

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202009056

赵小丽, 杨耀文, 李国栋. 基于 cpDNA 单倍型多态性的草果栽培地理起源证据 [J]. 广西植物, 2021, 41(12): 2004–2013.
ZHAO XL, YANG YW, LI GD. Evidence for geographical origin of domestication of *Amomum tsaoko* (Zingiberaceae) based on polymorphism of cpDNA [J]. *Guihaia*, 2021, 41(12): 2004–2013.



基于 cpDNA 单倍型多态性的草果栽培地理起源证据

赵小丽^{1,2}, 杨耀文¹, 李国栋^{1*}

(1. 云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 昆明 650500; 2. 德宏州人民医院, 云南 芒市 678400)

摘要: 为了探索草果(*Amomum tsaoko*)的栽培地理起源,该文检测了草果、拟草果(*A. paratsaoko*)的 cpDNA 序列变化,并获取了单倍型多态性信息。结果表明:(1)20个草果居群 272个植株、5个拟草果居群 62个植株共检测到7种单倍型。其中,草果有3种单倍型(H1、H3、H6),拟草果有6种单倍型(H1、H2、H3、H4、H5、H7)。H1和H3为共享单倍型,H6为草果私有单倍型,H2、H4、H5、H7为拟草果私有单倍型。H1为普通单倍型,H2为祖先单倍型。(2)草果居群遗传多样性远小于拟草果居群,遗传变异主要来源于居群内,拟草果居群主要来源于居群间。麻栗坡铁厂(TC)、屏边玉屏(YP)居群的遗传多样性、单倍型多样性高于其他18个草果居群。(3)进一步分析表明,包含屏边、马关、西畴、麻栗坡的云南东南部前端地域和邻接的广西那坡可能共同构成草果栽培驯化起源中心,以麻栗坡为核心区域,向周边的西畴、马关、屏边、那坡扩张。因此,结果显示应对TC、YP、那坡下华(XH)居群加以保护。该研究结果为草果种质资源保护、利用提供了遗传学信息。

关键词: 草果, 拟草果, 单倍型, 多态性, 栽培地理起源

中图分类号: Q941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)12-2004-10

Evidence for geographical origin of domestication of *Amomum tsaoko* (Zingiberaceae) based on polymorphism of cpDNA

ZHAO Xiaoli^{1,2}, YANG Yaowen¹, LI Guodong^{1*}

(1. *Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;*
2. *The People's Hospital of Dehong Introduction, Mangshi 678400, Yunnan, China*)

Abstract: In order to investigate the geographical origin of domestication of *Amomum tsaoko*, two hundreds and seventy-two individuals were sampled to represent 20 populations of *A. tsaoko*, and sixty-two individuals of five populations of *A. paratsaoko* were sampled as a related species materials. For acquiring genetic diversity informations, the sequence variations of their cpDNA were carried out. The results were as follows: (1) Seven haplotypes by the combined

收稿日期: 2021-01-26

基金项目: 国家自然科学基金(81660631);云南省应用基础研究—中医联合重点项目(2018FF001-010);云南省应用基础研究—中医联合专项项目(2017FF116-004);重大科技专项(2018ZF010-1)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (81660631); Key Fund for Traditional Chinese Medicine Cooperation of Application Fundamental Research in Yunnan Province (2018FF001-010); Special Fund for Traditional Chinese Medicine Cooperation of Application Fundamental Research in Yunnan Province (2017FF116-004); Major Science and Technology Projects(2018ZF010-1)]。

作者简介: 赵小丽(1994-), 硕士, 中药士, 主要从事药事管理、药事服务及临床药学研究(E-mail)2407560335@qq.com。

*通信作者: 李国栋, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源保护与利用, (E-mail)gammar116@163.com。

sequences were detected, i. e. three haplotypes (H1, H2 and H3) were found in *A. tsaoko* populations, and six haplotypes (H1, H2, H3, H4, H5 and H7) were found in *A. paratsaoko* populations. Two haplotypes (H1 and H3) were shared by the two species. H1 was common haplotype, H2 was ancestral haplotype and H6 was specific haplotype to *A. tsaoko*, while H2, H4, H5 and H7 were specific to *A. paratsaoko*. (2) The genetic diversity of *A. tsaoko* was lower than that of *A. paratsaoko* and mainly existed within populations. The genetic diversity of *A. paratsaoko* mainly existed among different populations. The genetic diversity and the haplotype diversity (H_d) of the two populations (TC and YP) were all higher than other 18 populations of *A. tsaoko*. (3) Further analyses indicated that the domesticated region of *A. tsaoko* would include Maguan, Xichou and Malipo, where at the front area of southeast Yunnan, and the area near Napo, Guangxi, China. Malipo would be the core domestication of *A. tsaoko* in the region, then the related area would expand to Xichou, Maguan, Pingbian and Napo. TC, YP and XH populations were proposed to protect their genetic diversity. The results of the two species were expected to provide genetic information and theoretical reference for protection and utilization of the germplasm resources.

Key words: *Amomum tsaoko*, *A. paratsaoko*, haplotype, polymorphism, geographical origin of domestication

草果 (*Amomum tsaoko*) 果实入药, 味辛性温, 具有温中健胃、消食顺气、祛寒湿的功能 (中国药典委员会, 2020), 也被常作辛香料添加于食物中。草果主产于中国云南, 在越南亦有分布 (Wu & Raven, 2000)。中国云南的栽培历史悠久, 截至 2004 年, 种植面积和产量均占全国的 90% 以上 (明建鸿和胡耀华, 2004)。目前, 草果的栽培起源尚未明确, 而草果产业发展需要亟待解决其产量和质量低下的问题。通过阐明草果的栽培起源, 认识其栽培驯化后的遗传结果, 有利于瞄准优良种质资源并提高品质。

Xia et al. (2004) 研究表明豆蔻属 (*Amomum*) 是一个并系类群, 属下的草果、拟草果 (*A. paratsaoko*) 和姜味砂仁 (*A. coriandriodrorum*) 共同组成一个单系。拟草果是草果亲缘关系最近的同属野生植物, 它们的果实光滑、唇瓣顶端全缘而薄。前期资源调查、样品采集中发现云南文山州、红河州等草果传统产区通常有野生拟草果植株伴生, 果实偶有混入草果, 是草果药材的混淆品。但是由于它们种子挥发油成分不同, 不能当作同一药材 (徐国钧, 1997)。广西那坡规六村 (原属下华乡, 后并入百省乡) 邻近村 1968 年采收周围野生拟草果果实育苗种植, 果实食用。在海拔 $\geq 1\ 200$ m 的地方, 草果结果较多; 在海拔 900 m 的地方, 草果开花多, 结果极少或基本不结实, 而拟草果大量结果。干旱、光照多或少, 草果生长不好或死亡, 而拟草果都生长很好。草果果实成熟后不脱落, 拟草果果实较小, 成熟后脱落而腐烂。姜味砂仁因根茎、叶、果实有芫荽的味道 (Wu & Raven, 2000) 而易于识别, 前期研究未发现在草果居群周

围有分布。因此, 研究中将拟草果作为外类群。

居群分化过程是一个遗传和系统发生的过程。一个物种现有的居群结构不仅能反映目前基因交流的模式, 也能反映谱系分隔的历史, 而阐明居群分化过程是研究进化多样性的基础 (Kenneth & Barbara, 1999)。植物 cpDNA 具有分子量小、结构简单且多拷贝的特性, 在大多数被子植物中, cpDNA 为单亲母系遗传, 有自己独立未被干扰的进化历史, 可用于追溯植物起源和迁移历史; 且 cpDNA 为单拷贝基因, 后期 PCR 扩增、测序和序列分析的可行性较高 (Badenes & Parfitt, 1995; Petit et al., 2005)。探索植物 cpDNA 序列变化获得物种演化信息, 可搭建联系居群水平的分化过程与宏观进化的系统地理学关系之间的桥梁。因此, 我们利用草果、拟草果 cpDNA 的序列变化, 试图探寻草果的栽培地理起源, 以期对草果种质资源的保护、利用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

样品采自中国云南、广西, 以及越南河江 (表 1, 图 1), 凭证标本存于云南中医药大学。8 个草果居群 (LC、HS、SD、TBG、LJ、TY、ZH、JX) 无拟草果伴生, TBG 种源自越南经缅甸而来, 其余 7 个由当地供销社在 20 世纪从云南文山州、红河州引种栽培。每个草果居群随机选取 7~26 个植株, 植株之间相距 ≥ 5 m; 生长在草果居群周边 (直线距离 ≤ 200 m) 的全部拟草果植株为一个居群, 悉数采样。每一植株选取健康叶片, 置于含硅胶的密封袋中

干燥,并于-20℃冰箱中保存。

1.2 仪器与试剂

PCR 扩增仪 (BIO-RAD C1000)、常温离心机 (Eppendorf, Centrifuge 5415D)、凝胶电泳仪 (BIO-RAD, Power Pac Basic)、凝胶成像系统 (BIO-RAD, Universal HoodII)。植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京百泰克, DP3112)、PVP-40、EDTA、Tris、Taq PCR 等。

1.3 总 DNA 的提取

采用改良植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取总 DNA。对试剂盒说明书操作步骤稍做改动,加入 Buffer P1 和 RNase 后水浴 30 min。DNA 洗脱时分 2 次加入 EB 洗脱液,依次为 30、20 μL 。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将提取出的 DNA 存于 -20℃ 冰箱,备用。

1.4 引物的筛选

依据文献初步筛选出 5 对 cpDNA 序列 (表 2)。其中, *trnH^{GUG}-psbA*、*rps16F-rpsR* 与 *trnL-trnF* 序列能更好地扩增材料总基因组 DNA,且 PCR 产物双向测序结果较好。

1.5 PCR 扩增

扩增体系:总体积为 25 μL 。其中, Taq DNA 聚合酶 ($1.0 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 12.5 μL , 正反向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1.5 μL , DNA 模板 ($30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , ddH₂O 加至 25 μL 。扩增程序为 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 40 s; 64℃ 退火 30~40 s, 72℃ 延伸 40 s, 循环 33 次; 72℃ 延伸 6 min。产物存-4℃ 冰箱,送上海生工 (Sangon Biotech) 双向测序。

1.6 数据分析

利用 GenesCode Sequencher 5.4.5 软件拼接测序所得的双向序列,及 ClustalX 2.0.10 (Larkin et al., 2007) 自动排列比对,结果导入 Bioedit 7.05 软件 (Hall, 1999) 手工校对调整,矩阵中有系统发育信息的空位 (Gap) 按照插入缺失简单编码方法编码 (刘杰, 2011)。

1.6.1 序列变异与单倍型分布 利用 Bioedit 7.05 软件分别将对完成的 3 个序列的两端切平,统计每一序列长度。MEGA 7.0.14 软件确定 3 个序列中碱基 G+C 含量、特异变异位点、矩阵中包含的碱基插入/缺失情况。利用 DnaSP 6.10.01 分别计算 3 个序列核苷酸多态性 (nucleotide diversity, π)、单倍型多样性 (haplotype diversity, H_d) (Nei & Tajima, 1981; Borowsky, 2001), 以及单倍型在居群中的分布。

常用参数 π 和 θ 可以衡量核苷酸多态性 (Nei & Li, 1979; 刘杰, 2011)。基于软件 Network 5.0.1.0 中值连接法 (Median-joining network), 利用最大简约标准对所有单倍型序列进行种内谱系的单倍型网络分析,之后结合采样点经纬度信息将居群单倍型分布以及共享情况利用 Adobe Illustrator CC 2019 绘制成单倍型地理分布图。

1.6.2 居群遗传多样性与遗传结构分析 利用 PermutcpSSR 1.2.1 计算物种总的遗传多样性 (H_T)、平均遗传多样性 (H_S)。联合每一个体的 3 个序列拼接结果,利用 Arlequin version 3.5.1.2 检测居群遗传结构。

1.6.3 邻接系统进化树构建 利用 MEGA 7.0.14 软件的系统发育模块 (phylogeny) 构建 NJ 邻接树 (neighbor-joining tree)。基于 Kimura 2-parameter (K-2P) 模型和自举法 (bootstrap method) 计算居群对之间的平均遗传距离 (compute between group mean distance); 自举法重复次数 (replications) 设置为 1 000; 替换包括 (substitutions to include) 设置为 “d; 过渡+横向 (d; Transitions+Transversions)” ; 位点之间的速率 (rates among sites) 设置为统一速率 (uniform rates); 差距/缺失数据处理 (gaps/missing data treatment) 设置为完全删除 (complete deletion)。

2 结果与分析

2.1 序列特征和单倍型检测

3 个序列 G+C 含量在 29.6%~32.7% 之间,符合叶绿体 GC 含量低的特点 (孙果丽, 2015)。3 个序列均有碱基插入/缺失, π 与 θ 的值均小于 0.01。联合序列对齐后的长度为 2 258 bp, 多态性信息位点为 66 个, 共有 18 个碱基的插入/缺失 (表 3)。将联合片段应用于单倍型检测,依据碱基的插入/缺失、替换得到 7 种单倍型 (表 4)。

2.2 单倍型在草果和拟草果中的分布及其关系

H1 分布最广,为普通单倍型; H2 和 H4 的个体数极少,为稀有单倍型; H6 仅分布于 XH 居群, H4、H5、H7 分别分布于 RHy、TCy、YPy 居群 (表 5)。TC、YP 居群各有 2 个单倍型; 综合观察,云南麻栗坡 (TC、ML、TCy) 检测到 4 种单倍型,为单倍型类型最丰富的地区,其次是西畴 (FD1、FD2、FDy)、屏边 (YP、YPy)、那坡 (XH、BSy), 均有 3 种单倍型 (表 1, 表 5, 图 1)。云南麻栗坡、西畴、屏边

表 1 实验材料的采集信息

Table 1 Information of experimental materials

序号 Code	居群 Population	采集地 Location	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude (m)	样本量 Sample number
1	GLJ	中国云南马关县古林菁乡 Gulinjing Township, Maguan County, Yunnan, China	103°59'15.72"E	22°51'57.54"N	1 540	26
2	MB	中国云南马关县马白镇 Mabai Town, Maguan County, Yunnan, China	104°26'03.69"E	23°05'04.74"N	1 368	10
3	RH	中国云南马关县仁和镇 Renhe Town, Maguan County, Yunnan, China	104°18'16.11"E	22°55'10.88"N	1 473	10
4	FD1	中国云南西畴县法斗乡 Fadou Township, Xichou County, Yunnan, China	104°49'19.98"E	23°22'19.56"N	1 670	10
5	FD2	中国云南西畴县法斗乡 Fadou Township, Xichou County, Yunnan, China	104°49'39.84"E	24°22'22.26"N	1 540	15
6	ML	中国云南麻栗坡县麻栗镇 Mali Town, Malipo County, Yunnan, China	104°43'06.92"E	23°03'33.12"N	1 245	10
7	TC	中国云南麻栗坡县铁厂乡 Tiechang Township, Malipo County, Yunnan, China	105°04'09.03"E	23°18'53.88"N	1 620	16
8	YP	中国云南屏边县玉屏镇 Yuping Town, Pingbian County, Yunnan, China	103°41'52.98"E	22°54'55.98"N	2 046	15
9	ADB1	中国云南金平县阿得博乡 Adebo Township, Jinping County, Yunnan, China	103°13'08.86"E	22°54'13.01"N	1 477	16
10	ADB2	中国云南金平县阿得博乡 Adebo Township, Jinping County, Yunnan, China	103°13'52.89"E	22°54'04.90"N	1 582	15
11	LC	中国云南绿春县大兴镇 Daxing Town, Lichun County, Yunnan, China	102°27'03.23"E	22°59'20.39"N	1 989	20
12	HS	中国云南陇川县户撒乡 Husa Township, Longchuan County, Yunnan, China	97°43'05.35"E	24°22'32.29"N	1 775	10
13	SD	中国云南盈江县苏典乡 Sudian Township, Yingjiang County, Yunnan, China	97°59'13.05"E	25°10'24.48"N	1 862	14
14	TBG	中国云南盈江县铜壁关乡 Tongbiguan Township, Yingjiang County, Yunnan, China	97°41'16.32"E	24°40'53.43"N	1 670	14
15	LJ	中国云南隆阳区潞江镇 Lujiang Town, Longyang District, Yunnan, China	98°46'30.06"E	24°50'17.34"N	2 070	7
16	TY	中国云南腾冲市腾越镇 Tengyue Town, Tengchong City, Yunnan, China	98°30'07.74"E	25°03'42.12"N	2 219	15
17	ZH	中国云南腾冲市中和镇 Zhonghe Town, Tengchong City, Yunnan, China	98°20'56.38"E	25°07'26.32"N	1 607	10
18	JX	中国广西金秀县金秀镇 Jinxiu Town, Jinxiu County, Guangxi, China	110°12'13.68"E	24°05'58.92"N	1 065	14
19	XH	中国广西那坡县百省乡 Baisheng Township, Napo County, Guangxi, China	105°45'05.94"E	23°10'46.20"N	880	15
20	GB	越南河江省管箔县 Guangbo County, Hejiang, Vietnam	104°57'05.21"E	23°09'05.92"N	1 281	10
21	FDy	中国云南西畴县法斗乡 Fadou Township, Xichou County, Yunnan, China	104°46'16.68"E	23°22'26.78"N	1 478	13
22	RHy	中国云南马关县仁和镇 Renhe Town, Maguan County, Yunnan, China	104°18'13.89"E	22°55'04.51"N	1 473	7
23	TCy	中国云南麻栗坡县铁厂乡 Tiechang Township, Malipo County, Yunnan, China	105°04'13.45"E	23°18'54.03"N	1 700	15
24	YPy	中国云南屏边县玉屏镇 Yuping Town, Pingbian County, Yunnan, China	103°41'53.62"E	22°55'43.21"N	1 887	12
25	BSy	中国广西那坡县百省乡 Baisheng Township, Napo County, Guangxi, China	105°45'05.94"E	23°10'46.20"N	880	15
合计 Total						272+62

注: 1-20 为草果居群, 21-25 为拟草果居群。

Note: 1-20 represent populations of *Amomum tsaoko*, 21-25 represent populations of *A. paratsaoko*.

表 2 预实验中所有 5 对 cpDNA 序列引物信息、引物来源
Table 2 Primer sequences and sources of five pairs of cpDNA in the pre-experiment

编号 Code	引物名称 Primer name	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	参考文献 References
1	<i>trnH^{GUG}</i>	CGCGCATGGTGATTACAAATCC	Tata & Simpson, 2003
	<i>psbA</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang & Stuessy, 1997
2	<i>rps16F</i>	AAACGATGTGGTARAAAGCAAC	Tata & Simpson, 2003
	<i>rps16R</i>	AACATCWATTGCAASGATTTCGATA	
3	<i>trnD</i>	ACCAATTGAACTACAATCCC	Demesure, 1995
	<i>trnT</i>	CTACCACTGAGTTAAAAGGG	
4	<i>trnG</i>	GAACGAATCACACTTTTACCAC	Hamilton, 1999
	<i>trnS</i>	GCCGCTTTAGTCCACTCAGC	
5	<i>trnL</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet et al., 1991
	<i>trnF</i>	ATTTGAACGTGTGACACGAG	

属于滇东南小区,为红河和哀牢山以东的云南南缘地带(吴征镒和朱彦丞,1987),邻接广西那坡。H2 位于网络图的中央位置,可能表明其为祖先单倍型;H2 与 H3、H4 之间亲缘关系较远,H3 和 H4 需要经过三次突变才能得到 H1;H4、H5、H6 均由 H2 分别经过一步突变而来,它们与 H2 的亲缘关系较近,又和 H7 共同聚为一支(图 1)。这表明 H2、H4、H5、H6、H7 是较原始的单倍型,而与它们关系较远的 H1、H3 是衍生的单倍型。因此,结果认为 TC_y、FD_y 是在本研究系统中较为原始的居群,它们都具有祖先单倍型 H2。比较 H5、H3 与 H2 亲缘关系的远近,TC_y 可能比 FD_y 更为原始,更接近祖先居群。RH_y、BS_y、XH 可能也是比较原始的居群,它们分别具有与祖先单倍型亲缘关系较近的单倍型 H4、H5 和 H6。因此,云南麻栗坡、西畴、马关和广西那坡可能是草果的栽培起源中心,而麻栗坡(铁厂)可能是这一中心的核心区域,向周边的西畴、马关、屏边、那坡扩张。

H1、H3 在拟草果和草果中共享,H1 主要发生在草果居群,19 个草果居群均有 H1,拟草果仅 BS_y 的 4 个植株有;H3 主要集中在 FD_y,在草果居群仅 YP 的 2 个植株、TC 的 4 个植株有。这反映

H1 和 H3 发生在草果栽培驯化之前,栽培驯化后祖先遗传多态性在两个世系(谱系)中的分选和保持。H6 经由 H2 一步突变而来,可能是一个古老单倍型,发生在栽培驯化之前。H6 经一步突变后得到 H7,H7 仅存于 YPy(图 1),且频率不高(4.67%),与 H6 的频率(5.06%)接近(表 5)。因此,H6 可能在拟草果中绝迹了,或是在样品采集中遗漏了。此外,草果的 3 个单倍型(H1、H3、H6)源于拟草果的单倍型 H2、H4。

2.3 遗传多样性和遗传结构

草果 20 个居群 272 个植株共检测到 3 种单倍型,占单倍型种类的 42.86%,占植株数量的 1.10%。拟草果 5 个居群 62 个植株共检测到 6 种单倍型,相应数值为 85.71%和 9.68%。2 个共享单倍型占草果单倍型频率的 92.46%,相应地仅占拟草果的 24.14%(表 5)。这说明拟草果遗传多样性高于草果。

草果居群的单倍型多样性指数(H_d)和核苷酸多样性指数(π),18 个居群均为 0,TC 最高,其次是 YP,说明这 2 个居群遗传多样性高于其他 18 个居群。FD_y 有两种单倍型, H_d 、 π 值最高,遗传多样性最高;遗传多样性较高的还有 BS_y 和 TC_y。大多数草果居群遗传多样性都较低,拟草果居群遗传多样性较高(表 5)。因此,云南麻栗坡、西畴、屏边、马关和广西那坡可能是草果、拟草果遗传多样性中心,也可能是草果栽培起源中心。TC、YP 的遗传多样性高于其他 18 个草果居群,说明它们经历的人工选择较小,从而保留了较多的遗传多样性,更接近祖先居群。因此,云南麻栗坡、屏边很可能是草果的栽培起源中心。

草果、拟草果居群遗传多样性检测表明,草果居群总的遗传多样性 $H_T = 0.121$,居群内平均遗传多样性 $H_S = 0.022$,核苷酸多态性 $\pi = 0.00152$,居群间遗传分化系数 $F_{ST} = 0.41915$;而拟草果居群 $H_T = 0.963$ 、 $H_S = 0.246$ 、 $\pi = 0.00852$ 、 $F_{ST} = 0.71521$;草果居群的遗传多样性和遗传分化程度远小于拟草果居群。AMOVA 分析,草果居群的遗传变异主要来源于居群内(58.08%),拟草果居群主要来源于居群间(71.52%);居群间的遗传分化程度,草果($F_{ST} = 0.41915$, $P < 0.01$)远小于拟草果($F_{ST} = 0.71521$, $P < 0.01$)(表 6)。

2.4 居群系统发育关系和草果栽培起源分析

3 个 cpDNA 序列联合后,构建了 20 个草果居群与 5 个拟草果居群间的系统发育关系,所有分

表 3 三个 cpDNA 序列和联合序列的序列特征

Table 3 Characteristics of each cpDNA sequence and the combination of three sequences

cpDNA 片段 cpDNA sequences	长度 Size (bp)	G+C 含量 G+C content (%)	位点 Site	核苷酸多态性 Nucleotide polymorphism		碱基插入/缺失 Base insertion/deletion	
				π	θ	event	Site
<i>trnH^{GUG}-psbA</i>	702	29.6	18	0.003 81	0.004 21	7	37
<i>rps16F-R</i>	672	32.2	21	0.002 77	0.004 52	6	44
<i>trnL-F</i>	884	32.7	29	0.005 35	0.005 38	5	31
Comb-Fr *	2 258	33.0	66	0.004 23	0.004 87	18	112

注: **Comb-Fr.** 联合片段。

Note: **Comb-Fr.** Combined fragments.

表 4 联合片段所检测到的 7 种单倍型的序列多态性

Table 4 Sequence polymorphism of seven haplotypes detected in the combined fragment

单倍型 Haplo- type	样本量 Sample number	片段位置 Fragment location																								
		1 2 2 2 2																								
		1	1	4	6	9	9	9	9	9	9	3	4	5	8	8	8	8	8	8	9	9	0	1	1	1
H1	187	T	G	C	T	-	-	-	-	-	A	.	G	T	T	G	A	A	T	G	.	G	A	G	.	
H2	15	-	-	-	G	C	A	A	T	A	T	G	T	T	C	-	-	-	-	-	T	A	A	T	T	C
H3	13	-	-	-	-	-	-	-	-	
H4	7	-	-	-	T	-	-	-	-	-	
H5	10	-	-	-	-	-	-	-	-	.	C	.	.	.	
H6	13	-	-	-	A	.	.	-	-	-	-	-	.	.	.
H7	12	-	-	-	A	.	.	-	-	-	-	-	.	.	.

注: -表示单核苷酸的缺失; .表示碱基类型与 H2 保持一致。

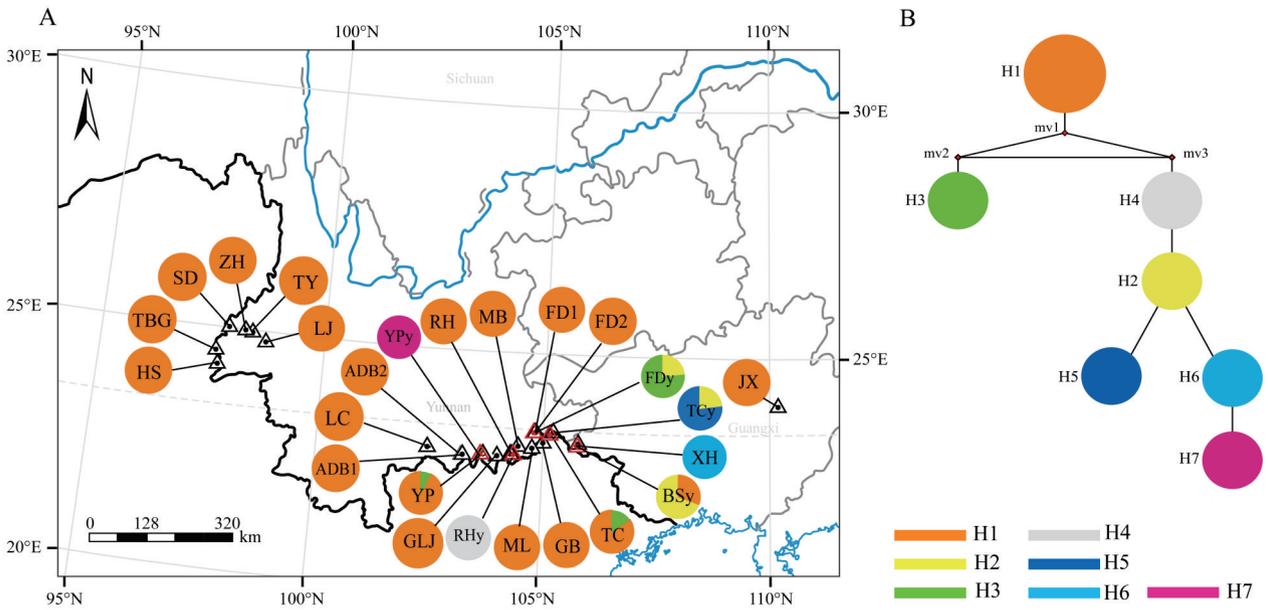
Note: - indicates missing of single nucleotide; . indicates the base types were same as H2.

支支持率均大于 50%。FDy 单独聚为一支, 与其他 24 个居群的亲缘关系较远。种间水平上草果与拟草果各自分支; 除 XH 外, 草果 19 个居群聚为一支, 且没有进一步的分支。4 个拟草果居群, YPy、TCy、BSy 聚为一支, RHy 单独聚为一支(图 2)。与草果相比, 拟草果则有明确的拓扑结构, 并且有较高的支持率。一方面再次佐证草果种质来源较为均一, 另一方面也提示基于单亲遗传的 *trnH^{GUG}-psbA*、*rps16F-rps16R* 与 *trnL-trnF* 序列联合片段的变异多态性分析结果未能有效揭示草果居群遗传结构、栽培驯化过程中的动态变化情况。

XH 与拟草果聚为一支, 并与 YPy 聚为一小支, 提示 XH 与 YPy 的亲缘关系最近, 其次是与 TCy、BSy 亲缘关系较近。H6 只在 XH 中发现, H6

与 H2 亲缘关系较近。这提示 XH 是与拟草果亲缘关系最近的草果居群, 也是一个较原始的、遗传结构较接近祖先居群的草果居群, 这与依据单倍型网络关系图推导的结论一致。因此, 广西那坡可能是草果的一个栽培起源中心。基于拟草果和草果的系统关系 (Xia et al., 2004), 以及 YPy、TCy、BSy 与草果居群的亲缘关系较近, 屏边玉屏、麻栗坡铁厂、那坡百省可能也是草果的栽培驯化中心。

RHy 单独聚为一小支, 提示该居群可能比 YPy、TCy、BSy 拥有更早的进化关系; 该居群独有 H4, H4 分别经过 3 次突变可得到 H1、H3; 而且 H4 是连接祖先单倍型 H2 和草果普通单倍型 H1 的桥梁。因此, 马关可能也是草果栽培起源中心。FDy



A 中圆大小代表居群的个体数。地图来源于中华人民共和国自然资源部提供的标准地图,审图号为 GS(2016)1582 号。

The circle size in Fig. 1: A represents the number of individuals in the population. The standard map provided by the Ministry of Natural Resources of the People's Republic of China, and review number was GS (2016) 1582.

图 1 草果、拟草果居群和 7 个单倍型的地理分布图(A)以及单倍型网络关系图(B)

Fig. 1 Geographical distribution of both the populations of *Amomum tsaoko*, *A. paratsaoko* and the seven haplotypes (A), and the network relationship of seven haplotypes (B)

单独聚为一支,它是唯一既有祖先单倍型 H2,又有衍生单倍型 H3 的拟草果居群,这可能是与其他 24 个居群亲缘关系较远的原因;H3 又为共享单倍型。因此,西畴法斗可能是草果栽培地理的起源中心。

3 讨论与结论

单倍型网络关系图提示草果的 3 种单倍型没有完全集成一个单系,H1 和 H3 分布于网络图的一端,私有单倍型 H6 混在拟草果单倍型之中。因此,7 个单倍型的谱系关系和物种没有明显联系,可能是祖先遗传多态性在两个世系(谱系)中分选、保留的结果,也可能存在基因流。草果、野草果(*A. koenigii*)间人工杂交已有成功报道(崔晓龙等,1995a),草果和拟草果间未见报道。种间基因渗入只发生在同域物种之间(Kenneth & Barbara, 1999)。YP 和 YPy 有植株混杂,并无共享单倍型;XH 和邻近的 BSy 无共享单倍型;FDy 与 FD1、FD2 相邻也无共享单倍型。这说明自然状态下草果与拟草果之间没有基因渗入,也可能是样本少的缘

故(草果:40 株,拟草果:25 株)。

人类农业起源没有超过 1 万年(Kenneth & Barbara, 1999),因此,草果栽培起源是一个距今时间较短的事件。H1、H3 在拟草果和草果中共享,推测它们可能发生在草果栽培驯化之前,而栽培驯化后祖先的遗传多态性则在两个世系中进行分选和保持。目前认为豆蔻属起源于喜马拉雅,通过南亚向澳大利亚北部扩散,一直延伸到太平洋中部(Kiew, 1982; Smith, 1985)。而豆蔻属是起源、分化历史不久远的类群,也支持了拟草果和草果是新近分化的物种。拟草果是草果亲缘关系最近的同属野生植物,系统发育分析中又共同构成单系(Xia et al., 2004),它们可能有新近的共同祖先。有新近共同祖先的物种间发生谱系分选的可能性很大(Nevo & Karlin, 1986; Wu, 1991)。因此,基于单亲遗传的 *trnH^{GUG}-psbA*、*rps16F-rps16R* 与 *trnL-trnF* 序列联合片段的变异多态性分析结果,除了单倍型 H6,草果单倍型是拟草果单倍型的子集。草果栽培驯化过程反映了祖先遗传多态性在世系间的分选、保留。19 个草果居群都有 H1,有

表 5 cpDNA 单倍型在 25 个居群中的分布情况
Table 5 Distribution of cpDNA haplotypes among 25 populations

居群 Population	单倍型多样性指数 Haplotype diversity index (H_d)	核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity index (π)	单倍型频率 Haplotype frequency (%)							
			H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	
ADB1	0.000 00	0.000 00	6.22	—	—	—	—	—	—	—
ADB2	0.000 00	0.000 00	5.06	—	—	—	—	—	—	—
FD1	0.000 00	0.000 00	2.33	—	—	—	—	—	—	—
FD2	0.000 00	0.000 00	5.45	—	—	—	—	—	—	—
GLJ	0.000 00	0.000 00	7.39	—	—	—	—	—	—	—
HS	0.000 00	0.000 00	1.17	—	—	—	—	—	—	—
LC	0.000 00	0.000 00	5.84	—	—	—	—	—	—	—
LJ	0.000 00	0.000 00	2.72	—	—	—	—	—	—	—
MB	0.000 00	0.000 00	1.94	—	—	—	—	—	—	—
ML	0.000 00	0.000 00	2.33	—	—	—	—	—	—	—
RH	0.000 00	0.000 00	0.78	—	—	—	—	—	—	—
SD	0.000 00	0.000 00	3.89	—	—	—	—	—	—	—
TBG	0.000 00	0.000 00	3.50	—	—	—	—	—	—	—
TC	0.282 05	0.007 39	4.28	—	0.78	—	—	—	—	—
TY	0.000 00	0.000 00	5.06	—	—	—	—	—	—	—
YP	0.153 85	0.004 03	4.67	—	0.39	—	—	—	—	—
JX	0.000 00	0.000 00	5.45	—	—	—	—	—	—	—
ZH	0.000 000	0.000 000	1.17	—	—	—	—	—	—	—
GB	0.000 00	0.000 00	1.95	—	—	—	—	—	—	—
XH	0.000 00	0.000 00	—	—	—	—	—	5.06	—	—
FDy	0.384 62	0.010 08	—	1.17	3.89	—	—	—	—	—
YPy	0.000 000	0.000 000	—	—	—	—	—	—	—	4.67
RHy	0.000 00	0.000 00	—	—	—	2.72	—	—	—	—
TCy	0.384 62	0.000 17	—	1.17	—	—	3.89	—	—	—
BSy	0.461 54	0.002 30	1.56	3.50	—	—	—	—	—	—
总频率 Total frequency			72.76	5.84	5.06	2.72	3.89	5.06	4.67	

注: — 表示居群中未检测到对应单倍型。

Note: — indicates that the relevated haplotype is not detected in the population.

H1 的草果植株可能在早期栽培中农艺性状表现较好,例如,成活率较高、繁殖力较强、果实产量较高等优势而容易被选择保留。和其他栽培植物一样,在长期栽培驯化过程中,这样的人工选择会导致遗传多样性的大量丢失。

草果在各地之间相互引种栽培,又存在以老株分化替代、发展新株的繁殖方式(崔晓龙等, 1995b),导致个体遗传背景、居群种质趋于均一化。草果在长期的栽培驯化中可能经历了较强的人工选择压力,从而引发高频率等位基因的有效固定和低频率等位基因的严重丢失,最终导致遗传多样性严重丢失,遗传背景愈加狭窄化。与拟草果居群相比,也可说明草果栽培驯化过程中遗传多样性大量丢失的事实。栽培植物遗传多样性的减少似乎是栽培植物和野生近缘植物系统

(crop-relative systems) 中的一个规律 (Doebly, 1989; Hecht, 1993; Tanksley & McCouch, 1997),反映了在栽培驯化过程中人工选择、建立事件 (founder event) 导致的遗传漂变致使栽培植物遗传多样性减少 (Ladizinsky, 1985; Doebly, 1989; Eyre-Walker et al., 1998)。这种模式也提示拟草果和草果之间是祖先-衍生者关系 (progenitor-derivative relationship)。当然,栽培植物与其近缘植物之间的遗传多样性变化反映了许多互相作用的进化因素而难以简单评价 (Doebly, 1989)。

基于草果、拟草果的系统关系,2 个共享单倍型发生在 FDy 和 BSy,提示西畴法斗、那坡百省可能是草果栽培地理起源中心。从草果单倍型多样性、居群遗传多样性的角度,可考虑加入屏边玉屏和麻栗坡铁厂;从拟草果单倍型多样性的角度,可考虑加

表 6 草果居群与拟草果居群的分子方差分析

Table 6 AMOVA analysis of *Amomum tsaoko* populations and *A. paratsaoko* populations

物种 Species	变异来源 Source of variation	自由度 df	总方差 Sum of squares	方差分量 Variance components	变异百分数 Percentage variation (%)	显著性检验 P value
草果 <i>A. tsaoko</i>	居群间 Among populations	19	354.845	1.665 92	41.92	$P < 0.01$
	居群内 Within populations	252	413.231	2.308 55	58.08	$P < 0.01$
	总体 Total	271	768.075	3.974 47		
拟草果 <i>A. paratsaoko</i>	居群间 Among populations	4	1 033.110	21.738 81	71.52	$P < 0.01$
	居群内 Within populations	57	458.769	8.656 02	28.48	$P < 0.01$
	总体 Total	61	1 491.879	30.394 83		

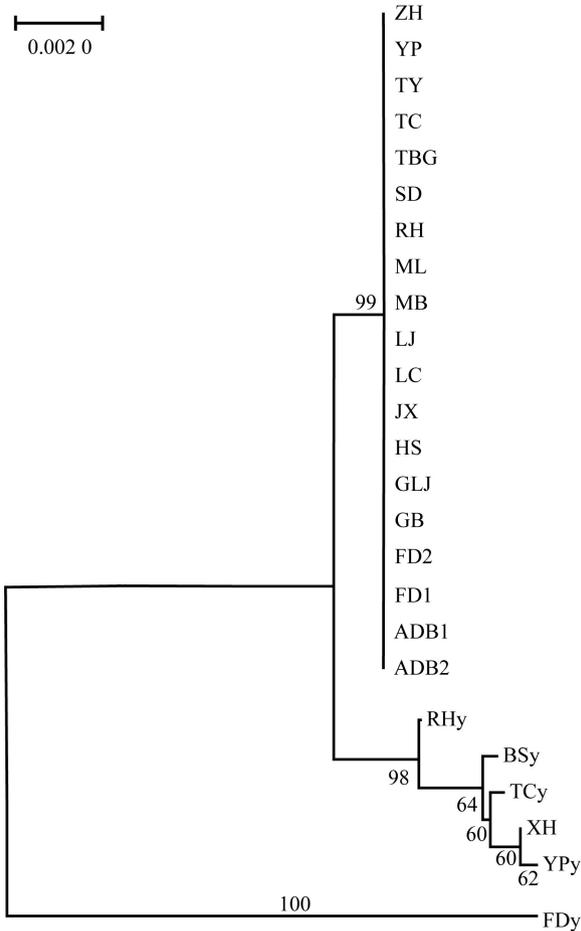


图 2 基于 cpDNA 非编码区联合序列构建的草果、拟草果居群邻接 (NJ) 树

Fig. 2 Neighbor-joining (NJ) distance tree based on cpDNA non-coding region combined fragment of *Amomum tsaoko* and *A. paratsaoko* populations

畴(法斗)、麻栗坡(铁厂)组成的这个云南东南部的
前端地域,和邻接的广西那坡(下华,属百省乡)
共同构成的这一区域可能是草果栽培驯化的地理
起源中心。这一结论与毛品、冯国楣先生早期的
草果采集记录吻合,他们分别采集于屏边、西畴,
童绍全采集于马关、麻栗坡(童绍全,1998)。草果
大量引种发生在 20 世纪 70 年代末至 80 年代,由
各地供销社组织引种。麻栗坡(铁厂)可能是这一
中心的核心区域,以麻栗坡为核心区域,向周边的
西畴、马关、屏边、那坡扩张。这一结论可为草果
核心种质构建、种质资源收集和保护,以及种植模
式和栽培管理的研究提供一定的遗传学依据。

在长期栽培驯化过程中,草果遗传多样性大量
丢失,造成现有遗传资源单一化,表现为草果居
群遗传多样性远小于拟草果居群,草果居群遗传
变异主要来源于居群内,而拟草果居群主要来源
于居群间。TC、YP 这 2 个草果居群的遗传多样
性、单倍型多样性高于其他 18 个草果居群;而 XH
具有草果私有单倍型,建议对它们加以保护和利
用。FDy 是研究系统中遗传多样性最高的居群,为
促进草果质量和产量的提高而储备野生种质资源,
对 FDy 深入研究、保护、利用可能对草果产业
的发展有重要的意义。

参考文献:

- BADENES ML, PARFITT DE, 1995. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation [J]. *Theor Appl Genet*, 90 (7-8): 1035-1041.
- BOROWSKY RL, 2001. Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment

入马关仁和;结合居群系统发育关系分析,由屏边(玉屏,大围山范围内)、马关(大围山范围内)、西

- length polymorphism data [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 18(1): 143-148.
- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I)* [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press: 249-250. [中国药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科学和技术出版社: 249-250.]
- CUI XL, WEI RC, HUANG RF, 1995a. A preliminary study on the genetic system of *Amomum tsaoko* [J]. *J Yunnan Univ (Nat Sci Ed)*, 17(3): 290-297. [崔晓龙, 魏蓉城, 黄瑞复, 1995. 草果遗传体系的初步研究. 云南大学学报(自然科学版), 17(3): 290-297.]
- CUI XL, WEI RC, HUANG RF, 1995b. Study on the artificial population structure of *Amomum tsaoko* [J]. *S Chin J Agric Sci*, 8(4): 114-118. [崔晓龙, 魏蓉城, 黄瑞复, 1995b. 草果人工种群结构研究 [J]. 西南农业学报, 8(4): 114-118.]
- DEMASURE B, SODZI N, PETIT RJ, 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants [J]. *Mol Ecol*, 4(1): 129-134.
- DOEBLEY J, 1989. *Isozymes* [M]// SOLTIS DE, SOLTIS PS. *Plant Biology*. Portland: Dioscorides OR: 165-191.
- SOLTIS PS, SOLTIS DE, DOYLE JJ, 1992. *Molecular systematics of plants* [M]. New York: Chapman & Hall: 202-222.
- EYRE-WALKER A, GAUT RL, HILTON H, et al., 1998. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4441-4446.
- HECHT MK, 1993. *Evolutionary biology* [M]. New York: Plenum: 51-94.
- HALL TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids Symp*, 41(41): 95-98.
- HAMILTON MB, 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation [J]. *Mol Ecol*, 8(3): 521-523.
- KENNETH MO, BARBARA AS, 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(10): 5586-5591.
- KIEW KY, 1982. The genus *Elettariopsis* (Zingiberaceae) in Malaya [J]. *Not RBG Edinb*, 40(1): 139-152.
- LADIZINSKY G, 1985. Founder effect in crop-plant evolution [J]. *Econ Bot*, 39(2): 191-198.
- LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, et al., 2007. Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
- LIU J, 2011. Phylogeography of *Taxus wallichiana* Zucc [D]. Kunming: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. [刘杰, 2011. 喜马拉雅红豆杉的谱系地理学研究 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所.]
- MING JH, HU YH, 2004. Dynamic analysis on production and market of *Amomum tsaoko* [J]. *J Chin Med Mat*, 27(6): 449-451. [明建鸿, 胡耀华, 2004. 草果的产销动态分析 [J]. 中药材, 27(6): 449-451.]
- NEI M, LI WH, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(10): 5269-5273.
- NEI M, TAJIMA F, 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases [J]. *Genetics*, 97(1): 145-163.
- NEVO E, KARLIN S, 1986. *Evolutionary processes and theory* [M]. New York: Academic: 515-534.
- PETIT R J, DUMINIL J, FINESCHI S, et al., 2005. Invited review: comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations [J]. *Mol Ecol*, 14(3): 689-701.
- SANG T, STUESSY CTF, 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *Am J Bot*, 84(8): 1120-1136.
- SMITH RM, 1985. A review of Bornean Zingiberaceae I. (Alpineae p.p.) [J]. *Not RBG Edinb*, 42(2): 261-314.
- SUN GL, 2015. Molecular phylogeography of *Caragana microphylla* Lam. inferred from chloroplast DNA sequences variation [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences: 12-20. [孙果丽, 2015. 基于 cpDNA 序列的小叶锦鸡儿分子谱系地理学研究 [D]. 北京: 中国农业科学院: 12-20.]
- TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Mol Biol*, 17(5): 1105-1109.
- TANKSLEY SD, MCCOUCH SR, 1997. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild [J]. *Science*, 277(5329): 1063-1066.
- TATE JA, SIMPSON BB, 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid Species [J]. *Syst Bot*, 28(4): 723-737.
- TONG SQ, 1998. Revision and additional notes of Zingiberaceae of Yunnan, China [J]. *Bull Bot Res*, 18(2): 137-143. [童绍全, 1998. 云南姜科植物的增补与修 [J]. 植物研究, 18(2): 137-143.]
- WU CI, 1991. Inferences of species phylogeny in relation to segregation of ancient polymorphisms [J]. *Genetics*, 127(2): 429-435.
- WU ZY, RAVEN PH, 2000. *Zingiberaceae* [M]// *Flora of China*. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.
- WU ZY, ZHU YC, 1987. *Yunnan vegetation* [M]. Beijing: Science Press: 31-32. [吴征镒, 朱彦丞, 1987. 云南植被 [M]. 北京: 科学出版社: 31-32.]
- XIA YM, KRESS WJ, LINDA MP, 2004. Phylogenetic analyses of *Amomum* (Alpinioideae: Zingiberaceae) using ITS and *matK* DNA sequence data [J]. *Syst Bot*, 29(2): 334-344.
- XU GJ, 1997. Collation and research on the varieties of common materia medica [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 3: 39-46. [徐国钧, 1997. 常用中药材品种整理和研究 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 3: 39-46.]