. et al GS201301-1	Maqu, Gansu	52	52	Ni L. H. et al GZ201601-11	Weining, Guizhou
	8	Ni L. H. et al GS201301-2	Maqu, Gansu		53	Ni L. H. et al GZ201602-12	Weining, Guizhou
	9	Ni L. H. et al GS201301-3	Maqu, Gansu		54	Ni L. H. et al GZ201602-13	Weining, Guizhou
	10	Ni L. H. et al GS201301-4	Maqu, Gansu		55	Ni L. H. et al GZ201602-14	Weining, Guizhou
	11	Ni L. H. et al GS201301-5	Maqu, Gansu		56	Ni L. H. et al GZ201602-15	Weining, Guizhou
K2	12	Ni L. H. GS201601-1	Maqu, Gansu	T3	57	Ni L. H. et al 2016XZ008-1	Basu, Tibet
	13	Ni L. H. GS201601-2	Maqu, Gansu		58	Ni L. H. et al 2016XZ008-2	Basu, Tibet
	14	Ni L. H. GS201601-3	Maqu, Gansu		59	Ni L. H. et al 2016XZ008-3	Basu, Tibet
	15	Ni L. H. GS201601-4	Maqu, Gansu	60	Ni L. H. et al 2016XZ008-4	Basu, Tibet	
	16	Ni L. H. GS201601-5	Maqu, Gansu	T4	61	Ni L. H. et al 2016XZ008-5	Basu, Tibet
	17	Ni L. H. GS201601-6	Maqu, Gansu		62	Ni L. H. et al 2016XZ009-1	Basu, Tibet
	18	Ni L. H. GS201601-7	Maqu, Gansu		63	Ni L. H. et al 2016XZ009-2	Basu, Tibet
	19	Ni L. H. GS201601-8	Maqu, Gansu	64	Ni L. H. et al 2016XZ009-3	Basu, Tibet	
	20	Ni L. H. GS201601-9	Maqu, Gansu	T5	65	Ni L. H. et al 2016XZ011-1	Changdu, Tibet
	21	Ni L. H. GS201601-10	Maqu, Gansu		66	Ni L. H. et al 2016XZ011-2	Changdu, Tibet
	22	Ni L. H. GS201601-11	Maqu, Gansu		67	Ni L. H. et al 2016XZ011-3	Changdu, Tibet
	23	Ni L. H. GS201601-12	Maqu, Gansu		68	Ni L. H. et al 2016XZ011-4	Changdu, Tibet
	24	Ni L. H. GS201601-13	Maqu, Gansu		69	Ni L. H. et al 2016XZ011-5	Changdu, Tibet
	25	Ni L. H. GS201601-14	Maqu, Gansu		70	Ni L. H. et al 2016XZ011-6	Changdu, Tibet
	26	Ni L. H. GS201601-15	Maqu, Gansu		71	Ni L. H. et al 2016XZ011-7	Changdu, Tibet
G1	27	Ni L. H. et al GZ201601-1	Weining, Guizhou	72	Ni L. H. et al 2016XZ011-8	Changdu, Tibet	
	28	Ni L. H. et al GZ201601-2	Weining, Guizhou	73	Ni L. H. et al 2016XZ011-9	Changdu, Tibet	
	29	Ni L. H. et al GZ201601-3	Weining, Guizhou	74	Ni L. H. et al 2016XZ011-10	Changdu, Tibet	
	30	Ni L. H. et al GZ201601-4	Weining, Guizhou	75	Ni L. H. et al 2016XZ011-11	Changdu, Tibet	
	31	Ni L. H. et al GZ201601-5	Weining, Guizhou	76	Ni L. H. et al 2016XZ011-12	Changdu, Tibet	
	32	Ni L. H. et al GZ201601-6	Weining, Guizhou	77	Ni L. H. et al 2016XZ011-13	Changdu, Tibet	
	33	Ni L. H. et al GZ201601-7	Weining, Guizhou	78	Ni L. H. et al 2016XZ011-14	Changdu, Tibet	
	34	Ni L. H. et al GZ201601-8	Weining, Guizhou	79	Ni L. H. et al 2016XZ011-15	Changdu, Tibet	
	35	Ni L. H. et al GZ201601-9	Weining, Guizhou	S1	80	Ni L. H. SC201601-1	Kangding, Sichuan
	36	Ni L. H. et al GZ201601-10	Weining, Guizhou		81	Ni L. H. SC201601-2	Kangding, Sichuan
	37	Ni L. H. et al GZ201601-11	Weining, Guizhou		82	Ni L. H. SC201601-3	Kangding, Sichuan
	38	Ni L. H. et al GZ201601-12	Weining, Guizhou		83	Ni L. H. SC201601-4	Kangding, Sichuan
	39	Ni L. H. et al GZ201601-13	Weining, Guizhou		84	Ni L. H. SC201601-5	Kangding, Sichuan
40	Ni L. H. et al GZ201601-14	Weining, Guizhou	85		Ni L. H. SC201601-6	Kangding, Sichuan	
41	Ni L. H. et al GZ201601-15	Weining, Guizhou	86		Ni L. H. SC201601-7	Kangding, Sichuan	
G2	42	Ni L. H. et al GZ201602-1	Weining, Guizhou	87	Ni L. H. SC201601-8	Kangding, Sichuan	
	43	Ni L. H. et al GZ201602-2	Weining, Guizhou	88	Ni L. H. SC201601-9	Kangding, Sichuan	
	44	Ni L. H. et al GZ201602-3	Weining, Guizhou	89	Ni L. H. SC201601-10	Kangding, Sichuan	
	45	Ni L. H. et al GZ201602-4	Weining, Guizhou	S2	90	Ni L. H. SC201602-1	Daofu, Sichuan

Continued

Pop. ID	Sample No.	Voucher specimens	Locality	Pop. ID	Sample No.	Voucher specimens	Locality
	91	Ni L. H. SC201602-2	Daofu, Sichuan		130	Ni L. H. et al QH201405-2	Banma, Qinghai
	92	Ni L. H. SC201602-3	Daofu, Sichuan		131	Ni L. H. et al QH201405-3	Banma, Qinghai
	93	Ni L. H. SC201602-4	Daofu, Sichuan	T6	132	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-1	Bomi, Tibet
	94	Ni L. H. SC201602-5	Daofu, Sichuan		133	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-2	Bomi, Tibet
	95	Ni L. H. SC201602-6	Daofu, Sichuan		134	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-3	Bomi, Tibet
	96	Ni L. H. SC201602-7	Daofu, Sichuan		135	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-4	Bomi, Tibet
	97	Ni L. H. SC201602-8	Daofu, Sichuan		136	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-5	Bomi, Tibet
	98	Ni L. H. SC201602-9	Daofu, Sichuan		137	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-6	Bomi, Tibet
	99	Ni L. H. SC201602-10	Daofu, Sichuan		138	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-7	Bomi, Tibet
	100	Ni L. H. SC201602-11	Daofu, Sichuan		139	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-8	Bomi, Tibet
	101	Ni L. H. SC201602-12	Daofu, Sichuan		140	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-9	Bomi, Tibet
	102	Ni L. H. SC201602-13	Daofu, Sichuan		141	Zhao Z. L. et al 2017XZ006-10	Bomi, Tibet
	103	Ni L. H. SC201602-14	Daofu, Sichuan	T7	142	Zhao Z. L. et al 2017XZ007-1	Basu, Tibet
	104	Ni L. H. SC201602-15	Daofu, Sichuan		143	Zhao Z. L. et al 2017XZ007-2	Basu, Tibet
Y1	105	Ni L. H. et al YN201601-1	Lijiang, Yunnan		144	Zhao Z. L. et al 2017XZ007-3	Basu, Tibet
	106	Ni L. H. et al YN201601-2	Lijiang, Yunnan		145	Zhao Z. L. et al 2017XZ007-4	Basu, Tibet
	107	Ni L. H. et al YN201601-3	Lijiang, Yunnan		146	Zhao Z. L. et al 2017XZ007-5	Basu, Tibet
	108	Ni L. H. et al YN201601-4	Lijiang, Yunnan		147	Zhao Z. L. et al 2017XZ007-6	Basu, Tibet
	109	Ni L. H. et al YN201601-5	Lijiang, Yunnan		148	Zhao Z. L. et al 2017XZ007-7	Basu, Tibet
	110	Ni L. H. et al YN201601-6	Lijiang, Yunnan		149	Zhao Z. L. et al 2017XZ007-8	Basu, Tibet
	111	Ni L. H. et al YN201601-7	Lijiang, Yunnan	T8	150	Zhao Z. L. et al 2017XZ008-1	Zuogong, Tibet
	112	Ni L. H. et al YN201601-8	Lijiang, Yunnan		151	Zhao Z. L. et al 2017XZ008-2	Zuogong, Tibet
	113	Ni L. H. et al YN201601-9	Lijiang, Yunnan		152	Zhao Z. L. et al 2017XZ008-3	Zuogong, Tibet
	114	Ni L. H. et al YN201601-10	Lijiang, Yunnan		153	Zhao Z. L. et al 2017XZ008-4	Zuogong, Tibet
	115	Ni L. H. et al YN201601-11	Lijiang, Yunnan		154	Zhao Z. L. et al 2017XZ008-5	Zuogong, Tibet
	116	Ni L. H. et al YN201601-12	Lijiang, Yunnan		155	Zhao Z. L. et al 2017XZ008-6	Zuogong, Tibet
	117	Ni L. H. et al YN201601-13	Lijiang, Yunnan	T9	156	Zhao Z. L. et al 2017XZ009-1	Zuogong, Tibet
	118	Ni L. H. et al YN201601-14	Lijiang, Yunnan		157	Zhao Z. L. et al 2017XZ009-2	Zuogong, Tibet
	119	Ni L. H. et al YN201601-15	Lijiang, Yunnan		158	Zhao Z. L. et al 2017XZ009-3	Zuogong, Tibet
Y2	120	Ni L. H. YN201603-1	Lijiang, Yunnan		159	Zhao Z. L. et al 2017XZ009-4	Zuogong, Tibet
	121	Ni L. H. YN201603-2	Lijiang, Yunnan		160	Zhao Z. L. et al 2017XZ009-5	Zuogong, Tibet
	122	Ni L. H. YN201603-3	Lijiang, Yunnan	Y4*	161	Yang S. H. YN201701-1	Lijiang, Yunnan
	123	Ni L. H. YN201603-4	Lijiang, Yunnan		162	Yang S. H. YN201701-2	Lijiang, Yunnan
	124	Ni L. H. YN201603-5	Lijiang, Yunnan		163	Yang S. H. YN201701-3	Lijiang, Yunnan
Y3*	125	Ni L. H. YN201301-1	Lijiang, Yunnan	M**	164	Zhao Z. L. et al 2017XZ005-1	Bomi, Tibet
	126	Ni L. H. YN201301-2	Lijiang, Yunnan		165	Zhao Z. L. et al 2017XZ005-2	Bomi, Tibet
	127	Ni L. H. YN201301-3	Lijiang, Yunnan	H**	166	Ni L. H. et al GZ201603-1	Weining, Guizhou
	128	Ni L. H. YN201301-4	Lijiang, Yunnan		167	Ni L. H. et al GZ201603-2	Weining, Guizhou
Q	129	Ni L. H. et al QH201405-1	Banma, Qinghai				

预扩增 体系: 10×PCR Buffer 2 μL , MgCl_2 ($25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.2 μL , dNTP mixture ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 引物 EA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , 引物 MC ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL , 酶连产物 10 倍稀释液 2 μL , ddH_2O 补充至 20 μL , 离心混匀。循环参数: 95 $^\circ\text{C}$, 3 min; 94 $^\circ\text{C}$, 30 s, 56 $^\circ\text{C}$, 45 s, 72 $^\circ\text{C}$, 80 s, 30 cycles; 72 $^\circ\text{C}$, 8 min。预扩增产物稀释 20 倍作为选择性扩增模板。

选择性扩增 体系: 10×PCR Buffer 3 μL , MgCl_2 ($25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.8 μL , dNTP mixture ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.6 μL , 引物 1 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , 引物 2 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL , 预扩产物 20 倍稀释液 2 μL , ddH_2O 补充至 30 μL , 离心混匀。循环参数: 95 $^\circ\text{C}$,

5 min; 94 $^\circ\text{C}$, 30 s, 65 $^\circ\text{C}$ (每循环降低 0.7 $^\circ\text{C}$), 30 s, 72 $^\circ\text{C}$, 60 s, 12 cycles; 94 $^\circ\text{C}$, 30 s, 56 $^\circ\text{C}$, 45 s, 72 $^\circ\text{C}$, 80 s, 23 cycles; 72 $^\circ\text{C}$, 5 min。

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 上样, 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。银染法染色, 拍照。样品 1~167 按顺序点样 (三块胶); 同时为尽量减少由于样品处于不同胶板造成的读带误差, 粗茎秦艽每个居群均再取前 3 份样品平行点于另一块胶板中, 以做读带参照 (图 2)。

数据分析 在相同迁移率位置, 每个样品的扩增带按有 (记为“1”) 或无 (记为“0”) 记录, 只记录清晰易辨条带, 由此得到“0, 1”矩阵。使用 POPGENE 32 软件计算相关遗传参数; 同时使用 NTSYS pc-V.2.10e 进行 UPGMA 聚类分析, 以检验居群间和个体间的亲缘关

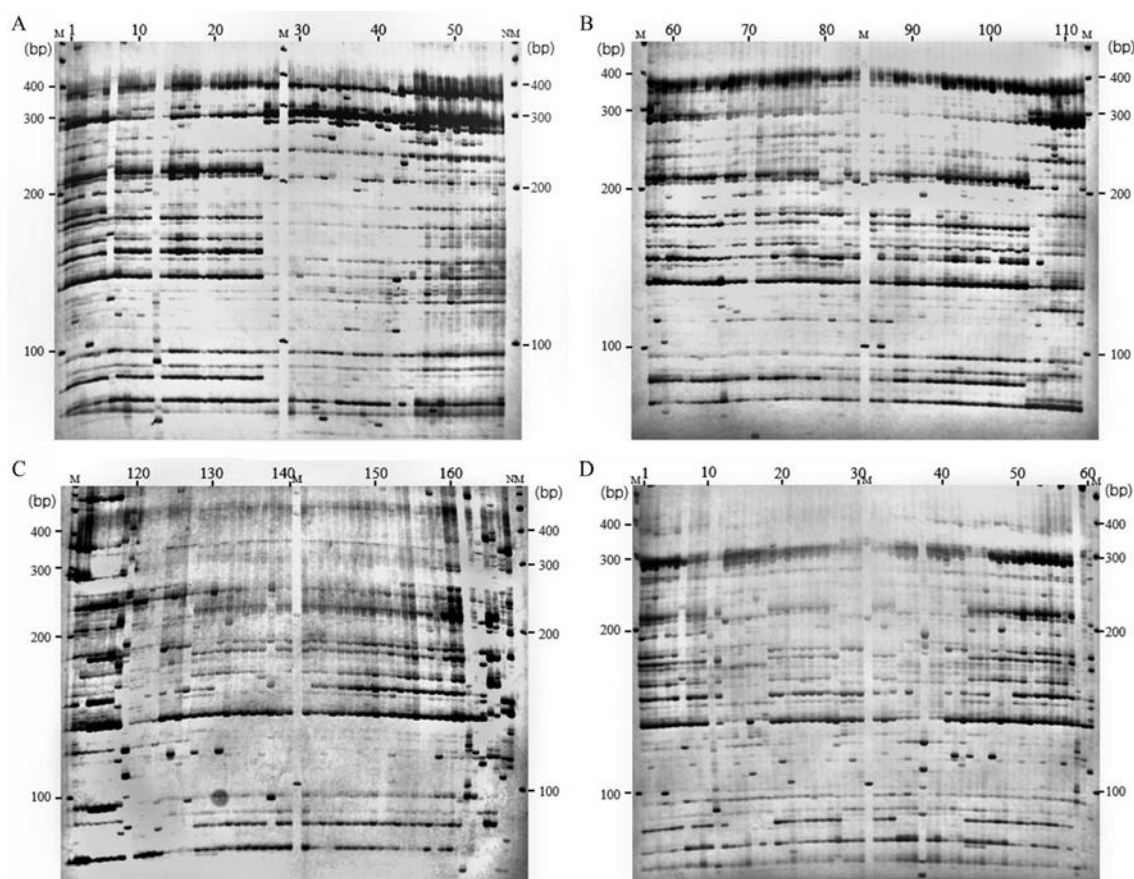


Figure 2 AFLP fingerprints of genomic DNA of *G. crassicaulis* using primer combination *Mse*I+CAG/*Eco*RI+ACG. M: SM0331 DNA Ladder; N: Negative; A-C: *G. crassicaulis* (lanes 1-163), *G. straminea* (lanes 164-165) and *Halenia elliptica* (lanes 166-167); D: Populations of *G. crassicaulis*. T1 (lanes 1-3), T2 (lanes 4-6), K1 (lanes 7-9), K2 (lanes 10-12), G1 (lanes 13-15), G2 (lanes 16-18), T3 (lanes 19-21), T4 (lanes 22-24), T5 (lanes 25-27), S1 (lanes 28-30), S2 (lanes 31-33), Y1 (lanes 34-36), Y2 (lanes 37-39), Y3 (lanes 40-42), Q (lanes 43-45), T6 (lanes 46-48), T7 (lanes 49-51), T8 (lanes 52-54), T9 (lanes 55-57) and Y4 (lanes 58-60)

系。利用 GenAlEx 6.5 软件进行 PCA 分析、分子方差分析 (AMOVA)、Mantel 检验以及空间自相关分析。

cpDNA SSR 及 SNP 标记分析 为探讨四川康定县居群 S1 的分化问题, 测定 cpDNA *psbI-trnS* (GCU)、*trnS* (GCU)-*trnG* (UCC)、*rpoB-trnC* (GCA) 及 *ycf3* intron1 序列, 以筛选 SSR 标记; 测定 cpDNA *ccsA*、*petA-psbJ*、*rpl16* intron 及 *rpl33* 序列, 以筛选 SNP 标记。

结果

1 “解吉那保”基原植物形态特征及分类学位置

多年生草本。茎基部被枯存的纤维状叶鞘包裹。基生叶莲座丛状; 茎生叶对生, 最上部叶密集呈苞叶状包被花序。花多数, 茎顶簇生呈头状; 花冠冠檐蓝紫色, 长 2~2.2 cm。我国特有物种。分布于西藏、云南、四川、贵州、青海及甘肃等省区。生于山坡草地、高山草甸、灌丛等, 海拔 2 100~4 500 m。形态特征及后选模式标本 (Lectotype, Pratt 463; K!) 见图 3。

经查阅模式标本、参考相关分类学文献并进行分类学鉴定, 其基原为龙胆科龙胆属 *Gentiana* 秦艽组 Sect. *Cruciata* 植物粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.。据此, 对实验中所涉及的各居群标本逐一鉴定, 以确保物种遗传背景分析结果的科学性。

2 AFLP 扩增结果

从 64 对“3+3”引物组合中筛选出扩增带纹清晰, 多态性丰富且多态性位点百分率较高的引物组合 12 对, 对样品进行扩增。扩增片段多在 50~500 bp 之间, 共获得 315 个位点, 其中多态性位点 (PL) 254 个, 多态位点百分率 (PPL) 平均值为 80.63%, 表明粗茎秦艽种质资源的遗传背景存在一定多样性。每对引物扩增情况见表 2, 其中 *Mse*I +CAG/*Eco*RI +ACG 扩增图谱见图 2。

3 粗茎秦艽遗传多样性以及居群的遗传分化

对检测群体遗传多样性指标多态位点百分率 (PPL)、观察等位基因数 (N_o)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性 (H) 及 Shannon 信息指数 (I_m) 进行统



Figure 3 *Gentiana crassicaulis* (Zhao ZL, et al 2017XZ009, alt. 3928 m, Zuogong, Tibet). A: Habit; B: Inflorescence; C: Lectotype (Pratt 463; K!)

Table 2 Selective amplification of the restriction fragments within *G. crassicaulis* using 12 primer combinations. PPL: Percentage of polymorphic loci

Primer combination	Amplified loci	PL	PPL/%	Primer combination	Amplified loci	PL	PPL/%
<i>MseI</i> +CAG/ <i>EcoRI</i> +AAC	31	29	93.55	<i>MseI</i> +CTG/ <i>EcoRI</i> +ACC	41	40	97.56
<i>MseI</i> +CAG/ <i>EcoRI</i> +ACG	26	23	88.46	<i>MseI</i> +CTG/ <i>EcoRI</i> +ACG	12	10	83.33
<i>MseI</i> +CTC/ <i>EcoRI</i> +AAC	42	36	85.71	<i>MseI</i> +CTT/ <i>EcoRI</i> +AAG	9	6	66.67
<i>MseI</i> +CTG/ <i>EcoRI</i> +AAC	36	28	77.78	<i>MseI</i> +CTT/ <i>EcoRI</i> +ACA	18	12	66.67
<i>MseI</i> +CTG/ <i>EcoRI</i> +ACA	19	12	63.16	<i>MseI</i> +CTT/ <i>EcoRI</i> +AAG	41	25	60.98
<i>MseI</i> +CTG/ <i>EcoRI</i> +ACT	21	19	90.48	<i>MseI</i> +CTT/ <i>EcoRI</i> +ACG	19	14	73.68
Total					315	254	80.63

计, 结果见表3。粗茎秦艽居群PPL变化区间为0.95%~19.37%, 平均百分比为6.85%; N_a 变化区间为1.009 5~1.193 7, 平均为1.068 7; N_e 变化区间为1.005 4~1.126 2, 平均为1.039 9; H 变化区间为0.0038~0.073 6, 平均为0.023 3; I_m 变化区间为0.005 2~0.109 2, 平均为0.035 0。物种水平的 N_a 则为1.727 0, N_e 为1.315 0, H 为0.189 9, I_m 为0.292 7。显示粗茎秦艽物种不同居群间遗传多样性有差异, 其中Y4居群遗传多样性水平最高, Nei's基因多样性和Shannon信息指数最大, 分别为0.073 6和0.109 2。

POPGENE分析软件显示: 粗茎秦艽居群总变异系数(H_t : total genetic diversity for species)为0.185 3, 群体内的遗传多样性(H_s : genetic diversity within populations)为0.023 3, 群体间的遗传多样性(D_{st} : inter-subpopulation gene diversity)为0.162 0, 遗传分化系数

(G_{st} : coefficient of gene differentiation)为0.874 3, 基因流(N_m : gene flow)为0.071 9。居群间遗传分化远高于居群内, 遗传变异主要存在于居群间(87%), 居群内部的遗传变异较小(13%)。

GenAlEx 6.5软件AMOVA分析时, 居群间的遗传分化系数一般用分化指数 F_{st} 表示, 它通过等位基因频率计算得到, 但其需要居群处于Hardy-Weinberg平衡时才有意义^[19,20]。由于AFLP为显性标记, 不能满足此条件, 通常以AMOVA分析计算的 F_{st} 相似数 Φ_{st} (即表4中的PhiPT值)来代替, 而 G_{st} 是POPGENE1.32软件在假定Hardy-Weinberg平衡情形下估算的居群间的遗传分化值。因此, G_{st} 与 Φ_{st} 都是 F_{st} 的近似值^[21]。由此, G_{st} 和 Φ_{st} 分别为0.874 3和0.866, 二者非常接近, AMOVA分析和POPGENE分析软件的相关推断相吻合, 见表

Table 3 Analysis of genetic diversity within populations. N_a : Observed number of alleles; N_e : Effective number of alleles; H : Gene diversity; I_m : Shannon's Information index

Pop. ID	Indiv. No.	PL	PPL /%	N_a	N_e	H	I_m	Pop. ID	Indiv. No.	PL	PPL /%	N_a	N_e	H	I_m
T1	3	4	1.27	1.012 7	1.005 4	0.003 8	0.006 1	S2	15	19	6.03	1.060 3	1.030 6	0.018 2	0.027 7
T2	3	3	0.95	1.009 5	1.005 7	0.003 5	0.005 2	Y1	15	46	14.6	1.146 0	1.082 2	0.048 7	0.073 3
K1	5	14	4.44	1.044 4	1.028 5	0.016 1	0.023 9	Y2	5	13	4.13	1.041 3	1.024 3	0.014 4	0.021 7
K2	15	12	3.81	1.038 1	1.019 6	0.012 3	0.018 8	Y3	4	38	12.06	1.120 6	1.072 0	0.042 2	0.063 6
G1	15	29	9.21	1.092 1	1.049 1	0.028 1	0.042 2	Q	3	5	1.09	1.015 9	1.006 8	0.004 8	0.007 6
G2	15	37	11.75	1.117 5	1.068 8	0.038 8	0.057 9	T6	10	23	7.30	1.073 0	1.037 7	0.022 0	0.033 4
T3	5	18	5.71	1.057 1	1.034 8	0.020 0	0.029 9	T7	8	7	2.22	1.022 2	1.014 9	0.008 2	0.012 0
T4	3	3	0.95	1.009 5	1.005 7	0.003 5	0.005 2	T8	6	11	3.49	1.034 9	1.013 7	0.009 0	0.014 5
T5	15	20	6.35	1.063 5	1.031 2	0.018 8	0.028 7	T9	5	20	6.35	1.063 5	1.041 0	0.023 2	0.034 4
S1	10	50	15.87	1.158 7	1.099 8	0.056 7	0.084 2	Y4	3	61	19.37	1.193 7	1.126 2	0.073 6	0.109 2

Table 4 AMOVA based on AFLP data set from *G. crassicaulis*. PhiPT = AP/(WP+AP) = AP/TOT, AP = Est. Var. Among Pops, WP = Est. Var. Within Pops. The significance test for PhiPT was based on 999 permutations across the full data set ($P < 0.001$)

Variation source	df	Est. Var.	Percentage /%	PhiPT	P value
Among population	19	27.305	87	0.866	<0.001
Within population	143	4.232	13		
Total variation	162	31.536	100		

4. 遗传分化指数 F_{st} 在 0~0.05 之间表示群体间无分化; 0.05~0.15 间为中度分化; 0.15~0.25 间为高度分化; 大于 0.25 表示极高的分化^[22]。显然, 粗茎秦艽不同居群间遗传分化高, 遗传差异显著性极大。

4 聚类分析

4.1 居群聚类分析 采用非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 进行聚类分析, 结果显示: 首先外类群龙胆科花锚属椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* 及龙胆属近缘种麻花苳 *G. straminea* 被依次分出; 而粗茎秦艽 *G. crassicaulis* 所有 20 个居群共聚为另一大支。粗茎秦艽物种内, 则分为 I、II 两支: 支 I 由西藏、甘肃、青海及四川各居群组成, 支 II 由贵州及云南各居群组成; 同时, 除云南 Y4 居群 (栽培) 外, 相同省区内各居群均分别聚为一支, 显现出高度的地域相关性, 即相同居群个体或空间距离较近的居群多显示出更为接近的亲缘关系 (图 4)。

4.2 个体聚类分析 基于粗茎秦艽物种 163 份种质构建 UPGMA 聚类树。拓扑结构基本一致: 首先, 外类群分出; 物种内分为两大支, 西藏、甘肃、青海及四川大部分个体 (S2 居群全部个体及由 S1 居群 7 株个体组成的

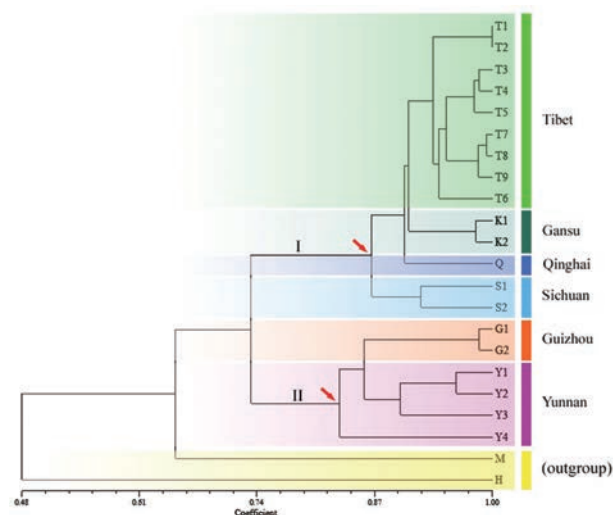


Figure 4 UPGMA phenogram based on AFLP data set from 20 populations of *G. crassicaulis*. Outgroup: *G. straminea* and *Halenia elliptica*

S1b) 构成支 I; 值得注意的是, 支 II 除了包括贵州及云南各居群个体, 四川少数个体 (S1 居群 3 个组成的 S1a) 也在此聚类 (图 5)。

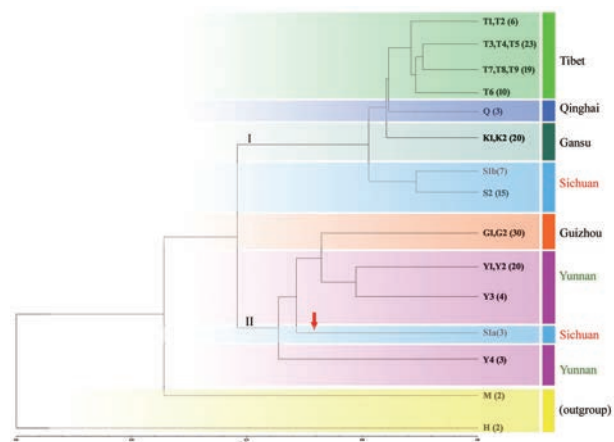


Figure 5 UPGMA phenogram based on AFLP data set from 163 individuals of *G. crassicaulis*. Outgroup: *G. straminea* and *H. elliptica*. In brackets: Individual numbers

5 PCA 分析

主成分分析 (PCA) 可直观反映种质之间的遗传及分类学特性。GenAlEx 6.5 软件^[23-25]分析显示: 前两个坐标分别占总遗传变异的 40.46% 和 11.57%; 总体结果与 UPGMA 聚类树拓扑结构基本一致, 均表现出明显的地理相关性。外类群椭圆叶花锚 *H. elliptica* 及麻花苳 *G. straminea* (M, H) 在第 III 象限。四川居群 S1 共有 10 株个体, 除了其中 3 个外, 甘肃、青海及四川其余个体均位于第 IV 象限, 西藏样品均位于第 I 象限。贵州居群集中在第 II 象限。云南居群均位于第 III 象限, 其中, 2 个野生居群 (Y1、Y2) 个体位置较为集中, 而栽培个体 (Y3、Y4) 较为分散; 四川居群 S1 另 3 株个体亦在此象限 (图 6)。

6 Mantel 检验及空间自相关分析

Mantel 检验显示: 粗茎秦艽居群间遗传距离与地理距离具有显著正相关关系, 相关系数 $R_{xy} = 0.541$, 且极其显著 ($P < 0.01$)。随着地理距离增加, 物种内居群间遗传距离显著增大, 地理分布特性是影响粗茎秦艽种群遗传结构的重要因素之一。

空间自相关分析 (spatial autocorrelation analysis), 将采样点地理距离划分为不同等级, 用空间自相关系数检验特定距离等级内各群体的遗传结构是否符合随机分布假设。若群体存在显著遗传差异, 自相关系数可以量化差异的程度^[26]。根据粗茎秦艽各居群分布, 划分 100、200、300、...、1 000 km 共 10 个距离等级, 计算不同距离等级下的多位点相关系数 $r^{[27]}$ 。该系数值

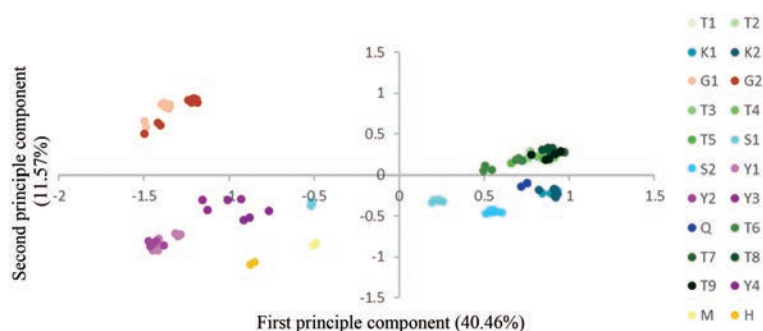


Figure 6 PCA based on AFLP data set from 163 individuals of *G. crassicaulis*. Outgroup: *G. straminea* and *H. elliptica*

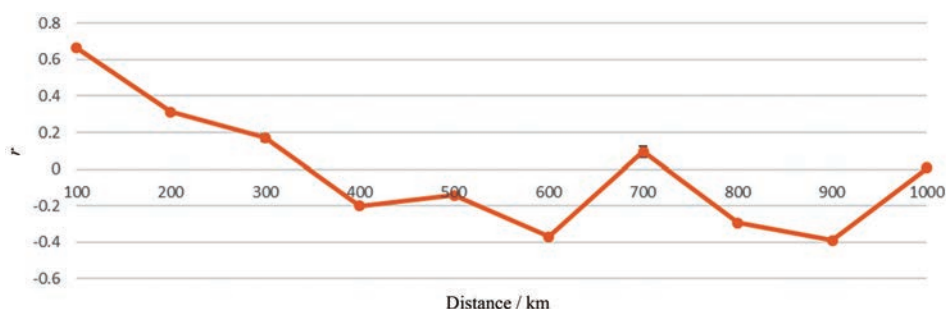


Figure 7 Correlogram of the spatial autocorrelation analysis on 20 populations of *G. crassicaulis*

介于-1 到 1 之间, 为 0 时表示不存在空间自相关^[28]。结果显示: 居群间距离在小于 350 km 时, $r > 0$, 呈现显著性正相关; 在 350~1 000 km 时, $r < 0$, 呈现显著性负相关。在一定范围内, 距离越小, r 值越大。提示: 居群间距离对于其遗传相似度有显著影响, 邻近群体具有较高的遗传相似度 (图 7)。

7 四川康定县居群 S1 的 cpDNA SSR 及 SNP 标记

对 cpDNA *psbI-trnS* (GCU)-*trnS* (GCU)-*trnG* (UCC)-*rpoB-trnC* (GCA) 及 *ycf3* intron1 序列中 SSR 标记分析显示: S1a 3 份种质内与 S1b 7 份种质内位点分别保持一致, 两者只有 1 个位点相同, 差异较为明显; 而 S1b 和居群 S2 有 3 个位点相同, 显示了更为接近的亲缘关系 (表 5)。cpDNA *ccsA*、*petA-psbJ*、*rpl16* intron 及 *rpl33* 序列中 SNP 标记分析显示: S1a 3 份种质内与 S1b 7 份种质内位点分别保持一致, 两者存在 4 个位点变异, 而 S1b 和居群 S2 则无差异; SSR 与 SNP 标记均支持 AFLP 指纹谱分析结果 (表 6)。

Table 5 The polymorphic cpSSR loci of *G. crassicaulis* in Sichuan Province. *Location/sequence length (bp)

Pop. ID	<i>psbI-trnS</i> (GCU) 76/104*	<i>trnS</i> (GCU)- <i>trnG</i> (UCC) 149/539	<i>rpoB-trnC</i> (GCA) 1157/1264	<i>ycf3</i> intron1 1825/1984
S1a ($n = 3$)	10A	11A	9A	10A
S1b ($n = 7$)	9A	12A	9A	11A
S2 ($n = 3$)	9A	12A	10A	11A

Table 6 The cpDNA SNPs of *G. crassicaulis* in Sichuan Province. *Location/sequence length (bp)

Pop. ID	<i>ccsA</i> 978/984*	<i>petA-psbJ</i> 90/840	<i>rpl16</i> intron 167/1170	<i>rpl33</i> 176/201
S1a ($n = 3$)	T	C	A	C
S1b ($n = 7$)	G	A	G	A
S2 ($n = 3$)	G	A	G	A

讨论

国产特有物种粗茎秦艽 *G. crassicaulis*, 自然分布区涉及范围广, 各居群个体生长小环境复杂多样; 植株高矮, 基生叶的较宽或较窄, 花色 (蓝色、灰色及乳白色等) 等亦有变化。如何把握种内个体形态特征的变异幅度, 准确鉴定不同产地实验样本, 是构建物种 AFLP 指纹谱关键的第一步。课题组在多年野外考察、分布区广泛取样 (6 省区 20 个居群 163 株个体) 基础上, 结合模式标本查阅与形态学观察与比较, 进而开展物种鉴定; 同时, 以龙胆科花锚属椭圆叶花锚 *H. elliptica* 及龙胆属近缘种麻花艽 *G. straminea* 为外类群, 用于系统学分析等, 结果显示, 首先外类群被依次分出; 而粗茎秦艽物种所有 20 个居群共聚为另一大支, 鉴定工作达到预期目标。

道地药材是传统公认且来源于特定产地的名优正品药材, 为进一步揭示中药材道地性的科学内涵, 有许多工作要做^[29]。内生菌与植物的互作关系及对宿主代谢的影响是近年来热点领域之一, 其在探讨药用植物

道地性成因方面, 拓展了新的思路^[30]。本工作基于筛选的12对引物组合, 构建的AFLP指纹谱, 在一定程度上反映出粗茎秦艽物种的遗传特性; 亦显示了AFLP分子标记技术在解析物种内不同个体遗传背景与产地空间地理相关性等方面的优势。因此, AFLP分子标记结合多学科新方法开展相关工作, 将深化对中药材道地性的认知。

藏药材传统生产方式多为就地采集野生资源加以利用。“解吉那保”主流品种之一粗茎秦艽分布于西藏、云南、四川、贵州、青海及甘肃等省区, 自然分布区内不同产地(居群)AFLP指纹谱各有特性, 其次生产物是否亦有一定差异, 对药材质量是否会产生影响, 值得进一步探讨。

有研究表明^[31], 青藏高原特有种菊叶红景天 *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae) 遗传变异主要存在于居群间(77.3%); 造成居群间高度分化的主要因素可能是在恶劣的山地环境中种群的历史、地理和遗传隔离。本研究工作显示, 粗茎秦艽种内存在丰富的遗传多样性, 且遗传变异亦主要存在于居群间。遗传多样性丰富可能与物种生长环境复杂, 基因流受阻以及长期的自然选择有关。同时, Mantel 检验表明粗茎秦艽居群间遗传距离与地理距离具有显著的正相关关系; 有关高山植物紫花针茅 *Stipa purpurea* 的研究^[32]也发现了同样的规律。

在个体聚类与PCA等分析中注意到: 来自四川康定县的居群S1, 其10个种质被分为S1a、S1b两类, 比例为3:7。S1a显示了与S1b及四川道孚县居群S2较远的亲缘关系。此状况, 在指纹谱中亦有反映(图2, 泳道80~89)。为此, 尝试结合序列分子标记探究其原因。获得的叶绿体基因组SSR及SNP标记均支持AFLP指纹谱分析结果(表5、6)。

聚类分析显示, 粗茎秦艽在自然分布区内种群分化为两大支, 一支由西藏、甘肃、青海及四川各居群组成, 另一支由贵州及云南各居群组成。这是否暗含物种起源、迁移路线与分化的规律性? 值得应用植物群体遗传学、谱系地理学以及传粉生物学等多学科的证据来深入探究。同时, AFLP指纹技术显现了在种下居群甚至个体遗传特性间的分辨率, 相信结合居群次生产物指纹分析等, 将在药材道地性探究及系统的种质资源保护等方面有更为广阔的应用前景。

作者贡献: 宗粉粉是本文的第一作者, 负责分子生物学实验及稿件撰写; 倪梁红负责样品采集工作; 嘎务负责民族植物学考察; 刘铜华参与研究工作总体设计; 赵志礼为本文的通讯作者, 负责样品分类学鉴定、研究工作总体设计及稿件修改等工作。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Ho TN. Gentianaceae in Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol 62 (中国植物志: 62卷)[M]. Beijing: Science Press, 1988: 59-75.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 一部)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 270-271.
- [3] Yang YC. Tibetan Medicine (藏药志) [M]. Xining: Qinghai People Press, 1991: 11-12.
- [4] Dimaer Danzeng Pengcuo. Jing Zhu Ben Cao (晶珠本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 1986: 119.
- [5] Zhao ZL, Dorje Gaawe, Wang ZT. Identification of medicinal plants used as Tibetan Traditional Medicine Jie-Ji [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132: 122-126.
- [6] Ni LH, Zhao ZL. A morphometric comparison of three closely related species of *Gentiana* (Gentianaceae), endemic to the region of the Qinghai-Tibet Plateau [J]. Botany, 2018, 96: 209-215.
- [7] Ni LH, Zhao ZL, Xu HX, et al. Chloroplast genome structures in *Gentiana* (Gentianaceae), based on three medicinal alpine plants used in Tibetan herbal medicine [J]. Curr Genet, 2017, 63: 241-252.
- [8] Ni LH, Zhao ZL, Xiong B, et al. A strategy for identifying six species of Sect. *Cruciata* (*Gentiana*) in Gansu using DNA barcode sequences [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 821-827.
- [9] Wei SJ, Zhao ZL, Ni LH, et al. Taxonomic identification of Tibetan herb Bawo Sebo and its chloroplast genome structure [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1009-1015.
- [10] Lu JN, Zhao ZL, Ni LH, et al. The identification of Sect. *Cruciata* (*Gentiana*) species using mtDNA *nad1/b-c* and *nad5/d-e* fragments [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 166-172.
- [11] Zhou XJ, Xu HF, Shun QS. Resource Science of Chinese Medicinal Materials (中药资源学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Literature Press, 2007: 370.
- [12] Arif IA, Bakir MA, Khan HA, et al. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11: 2079-2096.
- [13] Li YL, Fan YF, Dai GL, et al. Analysis of genetic diversity for wolfberry germplasms by AFLP technology [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 770-773.
- [14] Li YB, Wang L, He ZJ, et al. AFLP analysis on genetic diversity of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Bot Res (植物学研究), 2018, 7: 45-53.
- [15] Du CH, Pu CX, Liu XL, et al. AFLP analysis of genetic diversity of *Aconitum brachypodum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 439-443.
- [16] Zhang Z, Jian JY, Wang Z. AFLP analysis on genetic diversity of *Akebia trifoliata* in Qinling Mountains of Shaanxi [J]. Chin

- Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 3890-3895.
- [17] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15.
- [18] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
- [19] Lynch M, Milligan BG. Analysis of population genetic structure with RAPD markers [J]. Mol Ecol, 1994, 3: 91-99.
- [20] Palacios C, González-Candelas F. Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium duforii* (Plumbaginaceae) [J]. Mol Ecol, 1997, 6: 1107-1121.
- [21] Zhang DQ, Yang YP. A statistical and comparative analysis of genetic diversity detected by different molecular markers [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2008, 30: 159-167.
- [22] Wright S. Evolution in mendelian populations [J]. Genetics, 1931, 16: 97-159.
- [23] Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update [J]. Bioinformatics, 2012, 28: 2537-2539.
- [24] Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Mol Ecol Notes, 2010, 6: 288-295.
- [25] Li X. Introduction to a population genetic software – GENALEX 6 [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2008, 27: 59-62.
- [26] Wen B. Y Chromosome, mtDNA Polymorphisms and Genetic Structure of East Asian Population (Y 染色体、mtDNA 多态性与东亚人群的遗传结构) [D]. Shanghai: Fudan University, 2003.
- [27] Smouse PE, Peakall R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure [J]. Heredity, 1999, 82: 561-573.
- [28] Yang AH, Zhang JH, Tian H, et al. Microsatellite genetic diversity and fine-scale spatial genetic structure within a natural stand of *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae) in Lanmushan, Duyun City, Guizhou Province [J]. Biodiv Sci (生物多样性), 2014, 22: 375-384.
- [29] Xiao XH, Chen SL, Huang LQ, et al. Survey of investigation on Daodi Chinese medicinal materials in China since 1980s [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2009, 34: 519-523.
- [30] Cui JL, Guo SX, Xiao PG. Interaction between endophytes and host plant and the role of endophytes in genuineness analysis of medicinal plant [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 214-221.
- [31] Xia T, Chen SL, Chen SY, et al. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae) [J]. Biochem System Ecol, 2007, 35: 209-214.
- [32] Liu WS, Dong M, Song ZP, et al. Genetic diversity pattern of *Stipa purpurea* populations in the hinterland of Qinghai-Tibet Plateau [J]. Ann Appl Biol, 2009, 154: 57-65.