

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202006051

李嘉惠, 欧晓华, 邓文静, 等. 基于 SRAP 分子标记构建何首乌核心种质库 [J]. 广西植物, 2021, 41(11): 1920–1930.
LI JH, OU XH, DENG WJ, et al. Construction of core germplasm bank of *Fallopia multiflora* using SRAP molecular markers [J]. *Guihaia*, 2021, 41(11): 1920–1930.



基于 SRAP 分子标记构建何首乌核心种质库

李嘉惠¹, 欧晓华¹, 邓文静¹, 罗可可¹, 张宏意^{1,2}, 何梦玲^{1,2}, 严寒静^{1,2*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006; 2. 国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点研究室, 广州 510006)

摘要: 为保护何首乌遗传种质多样性, 该文运用 SRAP 分子标记方法探究了 44 个产地 327 份何首乌种质的遗传多样性和居群结构, 采用 3 种取样策略及 6 种比例抽样模式构建核心种质库, 经 t 检验比较后筛选较优的核心种质构建方法和具有代表性的核心种质。结果表明: (1) 何首乌种质遗传多样性较丰富, 其观察等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Shannon 信息指数 (I) 和 Nei's 遗传多样性指数 (H) 分别为 1.984 3、1.454 9、0.271 7 和 0.417 9, 另外何首乌种质居群间遗传分化程度大, 基因交流较少, 基因差异分化系数 (G_{st}) 为 0.753 1, 基因交流值 (N_m) 仅有 0.163 9。(2) 根据样品间遗传距离, 采用邻接法对样品进行聚类, 聚类结果显示 327 份样品主要分成四大类, 样品分组结果与地理分布相符, 相同采集点样品可聚在同一类中。(3) 居群结构分析结果显示, 当 $K=16$ 时, 其 ΔK 值最大, 说明样品分成 16 个类群时最佳, 同时大部分何首乌样品的血统组成较单一 ($Q>0.600$), 相同采集点样品血统组成相似, 可大致归在同一类群中。(4) t 检验结果显示, 采用居群结构分类-比例取样和 10% 抽样比例构建的种质库, 4 个遗传参数的保留率高, N_a 、 N_e 、 I 和 H 的保留值分别为 99.0%、101.9%、106.4% 和 105.9%, 样品量较少, 且多样性与原种质库无明显差异 ($P>0.05$)。(5) 核心种质库由 34 份样品组成, 包括 9 份栽培样品和 25 份野生样品, 主要来源于四川、重庆和贵州。该研究构建的核心种质库能代表原种质库的遗传多样性, 可为种质资源的收集和新品种的选育提供参考, 所采用的研究方法对其他植物核心种质库的构建具有一定参考意义。

关键词: 何首乌, 核心种质构建, SRAP, 遗传多样性, 居群结构

中图分类号: Q948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)11-1920-11

Construction of core germplasm bank of *Fallopia multiflora* using SRAP molecular markers

LI Jiahui¹, OU Xiaohua¹, DENG Wenjing¹, LUO Keke¹, ZHANG Hongyi^{1,2},
HE Mengling^{1,2}, YAN Hanjing^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Production & Development of Cantons Medicinal Materials, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to protect the genetic diversity of *Fallopia multiflora*, in this study, SRAP molecular marker method was used to explore the genetic diversity and population structure of 327 *F. multiflora* samples from 44 habitats. Three sampling strategies and six proportional sampling modes were used to construct the core germplasm bank. After t -Test comparison, the better core germplasm construction method and the representative core germplasm samples were selected. The results were as follows: (1) The genetic diversity of *F. multiflora* germplasm was abundant, and number of

收稿日期: 2020–10–15

基金项目: 广东省科技厅项目(2017A020213023) [Support by Project of Guangdong Science and Technology Department (2017A020213023)].

作者简介: 李嘉惠(1994–), 硕士研究生, 主要从事中药资源开发与品质评价研究, (E-mail) 787517019@qq.com。

*通信作者: 严寒静, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药资源开发与品质评价研究, (E-mail) yanhanjing1211@163.com。

observed alleles (N_a), number of effective alleles (N_e), Shannon information index (I) and Nei's genetic diversity index (H) were 1.984 3, 1.454 9, 0.271 7 and 0.417 9, respectively. In addition, the population of *F. multiflora* germplasm showed a high degree of genetic differentiation, but less gene exchange, with a gene differentiation coefficient (G_{st}) of 0.753 1 and a gene flow (N_m) of 0.163 9. (2) According to the genetic distance between samples, the Neighbor-Joining method was used to cluster the samples. The results showed that the 327 samples were mainly divided into four categories. The grouping results were consistent with the geographical distribution, and the samples at the same collection point could be clustered into the same category. (3) Population structure analysis showed that the biggest ΔK value was obtained when $K = 16$, indicating that the sample should be divided into 16 groups, at the same time, the lineages composition of most *F. multiflora* samples were relatively simple, and the samples from the same collection point had similar lineages and could be roughly grouped in the same group. (4) The t -test showed that when population structure classification-proportional sampling and 10% sampling proportion were used to construct the germplasm bank, the retention rate of the four genetic parameters was high. The retention rate of N_a , N_e , I and H values were 99.0%, 101.9%, 106.4% and 105.9%, respectively, the sample size was small, and the diversity was not significantly different from the original germplasm bank ($P > 0.05$). (5) The core germplasm bank consisted of 34 samples, including 9 cultivated samples and 25 wild samples, mainly from Sichuan, Chongqing and Guizhou provinces. The core germplasm bank constructed in this experiment can represent the genetic diversity of the original germplasm bank, and the results can provide reference for the collection of germplasm resources and breeding of new varieties. The method used in the experiment has certain reference significance for the construction of other plant core germplasm banks.

Key words: *Fallopia multiflora*, construction of core germplasm, SRAP

何首乌 (*Fallopia multiflora*) 为蓼科多年生草本植物, 适应力强, 在我国 204 个县 (市) 均有分布 (陈亚等, 2011)。其喜光耐贫瘠, 地下膨大的块根和地上生长的茎藤 (首乌藤) 均可入药, 以块根入药为主, 生用可以截疟解毒、润肠通便, 炮制后可补益精血、固肾乌须。随着人们生活水平的提高, 具有补益作用的何首乌市场需求量日渐攀升。药材市场中, 野生何首乌是何首乌商品的重要来源。然而, 研究人员调查结果显示, 野生何首乌的资源供应量正以每年约 15% 的速度递减 (刘红昌等, 2013)。何首乌的繁殖方式包括种子繁殖、扦插繁殖、组织培养快速繁殖及压条繁殖等, 其中扦插繁殖操作简单、成活率高, 是目前农户规模化种植的常用方式。但是, 长期的扦插繁殖会导致品种退化, 从而影响何首乌药材的质量 (曾文丹等, 2016)。野生资源的枯竭和栽培种质的退化会造成物种遗传多样性的减少, 降低生存和适应环境变化能力, 同时也会导致优良基因丢失, 严重影响何首乌的可持续发展和利用。因此, 加强种质研究, 进而构建何首乌的核心种质库, 对何首乌资源实施有针对性和高效保护是亟待进行的任务。然而, 至今尚无何首乌核心种质构建的相关报道。

SRAP (sequence related amplified polymorphism) 标记方法由 Li & Quiros (2001) 于 2001 年创立, 相对其他标记方法, 其具备分布普遍、可靠性和重复性高、技术难度低和多态性高等特点, 在植物遗传

基因图谱、植物遗传多样性和亲缘关系的分析以及基因转录图谱的构建上均有普遍应用 (杨金华, 2019)。程远辉 (2007) 在研究重庆地区何首乌遗传多样性时, 较长时间使用 RAPD 标记方法进行研究, 由于结果显示扩增条带少、重复性差, 因此最终选择 SRAP 标记方法进行研究。可见, SRAP 标记方法在何首乌遗传多样性研究上的优势。本研究利用前期筛选的 13 对 SRAP 引物对 44 个产地 327 份何首乌样品的遗传多样性进行研究, 采用邻接法聚类-比例取样、居群结构分类-比例取样和最小距离逐步聚类取样 3 种取样策略, 以及 5%、10%、15%、20%、25% 和 30% 共 6 种比例抽样模式, 通过 t 检验对上述方法构建的初始种质进行评价, 筛选出较好的取样策略和抽样比例, 从而构建何首乌核心种质库。

1 材料与方法

1.1 材料

2017—2019 年, 采集 327 份何首乌叶片样品, 经广东药科大学中药学院刘基柱副教授鉴定为蓼科何首乌属植物何首乌 (*Fallopia multiflora*)。样品覆盖我国 12 个省 44 个地点, 其中 218 份为栽培居群样品, 109 份为野生居群样品。栽培居群样品中包含 1 份棱枝何首乌 (*Fallopia multiflora* var. *angulatum*), 原种来自广西, 栽培于广东药科大学

药用植物园,具体信息见表 1。

1.2 PCR 扩增、产物检测及数据统计方法

选用植物 DNA 提取试剂盒(宝生物工程有限公司,产品型号 9768)对何首乌叶片的基因组 DNA 进行提取。利用前期筛选得到的 13 对引物对 327 份何首乌基因组 DNA 进行扩增,引物信息见表 2。反应体系的总体积为 20 μL ,包括 10 μL premix(宝生物工程有限公司,产品型号 RR902A),正反向引物(引物母液浓度为 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)各 1 μL ,DNA 模板 40 ng ,并用 ddH_2O 补充体积至 20 μL ;PCR 反应程序为 SRAP 标记方法的一般程序,即 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

使用条带识别软件 Quantity-One 加人工识别的方式统计非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图上各泳道的条带迁移距离,相同位置有条带则记为 1,无则为 0,并建立二维数据矩阵。利用 NTsyspc、Popgen 32、MEGA 7 和 Structure 2.3.4 软件对数据进行统计分析,获得何首乌种质的遗传多样性参数、遗传距离、样品聚类 and 居群结构分析结果。在居群结构分析时,假设何首乌居群可以分成 $K=1\sim 23$ 个,并采用 Evanno et al.(2005)的方法计算 ΔK 值,从而获得最佳的类群数。

1.3 取样策略和抽样方法

设置 3 种取样策略,即邻接法聚类-比例取样、居群结构分组-比例取样和最小距离逐步聚类取样;6 个抽样比例,分别为 5%、10%、15%、20%、25%、30%,尝试构建何首乌的核心种质,取样方法的具体步骤如下。

(1)邻接法聚类-比例取样:根据原居群样品间遗传距离,通过邻接法聚类对样品进行分组,以各组的 Nei's 基因多样性指数(H)比值决定各组样品的取样数量,当该组抽样数目大于组内样品数时,则按 H 比值把取样数量分配到其他组。

(2)居群结构分组-比例取样:通过 Structure 2.3.4 软件的居群分析,获得原居群的最佳分类组数,根据 Q 值对样品进行分类,并以各组的 Nei's 基因多样性指数(H)比值决定各组样品的取样数量,当组中抽样数目大于组内样品数时,则按 H 比值把取样数量分配到其他组。

(3)最小距离逐步聚类取样:根据原群体各样品的遗传距离进行聚类分析,在聚类结果中找出遗传距离最小的一组,在该组中剔除其中一份样品,另一份样品保留下来,和其余样品重新计算遗

传距离并进行聚类分析,循环上述步骤,直至样品数量符合抽样比例。

1.4 核心种质库检验和评价

采用 t 检验比较初始核心种质库和原种质库的各项遗传多样性参数。

2 结果与分析

2.1 样品扩增结果

图 1 为何首乌样品基因组 DNA 经 SRAP-PCR 扩增、电泳和银染后得到的聚丙烯酰胺凝胶图,结果显示样品扩增条带中等丰富,条带能充分分离且清晰平整,即实验筛选的 SRAP 引物和采用的扩增、电泳、银染体系均适合何首乌的种质研究。

2.2 种质遗传多样性、样品聚类 and 居群结构分类

何首乌种质遗传多样性结果如表 3 所示,13 对引物在栽培和野生居群样品中的扩增条带数及多态位点数丰富,野生居群样品的 4 个遗传多样性参数均大于栽培居群样品,说明野生何首乌的遗传多样性比栽培居群的大,两种类型何首乌的居群间基因多样性均大于居群内多样性,表明种质多样性主要来自居群间。整个何首乌种质资源的基因差异分化系数(G_{st})为 0.753 1(>0.5),表明居群间遗传分化程度大,但居群间的基因交流较少,基因交流值(N_m)仅有 0.163 9(<1.0)。另外,栽培居群间分化程度极高,但基因交流极小,推测是生产过程主要采用营养繁殖,居群间缺少基因交流所致。

通过邻接法获得何首乌样品聚类分组结果(图 2),何首乌样品主要分成 4 大分支:第 1 分支为棱枝何首乌,由于它与其他何首乌样品均有较大的遗传距离,因此独立成支;第 2 分支包括四川的 EMS1~2 和贵州的所有野生居群样品;第 3 分支为河南郑州的样品;第 4 分支由其余样品组成。

经 Structure 2.3.4 统计分析,当 $K=16$ 时,其 ΔK 值最大,说明样品分成 16 个类群时最佳(图 3),并由此获得居群结构图(图 4),根据刘丽华等(2009)的方法,把样品归纳如表 4 所示,其中 319 份样品的 $Q \geq 0.600$,说明大部分何首乌种质的遗传结构简单,而 EMS(1~2)、HLP1、JGB1、DZ1、JGC1 及 HT(1~2)样品则血统相对复杂,实验将这些样品归在同一类群中,用于后续核心种质的构建。

2.3 不同取样策略和抽样比例的比较

何首乌样品在不同取样策略和抽样比例下所组成的初始种质库,其遗传多样性参数如表 5 所示,随抽样比例增大,不同取样策略其 N_a 值和多

表 1 何首乌的样品信息

Table 1 Sample imformation of *Fallopia multiflora*

代号 Code	采集地 Collection place	采样数 Sample number	生长方式 Growth pattern
TX	广东德庆县莫村镇太宪村 Taixian Village, Mocun Township, Deqing County, Guangdong	20	栽培 Cultivation
DT	广东德庆县新圩镇大同村 Datong Village, Xinxu Township, Deqing County, Guangdong	20	栽培 Cultivation
BNT	广东高州市石鼓镇白泥塘村 Bainitang Village, Shigu Township, Gaozhou County, Guangdong	20	栽培 Cultivation
STJ	广东新兴县天堂镇山塘角村 Shantangjiao Village, Tiantang Township, Xinxing County, Guangdong	18	栽培 Cultivation
CNT	广东德庆县德城镇大桥村春牛亭 Cunniuting, Daqiao Village, Decheng Township, Deqing County, Guangdong	20	栽培 Cultivation
LZ	广东广州市番禺区广东药科大学 Guangdong Pharmaceutical University, Panyu District, Guangzhou City, Guangdong	1	栽培 Cultivation
GG	广西贵港市 Guigang City, Guangxi	26	栽培 Cultivation
SKC	贵州施秉县牛大场镇山口村 Shankou Village, Niudachang Township, Shibing County, Giuzhou	20	栽培 Cultivation
SZY	上海市浦东新区上海中医药大学 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Pudong New Area, Shanghai	9	栽培 Cultivation
YD	上海益大本草园 Yida Herb Garden, Shanghai	1	栽培 Cultivation
YYL	上海愚园路 Yuyuan Road, Shanghai	1	栽培 Cultivation
HC	江苏南京市南京中医药大学 Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing City, Jiangsu	8	栽培 Cultivation
YY	江苏南京中医药大学药苑 Yaoyuan, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing City, Jiangsu	11	栽培 Cultivation
JZY	江西南昌市湾里区江西中医药大学 Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Wanli District, Nanchang City, Jiangxi	9	栽培 Cultivation
SXZ	陕西咸阳市秦都区陕西中医药大学 Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Qindu District, Xianyang City, Shaanxi	20	栽培 Cultivation
HZY	河南郑州市河南中医药大学 Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou City, Henan	14	栽培 Cultivation
JGC	广东德庆县官圩镇金光村 Jinguang Village, Guanxu Township, Deqing County, Guangdong	1	野生 Wild
WFC	广东德庆县官圩镇五福村 Wufu Village, Guanxu Township, Deqing County, Guangdong	2	野生 Wild
DZ	广东德庆县官圩镇金林电站 Jinlindianzhan, Guanxu Township, Deqing County, Guangdong	1	野生 Wild
JC	广东德庆县官圩镇酒厂 Jiuchang, Guanxu Township, Deqing County, Guangdong	1	野生 Wild
HT	广东高要区河台 Hetai, Gaoyao District, Guangdong	2	野生 Wild
BNT*	广东高州市石鼓镇白泥塘村 Bainitang Village, Shigu Township, Gaozhou County, Guangdong	1	野生 Wild
DH	广东肇庆市鼎湖山 Dinghu Mountain, Zhaoqing City, Guangdong	1	野生 Wild
TX*	广东德庆县莫村镇太宪村 Taixian Village, Mocun Township, Deqing County, Guangdong	2	野生 Wild
ZXC	广东云浮市大方镇增西村 Zengxi Village, Dafang Township, Yunfu City, Guangdong	1	野生 Wild
MM	广东茂名市 Maoming City, Guangdong	1	野生 Wild
JGB	重庆北碚区金刚碑 Jingangbei, Beibei District, Chongqing	5	野生 Wild
XNU	重庆北碚区西南大学 Southwest University, Beibei District, Chongqing	6	野生 Wild
WGL	重庆南岸区五公里 Wugongli, Nan'an District, Chongqing	1	野生 Wild
ZWY	重庆南川区重庆市药用植物园 Chongqing Medicinal Botanical Garden, Nanchuan District, Chongqing	16	野生 Wild

续表 1

代号 Code	采集地 Collection place	采样数 Sample number	生长方式 Growth pattern
NKS	四川巴中市南龛山 Nankan Mountain, Bazhong City, Sichuan	2	野生 Wild
YSZ	四川巴中市元山镇 Yuanshan Township, Bazhong City, Sichuan	1	野生 Wild
PQZ	四川简阳市平泉镇 Pingquan Township, Jianyang County, Sichuan	1	野生 Wild
EMS	四川乐山市峨眉山 Emei Mountain, Leshan City, Sichuan	2	野生 Wild
CD	四川成都市武侯区林荫街 Linyin Road, Wuhou District, Chengdu City, Sichuan	10	野生 Wild
BFS	贵州贵阳市宝福山 Baofu Mountain, Guiyang City, Guizhou	7	野生 Wild
XH	贵州贵阳市小河区 Xiaohe District, Guiyang City, Guizhou	9	野生 Wild
HX	贵州贵阳市花溪区 Huaxi District, Guiyang City, Guizhou	3	野生 Wild
HLP	湖南张家界贺龙公园 Helong Park, Zhangjiajie City, Hunan	1	野生 Wild
HS	湖南南岳区衡山 Hengshan Mountain, Nanyue District, Hunan	9	野生 Wild
SMY	湖南南岳区南岳树木园 Nanyue Arboretum, Nanyue District, Hunan	3	野生 Wild
YX	江苏宜兴市 Yixing City, Jiangsu	5	野生 Wild
GD	安徽广德县 Guangde County, Anhui	9	野生 Wild
FXC	安徽黄山市浮溪村 Fuxi Village, Huangshan City, Anhui	6	野生 Wild

注: 关于棱枝何首乌,有学者已将其列为何首乌的变种(刘寿养,1993;Yan et al., 2011);由于部分栽培居群样品和野生居群样品采集地名相同,因此野生居群样品用*标注,下同。

Note: Regarding *Fallopia multiflora* var. *angulatum*, some scholars have listed it as a variant of *Polygonum multiflorum* (Liu, 1993; Yan et al., 2011); As some cultivated population samples and wild population samples have the same place names, wild population samples are marked with *, the same below.

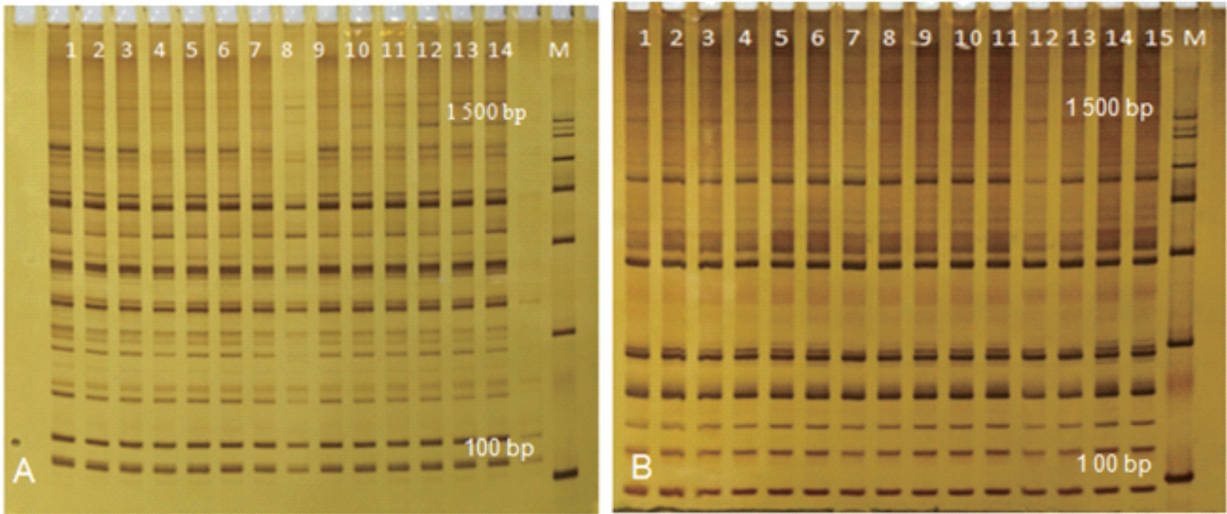
表 2 13 对 SRAP 引物信息

Table 2 Information of 13 pairs of SRAP primers

序号 Serial number	正向引物 (ME) Forward primer (ME)	反向引物 (EM) Reverse primer (EM)
1	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTCAA
2	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTCTT
3	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTTAG
4	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAGC
5	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTCTA
6	TGAGTCCAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTACT
7	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTGAC
8	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTTGA
9	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTGAT
10	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTTGC
11	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTCAA
12	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTCTT
13	TGAGTCCAAACCGGCAT	GACTGCGTACGAATTACT

态位点百分数逐渐增大,而 *Ne* 值、*H* 值和 *I* 值则先下降后上升,且 3 个参数的保留率均大于 100%,即 6 个抽样比例构建的初始种质遗传多样性均大于原种质。

经 *t* 检验比较 5%~30%抽样比例下初始种质库和原种质库的 4 个遗传参数,结果见表 6。邻接法聚类-比例取样策略在不同抽样比例下初始种质库的 *H* 值和 *I* 值与原种质库均存在显著或极显著的差异,说明采用该方法构建核心种质,种质库样品遗传多样性不能反映原种质的真实情况,而居群结构分类-比例取样和最小距离逐步聚类取样方法在 10%~20%抽样比例下,4 个遗传参数与原种质库均无显著差异,当比例为 10%时,两种方法的 4 个遗传参数值均最大,且居群结构分类-比例取样对原种质遗传多样性的保留上更占优势,根据核心种质库构建的原则:去除冗余,并以最小的资源量代表整个种质资源的遗传多样性。因此,选择居群结构分类-比例取样在 10%比例下构建核心种质库。



A. 为引物对 ME17EM13 对贵州施秉山口村 (SKC) 1~14 号样品的扩增结果; B. 为引物对 ME15EM15 对广东德庆莫村太宪 (TX) 1~15 号样品的扩增结果; M. Marker。
A. Amplification results of primer pair ME17EM13 on sample SKC1-14 in Guizhou; B. Amplification results of primer pair ME15EM15 on sample TX1-15 in Guangdong; M. Marker.

图 1 何首乌的 SRAP-PCR 扩增结果
Fig. 1 SRAP-PCR amplification results of *Fallopia multiflora*

表 3 何首乌种质的遗传多样性
Table 3 Genetic diversity of *Fallopia multiflora* germplasm

项目 Item	观察等位 基因数 Number of observed alleles (<i>Na</i>)	有效等位 基因数 Number of effective alleles (<i>Ne</i>)	Nei's 基因 多样性指数 Nei's Gene diversity index (<i>H</i>)	Shannon 信息指数 Shannon information index (<i>I</i>)	多态位点数 Number of polymorphic sites	多态位点 百分数 Percentage of polymor- phic sites (%)	居群总的 遗传多样性 Population genetic diversity (<i>Ht</i>)	居群内遗传 多样性 Genetic diversity within populations (<i>Hs</i>)	基因差异 分化系数 Genediffer- entiation coefficient (<i>Gst</i>)	基因 交流值 Geneflow (<i>Nm</i>)
218 份栽培样品 218 cultivated samples	1.896 2	1.369 8	0.223 4	0.348 2	218	89.62	0.242 4	0.027 5	0.886 7	0.063 9
109 份野生样品 109 wild samples	1.956 0	1.477 0	0.285 4	0.436 3	304	95.60	0.276 3	0.154 7	0.440 2	0.635 8
全部样品 All samples	1.984 3	1.454 9	0.271 7	0.417 9	313	98.43	0.268 0	0.066 2	0.753 1	0.163 9

2.4 何首乌核心种质库构建

采用居群结构分类-比例取样抽取原种质库 10% 的样品所组成的核心种质库如表 7 所示,样品数量共 34 份,由 9 份栽培居群样品和 25 份野生居群样品组成。栽培居群样品包括与其他样品存在明显差异的棱枝何首乌,而野生居群样品主要分布在四川、重庆和贵州,该地区样品数量约占核心种质库总数的 47%。

3 讨论与结论

焦贤贤(2018)的研究表明,核心种质的构建

可以为植物的保护和利用提供理论指导,并有效地提高种质资源的管理、研究和利用效率。目前,世界各国已创立 1 300 余个种质资源库,保存了 600 多万份各类种质资源,而我国现存的约有 40 万份(李荣荣,2020)。虽然药用植物种质资源是中药的源头,但由于药用植物的核心种质库的建立起步较晚,因此在种质库的构建上一般是沿用农作物的方法(林丹,2018)。

核心种质的构建,实质上是利用收集到的数据,根据一定原则把类似的种质资源进行分组,选取合适的总体取样规模,在每组中用合理的取样比例和取样方法进行抽样,使建立的核心种质不仅能

表 4 何首乌样品的居群结构分类结果

Table 4 Population structure classification results of *Fallopia multiflora* samples

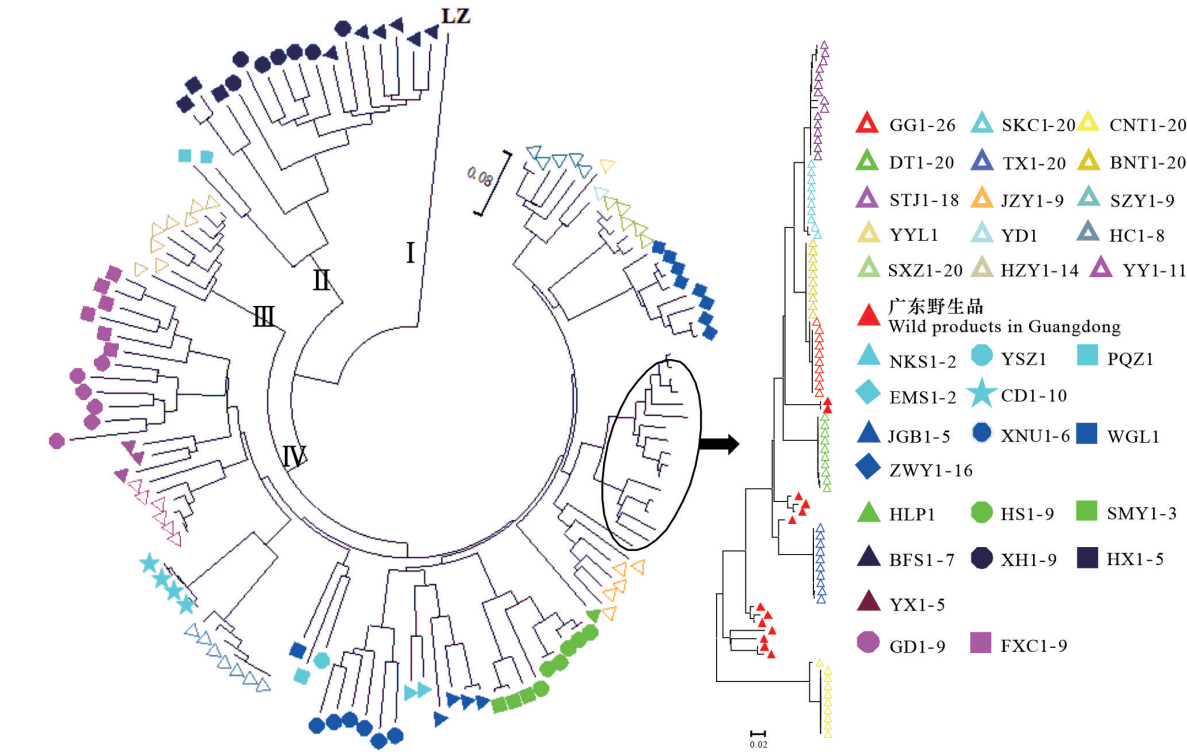
样品编号 Sample number	样品各血统占比 (Q 值) Proportion of all lineages in the sample (Q value)																归属类群 Belonging group
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14	Q15	Q16	
TX(1~20)、DT(1~20)、 BNT(1~20)、STJ(1~18)、 GG(1~26)、SKC(1~20)、 JZY(1~9)	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 1 Goup 1
CNT(1~20)	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 2 Goup 2
SZY(1~9)、YD1、YYL1、 YY(1~11)	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 3 Goup 3
HC(1~8)	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 4 Goup 4
SXZ(1~20)、CD(1~10)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 5 Goup 5
HZY(1~14)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 6 Goup 6
LZ1、WGL1、PQZ1、YSZ1	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 7 Goup 7
WFC(1~2)、JC1、DHS1、 BNT* 1、ZXC1、MM1、TX* (1~2)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 8 Goup 8
JGB(2~5)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 9 Goup 9
XNU(1~6)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 10 Goup 10
ZWY(1~16)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 11 Goup 11
NKS(1~2)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 12 Goup 12
BFS(1~7)、XH(1~9)、 HX(1~3)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	<0.6	类群 13 Goup 13
HS(1~9)、SMY(1~3)、	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	<0.6	类群 14 Goup 14
YX(1~5)、FXC(1~6)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	<0.6	类群 15 Goup 15
GD(1~9)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	>0.6	类群 16 Goup 16
EMS(1~2)、HLP1、JGB1、 DZ1、JGC1、HT(1~2)	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6	无 No belonging group

尽量地代表原种质的遗传多样性,而且能最大程度地反映原始群体的遗传结构(王心迪,2016)。核心种质构建一般包括 4 个步骤,即数据采集及分析、材料分组、样品抽样和核心种质检验及评价。其中,样品抽样包括抽样方法和抽样比例的确立,是核心种质构建中的重要环节。因此,抽样策略的选择对核心种质库的优劣起到关键性作用。

在材料分组上,将搜集到的材料先以相似特征为依据将种质分类,再以一定取样方法选择不同类

群中的种质所形成的样本,其遗传差异比选取同种群体的样本高。分组的标准和方法较多样,目前使用最多的是聚类分组方法(姜丽媛,2018)。本研究采用 SRAR 分子标记方法获得何首乌的聚类分组结果,同时通过居群结构分析获得样品的类群分组结果,作为后续样品选择的基础。

在取样策略上,主要包括分层取样法、逐步聚类随机取样法、最小距离逐步聚类法、主成分分析法和位点优先逐步聚类法。其中,分层取样法包括 4 种,分别为比例法、对数法、平方根法和遗传



几何形状代表何首乌样品,空心图形为栽培居群样品,实心为野生居群样品,填充颜色相同代表该野生样品来自相同的省。
The geometric shape represents the samples of *Fallopia multiflora*, the hollow figure is the cultivated population product, and the solid one is the wild population product. The same filling color means that the wild sample comes from the same province.

图 2 何首乌样品的邻接法聚类图
Fig. 2 Neighbor-joining method clustering diagram of *Fallopia multiflora* samples

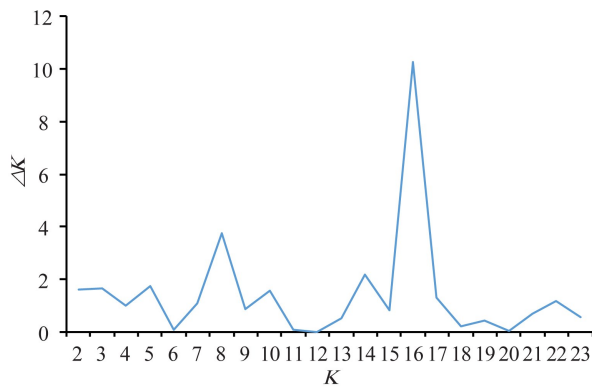
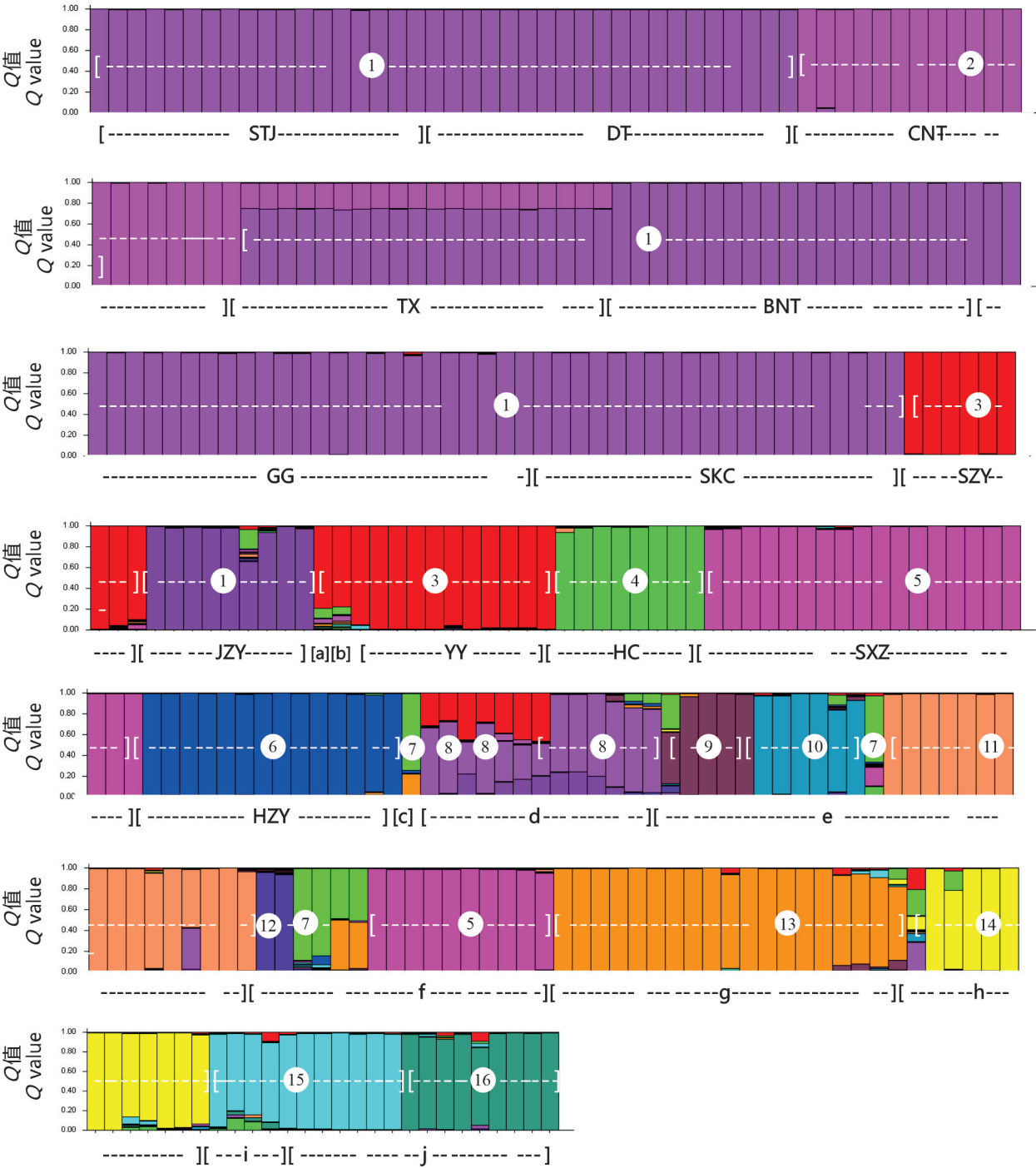


图 3 ΔK 值运算结果
Fig. 3 ΔK value operation results

多样性法(杨孟莉,2016)。本研究获得的是离散型指标数据,主要通过遗传参数的统计来分析种质的多样性,由于物种多样性在群体中分布是不均匀的,因此在前期的聚类分组和居群结构分组的基础上,根据每组遗传多样性指数的比例来确定组内抽样的数目,最终形成了邻接法聚类-比例

取样和居群结构分类-比例取样两种抽样方法。另外,由于最小逐步聚类方法为核心种质构建的常用方法,因此将其纳入何首乌核心种质构建的抽样策略中。

本研究中,何首乌核心种质库的构建结果表明,虽然邻接法聚类分组-比例取样能使初始种质库的遗传参数获得较高的值,但与原种质库存在显著差异($P<0.05$),笔者认为可能是邻接法聚类对样品的分组不够精细,取样时较为随机所致。虽然实验采用的最小距离逐步聚类方法能较好地构建何首乌的核心种质,但步骤较为繁琐,而居群结构分类-比例取样方法目前虽然较为少用,但实验结果显示,该方法构建的核心种质库代表性强且多样性保留较高,它可以对样品进行精细的类群划分,利用多样性比值确定取样数量避免了样品抽取数量分配不均匀的情况,减少了冗余,且操作比最小距离逐步聚类取样简便,上述比较提示该方法可以推广应用于其他物种核心种质库的构建中。



1-16 代表该样品所在群体类群分组中的编号; a 为 YYL1; b 为 YD1; c 为 LZ; d,e ,f,g,h,i 和 j 分别表示来自广东、重庆、四川、贵州、湖南、江苏和安徽的野生居群样品。

1-16 represent the number of groups in which the sample is located; a stands for YYL1; b stands for YD1; c stands for LZ; d, e, f, g, h, i and j represent wild population samples from Guangdong, Chongqing, Sichuan, Guizhou, Hunan, Jiangsu and Anhui, respectively.

图 4 何首乌的群体结构

Fig. 4 Population structure of *Fallopia multiflora*

本研究采用居群结构分类-比例取样,在 10% 的抽样比例下获得了最佳的核心种质库,关于抽

样比例,大多数植物资源核心种质的整体取样比例在 5%~30%之间,目前还没有研究可以确定统

表 5 不同取样策略下初始种质间遗传多样性参数的比较

Table 5 Comparison of genetic diversity parameters between initial germplasm under different sampling strategies															
抽样比例 Sampling ratio	邻接法聚类-比例取样 Neighbor-joining method clustering- proportional sampling					居群结构分类-比例取样 Population structure classification- proportional sampling					最小距离逐步聚类取样 The least distance stepwise sampling				
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	多态位点 Number of polymorphic site	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	多态位点 Number of polymorphic site	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	多态位点 Number of polymorphic site
100%						1.984 3	1.454 9	0.271 7	0.417 8	313					
30%	1.984 3	1.489 0	0.292 7	0.448 2	313	1.981 1	1.476 6	0.287 1	0.441 4	312	1.984 3	1.489 0	0.292 7	0.448 2	313
保留率	100	102.3	107.7	107.3	100	99.8	101.5	105.7	105.6	99.7	100	102.3	107.7	107.3	100
Retention (%)															
25%	1.981 1	1.489 7	0.293 0	0.448 0	312	1.981 1	1.477 5	0.287 5	0.441 7	312	1.978 0	1.473 8	0.285 5	0.438 8	311
保留率	99.8	102.4	107.8	107.2	99.7	99.8	101.6	105.8	105.7	99.7	99.7	101.3	105.1	105.0	99.7
Retention (%)															
20%	1.978 0	1.485 0	0.291 5	0.446 1	311	1.974 8	1.477 2	0.286 7	0.439 9	310	1.978 0	1.470 3	0.283 8	0.437 0	311
保留率	99.7	102.1	107.3	106.8	99.4	99.5	101.5	105.5	105.3	99.0	99.7	101.1	104.5	104.6	99.4
Retention (%)															
15%	1.974 8	1.487 3	0.292 6	0.447 7	310	1.971 7	1.478 3	0.286 8	0.439 7	309	1.974 8	1.471 4	0.284 1	0.437 2	310
保留率	99.5	102.2	107.7	107.2	99.0	99.4	101.6	105.6	105.2	98.7	99.5	101.1	104.6	104.6	99.0
Retention (%)															
10%	1.968 6	1.496 4	0.296 7	0.452 5	308	1.965 4	1.483 0	0.289 0	0.442 6	307	1.974 8	1.479 1	0.288 3	0.442 7	310
保留率	99.2	102.9	109.2	108.3	98.4	99.0	101.9	106.4	105.9	98.0	99.5	101.7	106.1	106.0	99.0
Retention (%)															
5%	1.952 8	1.497 5	0.296 8	0.451 9	303	1.918 2	1.486 7	0.289 4	0.440 3	292	1.930 8	1.473 3	0.284 8	0.436 1	296
保留率	98.4	102.9	109.2	108.2	96.8	96.7	102.2	106.5	105.4	93.3	97.3	101.3	104.8	104.4	94.6
Retention (%)															

注：最优抽样策略的数据用加粗字体表示。
Note: Data for the optimal sampling strategy are shown in bold font.

表 6 三种取样方法不同比例构建的初始种质库与原种质库的 *t* 检验结果
Table 6 *T*-test results of initial and original germplasm libraries constructed by
three sampling methods in different proportions

抽样比例 Sampling ratio (%)	邻接法聚类-比例取样 Neighbor-joining method clustering- proportional sampling				居群结构分类-比例取样 Population structure classification- proportional sampling				最小距离逐步聚类取样 The least distance stepwise sampling			
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
30	—	—	*	**	—	—	—	*	—	—	*	**
25	—	—	*	**	—	—	—	*	—	—	—	—
20	—	—	*	*	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	*	*	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	*	**	**	—	—	—	—	—	—	—	—
5	**	*	**	**	**	—	—	—	**	—	—	—

注：* 表示在 0.05 水平上有显著差异；** 表示在 0.01 水平上有极显著差异；— 表示无显著差异。
Note: * means significant differences at 0.05 level; ** means extremely significant differences at 0.01 level; — means no significant differences.

一的比例(吴茵,2017)。因此,需要根据不同植物种质资源的收集程度、遗传多样性状况和遗传结构等方面的具体特点,设定适合的取样比例(焦贤贤,2018)。

核心种质的构建并非完美无缺,尽管在构建中选取了最佳的比例、最佳的抽样策略、最大限度

地对原始种质进行筛选,但仍旧会丢失某些变异类型,并且随着资源不断地收集,会出现新的变异类型。因此,为了使物种的多样性得到长久的保存和有效利用,应该实时对种质库进行调整(姜丽媛,2018)。本研究中,重庆和四川的野生居群样品占核心种质的多数,在聚类和居群结构分析时

表 7 核心种质库的样品组成

Table 7 Sample composition of the core germplasm bank

抽样策略 Sampling strategy	样品抽取数量 Number of sample of population	栽培居群样品 Cultivated sample of population	野生居群样品 Wild samples of population
居群结构分类-比例取样 Population structure classification- proportional sampling	34	LZ1、DT1、SXZ1、HZY1、HZY2、 SZY1、GG24、YD1、YYL1	XNU1、XNU2、WGL1、ZWY1、ZWY13、YSZ1、 PQZ1、EMS1、EMS2、BFS1、XH1、HX1、SMY1、 YX1、FXC1、GD1、GD2、JGB1、JGB2、HLP1、 CD1、DHS1、NKS1、HS1、YX2

发现,上述两个产地的野生样品与其他产地样品相比,在聚类分组中呈分散分布,说明两地样品遗传多样性高,提示该地区何首乌种质遗传多样性丰富,今后可以加强两地何首乌样本的收集和研究,进而不断完善核心种质库。

参考文献:

CHENG YH, 2007. Study on natural resources of *Polygonum multiflorum* Thunb in Chongqing base on SRAP analysis [D]. Chongqing: Southwest University; 23. [程远辉, 2007. 基于 SRAP 分析的重庆何首乌种质资源整理研究 [D]. 重庆: 西南大学; 23.]

CHEN Y, JIANG B, ZENG YE, 2011. Study on the geographic distribution and ecological environmental characteristics of *Polygonum multiflorum* based on GIS [J]. J Chin Pharm, 22(39): 3726-3728. [陈亚, 江滨, 曾元儿, 2011. 基于地理信息系统的何首乌地理分布及分布区的生境特征研究 [J]. 中国药房, 22(39): 3726-3728.]

EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J, 2005. Detecting the number of clusters individuals using the software structure: a simulation study [J]. Mol Ecol, 14(8): 2611-2620.

JIANG LY, 2018. The wild germplasm resources evaluation and core collection establishment of *Rosa rugosa* [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University; 11-12. [姜丽媛, 2018. 濒危植物野生玫瑰种质资源评价与核心种质构建 [D]. 泰安: 山东农业大学; 11-12.]

JIAO XX, 2018. Construction of core collection of wax gourd [D]. Nanning: Guangxi University; 6-11. [焦贤贤, 2018. 冬瓜核心种质的构建 [D]. 南宁: 广西大学; 6-11.]

LI G, QUIROS CF, 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theor Appl Genet, 103(2/3): 455-461.

LI RR, 2020. Diversity analysis and construction of primary core collection in Tibetan turnip [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 11. [李荣荣, 2020. 西藏芜菁遗传多样性分析与初级核心种质的构建 [D]. 杭州: 浙江大学; 11.]

LIN D, 2018. Analysis of genetic diversity and preliminary construction of core construction of core collection of *Aquilariasinensis* (Lour.) Spreng [D]. Guangzhou:

Guangdong Pharmaceutical University; 4-41. [林丹, 2018. 白木香遗传多样性分析及核心种质的初步构建 [D]. 广州: 广东药科大学; 4-41.]

LIU HC, LUO CL, LI JL, et al., 2013. Habitat survey and biological characteristics study of *Polygonum multiflorum* germplasms in Guizhou region [J]. J Chin Med Mat, 36(6): 864-870. [刘红昌, 罗春丽, 李金玲, 等, 2013. 何首乌不同种质生境调查及在贵州地域的生物学特性研究 [J]. 中药材, 36(6): 864-870.]

LIU LH, WANG LX, ZHAO CP, et al., 2009. Genetic diversity and alterations of population structure in restorers of dual cross-line hybrid wheat with thermo-photoperiod sensitive male sterile [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 25(9): 867-875. [刘丽华, 王立新, 赵昌平, 等, 2009. 光温敏二系杂交小麦恢复系遗传多样性和群体结构分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 25(9): 867-875.]

LIU SY, 1991. A new variety of *Polygonum multiflorum* [J]. Plant Divers, 13(4): 390. [刘寿养, 1991. 何首乌一新变种 [J]. 云南植物研究, 13(4): 390.]

WANG XD, 2016. Construction and evaluation of core collections of *Momordica charantia* [D]. Nanning: Guangxi University; 3. [王心迪, 2016. 苦瓜核心种质的构建与评价 [D]. 南宁: 广西大学; 3.]

WU Y, 2017. Genetic diversity analysis and establishment of the core collection of pepper germplasm resources based on SRAP, SSR markers [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University; 6. [吴茵, 2017. 基于 SRAP, SSR 标记的辣椒种质遗传多样性分析与核心种质构建 [D]. 南昌: 江西农业大学; 6.]

YAN HJ, FANG ZJ, ZHANG HY, et al., 2011. *Fallopia multiflora* var. *angulata*, a new combination in the Polygonaceae from China [J]. Novon, 21(3): 388-391.

YANG JH, 2019. Application of SRAP marker in plant research [J]. Seed Sci Technol, 37(7): 55. [杨金华, 2019. SRAP 标记在植物研究中的应用 [J]. 种子科技, 37(7): 55.]

YANG ML, 2016. The germplasm evaluation and core collection construction of *Cornus officinalis* based on ISSR markers [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University; 9. [杨孟莉, 2016. 基于 ISSR 分子标记的山茱萸种质资源评价与核心种质构建 [D]. 郑州: 河南农业大学; 9.]

ZENG WD, LU LY, XIE XY, et al., 2016. Advances in reproductive technology of *Polygonum multiflorum* [J]. Chin Trop Agric, 70(3): 66-68. [曾文丹, 陆柳英, 谢向誉, 等, 2016. 何首乌繁殖技术研究进展 [J]. 中国热带农业, 70(3): 66-68.]