

羌活不同地理种群 ITS 序列变异及系统发生分析

杨路存^{1,2}, 刘何春^{1,3}, 周学丽⁴, 徐文华^{1,2}, 周国英^{1,2*}

- (1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008;
2. 中国科学院 藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810008; 3. 中国科学院大学, 北京 100049;
4. 青海省铁卜加草原改良试验站, 青海 西宁 810008)

[摘要] 利用核糖体 rRNA 基因内转录间隔区(ITS)序列, 对我国羌活 31 个野生群体的遗传结构进行了分析。经 PCR 扩增测序, 获得长度为 634 ~ 635 bp 的 ITS 核苷酸序列, 其平均 G + C 量(57.8%) 显著高于 A + T 量。在羌活 31 个居群 402 条序列中共检测到 31 个变异位点, 多态位点比例为 4.88%, 其中, 简约信息位点为 12 个, 共有 31 种单倍型。AMOVA 分析结果显示: 羌活大部分的遗传变异发生在居群间(57%)。以宽叶羌活为外群构建的 NJ 树显示: 31 个单倍型并没有按地理分布形成明显的族群, 各地单元中的单倍型相互混杂, 没有明显的地理分化模式。

[关键词] 羌活; ITS; 序列分析; 遗传结构

ITS sequences variation and phylogenetic analysis on 31 geographical populations of *Notopterygium incisum*

YANG Lu-cun^{1,2}, LIU He-chun^{1,3}, ZHOU Xue-li⁴, XU Wen-hua^{1,2}, ZHOU Guo-ying^{1,2*}

- (1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;
2. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
4. Tiebujia Grassland Improvement Experiment Station, Xining 810008, China)

[Abstract] In this study, 31 *Notopterygium incisum* populations were analyzed using ITS sequences to investigate the genetic structure. The results showed that: the ITS region ranged in size from 634 to 635 bp and base composition was with high G + C content of 57.8%. Thirty-one polymorphic sites were detected from 402 sequences of 31 populations of *N. incisum*, and the proportion of polymorphic sites was 4.88%, in which parsimony informative sites were up to 12. And 31 haplotypes were identified based on these polymorphic sites. Molecular variance analysis (AMOVA) indicated that high genetic differentiation (57%) existed among population, and gene flow was low ($N_m = 0.38$) among populations. Phylogenetic relationships of 31 haplotypes were analyzed using NJ method with *N. forbesii* as an out-group. Phylogenetic analysis showed that 31 haplotypes from different populations mixed together and did not form distinct geographically separated clades.

[Key words] *Notopterygium incisum*; ITS; sequence analysis; genetic structure

doi: 10.4268/cjcm20151910

羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 是我国特有的羌活属的多年生草本植物^[1-2], 与同属的宽叶羌活 *N. forbesii* Boiss. 同为药材羌活的基原

植物, 以根茎及根入药^[3], 主要分布在四川、青海、甘肃等省的高寒山区^[4]。羌活是中、藏、羌医药体系中常用药材, 主要含挥发油和香豆素类成分。具

[收稿日期] 2015-03-31

[基金项目] 青海省青年基金项目(2013-Z-942Q)

[通信作者] * 周国英, 博士, 研究员, 主要从事青藏高原药用植物资源与植被恢复的研究工作, E-mail: zhouguy@nwipb.cas.cn

[作者简介] 杨路存, 博士, 助理研究员, 主要从事药用植物分子生态学研究工作, E-mail: yanglucun@nwipb.cas.cn

• 3748 •

散寒祛风、除湿止痛之功效,用于风寒感冒头痛、风湿痹痛、肩背酸痛^[5]等症。现代药理研究表明对心脑血管疾病也有确切疗效^[6]。目前,用羌活的中(藏)成药有200余种,用药需求量非常大。近年来的掠夺性采挖和生境破坏,致使各个道地产区资源受到严重威胁,由于长期依赖采挖,野生资源及其生境破坏严重,传统道地产区资源已近枯竭,1987年即被国务院《中国野生药材资源保护管理条例》列为Ⅲ级保护物种,2005年又载入《中国物种红色名录》^[7]。因此,急需对其遗传特性及分布格局进行深入系统的研究,以便制定羌活资源的保护策略。目前,羌活植物化学^[8]、药理^[5]、地理分布^[4,9]、分类学^[1-2]、环境土壤学^[10]和驯化栽培^[11-12]等方面的研究比较多,但从DNA分子水平上对羌活群体遗传结构、遗传分化及多样性等方面的研究较少,仅见唐学芳等^[13]用RAPD标记研究了四川西部4个居群33株羌活的遗传分化,但由于其样品数量有限还不能反映羌活群体遗传状况全貌,需要更多的分子生物学标记研究结果给予补充。

高等植物中的rRNA基因(rDNA)是高度重复的串联序列单位,每个单位包括编码区和内转录间隔区,编码区包括18S、5.8S、26S基因,基因序列进化缓慢且相对保守;编码区之间为内转录间隔区(internally transcribed spacer, ITS),依顺序分为第一转录间隔区(ITS1)和第二转录间隔区(ITS2)。ITS区序列进化速率较快,且与植物生活型呈相关性,近年来已被广泛用于植物种内变异和种间、近缘属间的分子系统学研究^[14-18]。本研究基于rDNA-ITS序列对采集于我国羌活主要产地青海、四川和甘肃3省区的31个羌活居群的遗传关系进行分析,探讨我国羌活资源的遗传结构和亲缘关系,对羌活的资源保护及可持续利用具有重要意义。

1 材料

用于本实验的31个居群为2014年6月至9月份分别采自青海、四川和甘肃3省区,基本包括了我国羌活主要产区(表1)。采样时每个居群选取成年植株8~19株,根据随机取样原则,取样的羌活株距在50m以上。野外采集新鲜、完整的植物幼嫩叶片,置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存。凭证标本存放于中国科学院西北高原生物研究所。外类群的宽叶羌活采自卓尼县卡车乡(102°09′46.92″, 34°39′15.36″, 2714m)。

2 方法

2.1 基因组DNA的提取与检测 依据改良的CTAB法从硅胶干燥的叶片中提取总DNA。通过测定紫外吸光度来确定DNA浓度和纯度。利用0.8%琼脂糖凝胶电泳检查DNA完整性。

2.2 PCR扩增与DNA测序 采用真核生物rDNA-ITS序列扩增引物ITS Primer A: 5′-CGTAGGTGAAC-CTGCCGAAGGATCA-3′和ITS Primer B: 5′-TTCCCT-GTTCCTCGCCGTTAC T-3′,对羌活和宽叶羌活rDNA ITS序列进行PCR扩增。反应体系为25 μL,内含25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 2 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL, 10 μmol·L⁻¹引物各0.6 μL, 25 ng模板, 10×buffer 2.5 μL, 1 U Taq DNA聚合酶(TaKa-Ra)。使用Eppendorf Mastercycler Gradient PCR仪进行扩增反应,扩增条件为95℃预变性3 min; 35个循环:95℃变性0.5 min, 51℃退火0.5 min, 72℃延伸0.5 min;最后72℃延伸10 min。将PCR扩增产物的电泳检测纯化后由上海美吉生物医药科技有限公司测序。

2.3 数据分析 用Clustal X软件进行序列对位排列,并加以手工适当校正。在所有序列校对正确后,用DnaSP 4.0程序统计cpDNA单倍型,并计算居群间基因流值(N_m)。居群内和居群间的基因流用每代雌性个体迁移数(N_m)估计,该值可由公式 $F_{ST} = 1/(1 + 2N_m)$ 求出,其中 N 是有效居群大小,雌性数目 m 是雌性迁移率。选用Arlequin软件进行分子方差分析(ANOVA),计算居群内、居群间的变异方差分布。用MEGA 4.1软件进行核苷酸组成分析,采用Kimura-2-Parameter distance双参数模型(Kimura, 1980)计算遗传距离,并用邻接(Neighbor-Joining, NJ)法构建系统树,通过1万次重复获得的自展检验(bootstrap)数值标记在分支上。

3 结果与分析

3.1 ITS序列分析 经对位排列,获得我国主要羌活产地31个居群的ITS序列,碱基序列长度均为635 bp。合并相同的序列共得到31个单倍型(H1~H31),单倍型序列注册于Genebank数据库中(正在提交)。通过统计这一片段所有个体的序列发现,碱基G和C在整个序列中所占比例为57.82%,略高于A+T含量。

31种单倍型对位排列后得到的635 bp中共有31处变异位点,其中简约信息位点12处(图1)。

表1 31个羌活居群的经度、纬度、海拔、ITS序列的GC的量及ITS序列单倍型

Table 1 Geographic origins, GC content of ITS sequence and haplotypes of ITS sequences of *Notopterygium incisum*

| 居群 | 编号 | 居群 | 纬度 | 经度 | 海拔/m | GC量/% | 样本数 | 单倍型 |
|----|-----|------------|-------------|-------------|-------|-------|--------|---|
| 青海 | Q1 | 乐都 | 36°42.172' | 102°23.540' | 2 935 | 57.95 | 14 | H1(14) |
| | Q2 | 互助 | 36°55.614' | 102°22.505' | 2 735 | 57.95 | 14 | H1(14) |
| | Q3 | 门源 | 37°22.352' | 102°0.819' | 3 216 | 57.94 | 16 | H1(15), H13(1) |
| | Q4 | 祁连 | 38°7.357' | 100°11.542' | 3 337 | 57.95 | 8 | H1(8) |
| | Q5 | 兴海 | 35°50.889' | 99°35.540' | 3 635 | 57.92 | 11 | H1(10), H5(1) |
| | Q6 | 河南 | 34°35.958' | 101°16.862' | 3 525 | 57.90 | 19 | H1(16), H5(2), H9(1) |
| | Q7 | 玛沁 | 34°36.397' | 100°12.904' | 4 012 | 57.91 | 17 | H1(13), H3(4) |
| | Q8 | 班玛 | 32°44.374' | 100°46.057' | 3 600 | 57.64 | 19 | H5(19) |
| | Q9 | 久治 | 33°22.069' | 101°19.120' | 4 013 | 57.90 | 14 | H3(1), H5(3), H12(1), H15(4), H29(4), H30(1) |
| | Q10 | 达日 | 33°45.349' | 99°33.707' | 4 012 | 57.64 | 10 | H5(8), H21(1), H25(1) |
| | Q11 | 玉树 | 33°2.882' | 96°51.258' | 4 002 | 57.62 | 12 | H5(10), H19(2) |
| | Q12 | 称多 | 33°8.019' | 97°27.944' | 4 401 | 57.63 | 18 | H5(17), H18(1) |
| | Q13 | 囊谦 | 32°15.517' | 96°55.072' | 3 668 | 57.63 | 14 | H5(13), H18(1) |
| 甘肃 | G2 | 民乐 | 38°5.480' | 100°55.682' | 3 408 | 57.95 | 8 | H1(8) |
| | G3 | 山丹 | 34°37.371' | 101°26.413' | 2 765 | 57.91 | 11 | H1(10), H2(1) |
| | G4 | 榆中 | 35°43.819' | 104°1.817' | 2 958 | 57.95 | 16 | H1(16) |
| | G5 | 合作 | 35°13.512' | 103°4.558' | 3 164 | 57.95 | 16 | H1(16) |
| | G6 | 卓尼 | 34°35.910' | 103°5.052' | 3 025 | 57.95 | 10 | H1(10) |
| | G7 | 临潭 | 34°54.291' | 103°41.403' | 2 946 | 57.90 | 9 | H1(6), H7(2), H20(1) |
| | G8 | 玛曲 | 34°6.031' | 101°53.329' | 3 683 | 57.92 | 10 | H1(8), H3(2) |
| G9 | 碌曲 | 34°32.617' | 102°31.825' | 3 683 | 57.95 | 11 | H1(11) | |
| 四川 | S1 | 若尔盖 | 33°18.639' | 103°13.639' | 3 757 | 57.61 | 11 | H3(1), H5(4), H8(1), H10(1), H12(1), H16(3) |
| | S2 | 红原 | 32°25.875' | 102°37.618' | 3 963 | 57.71 | 14 | H1(1), H3(1), H5(3), H6(1), H8(3), H14(3), H28(1), H31(1) |
| | S3 | 阿坝 | 32°55.346' | 101°34.190' | 3 493 | 57.84 | 10 | H5(2), H11(1), H14(2), H29(2), H30(3) |
| | S4 | 马尔康 | 31°47.110' | 102°13.079' | 3 693 | 57.67 | 14 | H3(1), H5(10), H16(1), H17(1), H26(1) |
| | S5 | 金川 | 31°27.889' | 101°47.973' | 3 808 | 57.82 | 15 | H1(3), H3(6), H5(3), H16(1), H29(2) |
| | S6 | 道孚 | 31°0.495' | 101°0.440' | 3 846 | 57.71 | 15 | H1(3), H3(1), H5(9), H22(2) |
| | S7 | 甘孜 | 31°31.170' | 99°58.579' | 3 886 | 57.63 | 15 | H5(14), H24(1) |
| | S8 | 炉霍 | 31°36.030' | 100°42.474' | 3 445 | 57.72 | 12 | H1(2), H3(2), H5(7), H23(1) |
| | S9 | 丹巴 | 30°38.237' | 101°38.108' | 3 844 | 57.93 | 8 | H1(4), H3(1), H5(1), H29(2) |
| | S10 | 小金 | 31°31.399' | 102°22.572' | 3 654 | 57.71 | 11 | H4(2), H5(7), H16(1), H27(1) |

在31处变异位点中3处为插入/缺失所致28处是由碱基置换造成的(其中5处为碱基转换:4处A→T,1处C→G;23处为碱基颠换:4处C→T,7处G→A,3处A→G,1处A→C,1处T→G,2处T→C,1处C→A,4处G→T)。

3.2 遗传变异分析 根据羌活ITS序列变异估算出的居群间遗传分化度的 F_{ST} 值和基因流(N_m)分别为0.57,0.38。基于羌活ITS序列变异的AMOVA分析表明,羌活大部分的遗传变异发生在居群间(57%),只有43%的遗传变异发生在居群内,居群间的遗传分化大于居群内的分化,说明居群间变异是羌活的主要变异来源。同时,根据羌活个体所处的地理位置,将31个群体划分为青海组(包括Q1~Q13居群)、甘肃组(G2~G9居群)和四川组(S1~

S10居群)3个组,ANOVA分析表明,羌活组间的遗传变异占总变异的23.72%,而组内居群间和组内居群内的遗传变异分别为36.68%,39.60%(表2)。此外,大部分羌活种群间的遗传分化系数(F_{ST})处于0.3~1,表明这些居群间有较强的分化,还有一些种群的遗传分化系数为负数,并且 F_{ST} 的P检验没有出现显著差异,表明这些居群间没有遗传分化(表3)。

3.3 系统发育分析 根据不同单倍型之间的遗传距离,以羌活属的宽叶羌活*N. forbesii* Boissieu为外群,构建羌活31个不同单倍型的NJ分子系统树(图2),系统树上各分支上的数字代表1万次Bootstrap统计后对该支的支持百分比(即置信度)。NJ树显示,31个单倍型并没有按地理分布形成明显

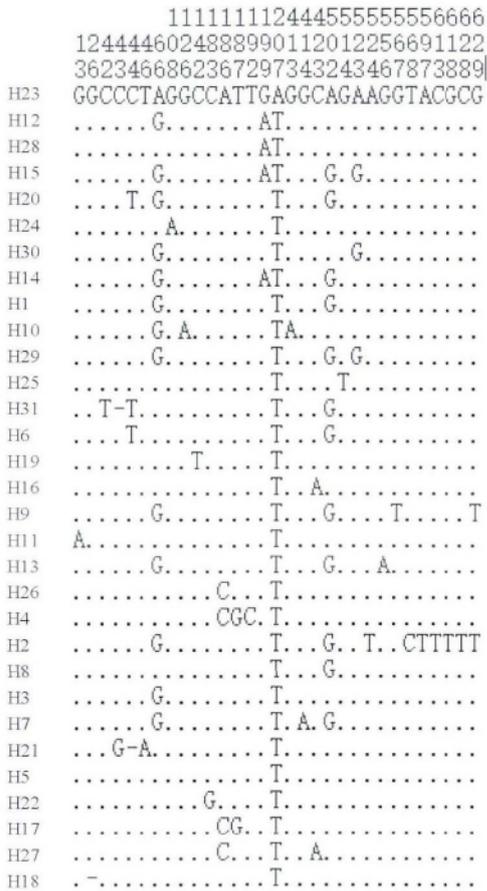


图 1 羌活 ITS 片段 31 种单倍型进行序列比对的变异位点
Fig. 1 Variable sites of the aligned sequences among 31 haplotypes of the ITS fragment of *Notopterygium incisum*

表 2 羌活群体遗传变异的分子方差分析(ANOVA)
Table 2 ANOVA analysis of genetic variation in populations of *Notopterygium incisum*

| 遗传变异来源 | 方差和 | 变异成分 | 变异比例/% | P |
|--------|--------|------|--------|-------|
| 居群间 | 160.62 | 0.40 | 57 | <0.01 |
| 居群内 | 109.06 | 0.30 | 43 | <0.01 |
| 组间 | 53.64 | 0.18 | 23.72 | <0.01 |
| 组内居群间 | 106.98 | 0.28 | 36.68 | <0.01 |
| 组内居群内 | 109.06 | 0.30 | 39.60 | <0.01 |

的族群,各地理单元中的单倍型相互混杂,没有明显的地理分化模式。如,单倍型 H1 被群体 Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, S2, S5, S6, S8, S9 所共享。ITS 序列的相似性与群体间的地理分布相关性不完全一致,羌活 Q1(青海乐都)群体与 S9 群体(四川丹巴)相距甚远,但 ITS 资料显示没有明显遗传分化。

4 讨论

4.1 羌活 ITS 序列特点 本研究发现 31 个羌活居群的 ITS 序列在种内个体间不存在长度多态性,所有序列的长度均为 635(除 2 条序列由于插入/缺失,序列的长度为 634)。由此可知,羌活 ITS 核苷酸的变异是由 28 处碱基置换造成的(图 1),核苷酸变异位点占总位点的 4.41%,可为种内群体间遗传分析提供丰富的信息。

此外,辛天怡等^[19]为对羌活及其混伪品进行鉴定,对不同来源的 26 个样品进行 ITS 测序,结果显示这 26 条 ITS 序列鉴别出 4 个单倍型(A1 ~ A4)。将这 4 个单倍型与本研究中的 31 个单倍型进行比对,结果显示,A2 单倍型序列与研究中的 H1 单倍型序列相同,A4 与 H3 相同,A1 和 A3 没有找到与研究相同的单倍型。这也进一步说明了 ITS 序列具有很好的稳定性。

4.2 群体遗传关系分析 群体遗传学认为, F_{ST} 可以表示群体间的遗传分化程度,一般 F_{ST} 在 0.00 ~ 0.05 表示分化较弱,在 0.25 以上表示遗传分化极大。本研究运用的 ITS 序列得出 $F_{ST} = 0.57$ 表明羌活间遗传分化极大,ANOVA 分析也表明,羌活大部分的遗传变异发生在居群间(57%),遗传分化显著。但这与前人的研究结果不一致,唐学芳^[13]等用 RAPD 标记对羌活的遗传多样性进行研究,结果均表明,羌活的遗传变异主要存在于居群内(74.67%),居群间形成一定的遗传分化(25.33%)。这两者不一致的原因可能是由于前面的研究者其样品数量有限还不能反映羌活群体遗传状况全貌。

比较有趣的是:羌活大部分的遗传变异发生在居群间,但在系统发育分析时,31 个单倍型并没有按地理分布形成明显的族群,各地理单元中的单倍型相互混杂,没有明显的地理分化模式。这可能与羌活的进化历史有关,在青藏高原隆升和第四纪冰期前,羌活居群可能呈连续分布,基因流频繁,某些古老的单倍型(H1)在居群中广泛分布,居群间遗传差异较小,遗传变异主要存在于居群内个体之间。随后,随着青藏高原的隆升和第四纪冰期气候的反复波动,冰期前连续的羌活居群被分割成孤立的小居群。隔离的小居群由于缺乏基因流($N_m = 0.38$)可能导致单倍型在不同地区之间的独立进化,因而不同地区居群之间产生了分化,但由于分化的时间

表3 31个居群间的 F_{ST}
Table 3 F_{ST} value of 31 populations of *Notopterygium incisum*

| 群体 | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q5 | Q6 | Q7 | Q8 | Q9 | Q10 | Q11 | Q12 | Q13 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | | | | |
|-----|--------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|------|--------|-----|-----|-----|------|-----|-------|-----|------|--------|------|-------|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| Q1 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q2 | 0.0 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q3 | -0.009 | -0.2 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q4 | 0.0 | 0.0 | -0.05 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q5 | 0.02 | -0.2 | 0.02 | -0.03 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q6 | 0.02 | -0.2 | 0.02 | -0.03 | -0.06 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q7 | 0.2 | -0.03 | 0.2 | 0.1 | 0.003 | 0.01 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q8 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q9 | 0.4 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.7 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q10 | 0.9 | 0.7 | 0.8 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.8 | 0.07 | 0.5 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q11 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.2 | 0.6 | 0.04 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q12 | 1.0 | 1.0 | 0.9 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 0.003 | 0.6 | 0.04 | 0.09 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q13 | 1.0 | 0.9 | 0.9 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 0.02 | 0.6 | 0.02 | 0.07 | -0.07 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C2 | 0.0 | 0.0 | -0.05 | 0.0 | -0.03 | -0.03 | 0.1 | 1.0 | 0.4 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C3 | 0.02 | -0.2 | 0.03 | -0.03 | 0.0 | 0.02 | 0.08 | 0.8 | 0.3 | 0.7 | 0.7 | 0.8 | 0.8 | -0.03 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.04 | 0.03 | 0.2 | 1.0 | 0.5 | 0.9 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | 0.04 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.04 | 0.03 | 0.2 | 1.0 | 0.5 | 0.9 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | 0.04 | 0.0 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C6 | 0.0 | 0.0 | -0.03 | 0.0 | -0.009 | -0.008 | 0.1 | 1.0 | 0.4 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | -0.009 | 0.0 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C7 | 0.2 | -0.1 | 0.1 | 0.07 | 0.06 | 0.2 | 0.9 | 0.3 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 0.9 | 0.07 | 0.02 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C8 | 0.2 | -0.09 | 0.1 | 0.08 | -0.04 | -0.03 | -0.08 | 0.9 | 0.3 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 0.9 | 0.08 | 0.02 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| C9 | 0.0 | 0.0 | -0.03 | 0.0 | 0.0 | -0.001 | 0.1 | 1.0 | 0.4 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 0.0 | 0.00 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | | |
| S1 | 0.7 | 0.5 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.2 | 0.4 | 0.08 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.6 | 0.5 | 0.7 | 0.7 | 0.6 | 0.6 | 0.5 | 0.6 | 0.0 | | | | | | | | | | | | | |
| S2 | 0.4 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.2 | 0.0 | | | | | | | | | | | | |
| S3 | 0.4 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.6 | -0.04 | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 0.5 | 0.3 | 0.3 | 0.5 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | | | | | | | | | | | |
| S4 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.06 | 0.5 | 0.02 | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.8 | 0.7 | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.8 | 0.05 | 0.3 | 0.4 | 0.0 | | | | | | | | | | |
| S5 | 0.4 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.2 | 0.5 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.5 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.1 | 0.04 | 0.3 | 0.0 | | | | | | | | | |
| S6 | 0.7 | 0.5 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.2 | 0.4 | 0.09 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.6 | 0.5 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.7 | 0.02 | 0.1 | 0.2 | 0.07 | 0.2 | 0.0 | | | | | | | | |
| S7 | 1.0 | 0.9 | 0.9 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 0.02 | 0.6 | 0.03 | 0.07 | 0.001 | 0.000 | 1.0 | 0.8 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.9 | 0.9 | 1.0 | 0.2 | 0.4 | 0.5 | 0.03 | 0.5 | 0.1 | 0.0 | | | | | | | |
| S8 | 0.7 | 0.6 | 0.7 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.6 | 0.3 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.7 | 0.5 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.7 | 0.004 | 0.1 | 0.2 | 0.08 | 0.1 | -0.05 | 0.2 | 0.0 | | | | | | |
| S9 | 0.2 | -0.07 | 0.2 | 0.1 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.8 | 0.09 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.7 | 0.1 | 0.05 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.01 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.04 | 0.6 | 0.07 | 0.4 | 0.8 | 0.4 | 0.0 | | | | | |
| S10 | 0.8 | 0.6 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.2 | 0.5 | 0.09 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.7 | 0.6 | 0.8 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.07 | 0.3 | 0.4 | -0.002 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.5 | 0.0 | | | | |

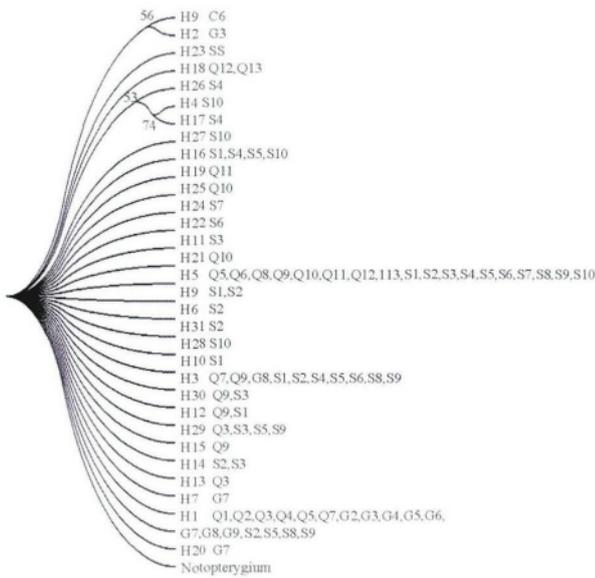


图2 羌活 ITS 序列单倍型 NJ 树
Fig. 2 NJ tree of *Notopterygium incisum* based on the haplotype of ITS

尚短, 还没形成明显的地理分化模式。

4.3 羌活群体遗传分化原因分析 ①羌活雌雄异株, 有有性繁殖和无性繁殖 2 种繁殖方式, 但在自然条件下以营养繁殖为主^[4], 居群内部占优势的克隆生长导致其不同居群间基因交流减少, 从而产生了较大的遗传分化。②羌活主要分布于青藏高原的高山林缘下和灌丛中, 青藏高原独特而复杂的地形(青藏高原内部千山万壑、峡谷纵横)通过阻断种子或花粉的传播来阻止居群间的交流, 居群间有限的基因流($N_m = 0.38$)进一步证明了这一点。因此, 青藏高原地区的地理格局可能导致了羌活居群的隔离, 加大了居群间的遗传分化。对 *Megacodon stylophorus*^[20]、大花红景天 *Rhodiola crenulata*^[21]、独一味 *Lamiophlomis rotata*^[22] 青藏高原植物居群的遗传多样性及遗传分化研究也表明, 分布地区内复杂的地理条件, 往往是导致居群隔离, 促进居群间遗传分化的原因。③作为传统的藏药, 近年来的人为过度采挖, 加上人类活动对自然生境的破坏, 导致羌活生境的破碎化, 阻断了居群间的基因交流, 进一步加剧了居群的遗传分化。

[参考文献]

[1] 溥发鼎, 王萍莉, 郑中华, 等. 重订羌活属的分类[J]. 植物分类学报, 2000, 38 (5): 430.
[2] 王幼平, 溥发鼎, 王萍莉, 等. 中国特有属——羌活属的系

统分类研究[J]. 云南植物研究, 1996, 18 (4): 424.
[3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 170.
[4] 周毅, 蒋舜媛, 马小军, 等. 羌活资源危机和保护[J]. 中草药, 2003, 34 (10): 12.
[5] 徐惠波, 孙晓波. 羌活挥发油的药理作用研究[J]. 中草药, 1991, 22 (1): 28.
[6] 张明发, 沈雅琴. 羌活药理学研究[J]. 药学服务, 2008(5): 28.
[7] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录. 第 1 卷[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 8507.
[8] 刘卫根, 王亮生, 徐文华, 等. 不同商品等级羌活中有机酸和香豆素类化合物的测定[J]. 中成药, 2012, 34 (11): 2181.
[9] 马玉林, 李建民, 马莉, 等. 药用植物羌活的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (24): 13092.
[10] 蒋舜媛, 孙辉, 黄雪菊, 等. 羌活和宽叶羌活的环境土壤学研究[J]. 中草药, 2005, 36 (6): 917.
[11] 董生健. 野生羌活驯化栽培技术[J]. 中药材, 2010 (1): 38.
[12] 方子森, 陈小莉, 张恩和. 野生羌活的生态环境与驯化栽培[J]. 中草药, 2004, 35 (9): 1071.
[13] 唐学芳, 蒋舜媛, 孙辉, 等. 川产羌活种质遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2009, 39 (9): 1387.
[14] 张宏意, 石祥刚. 不同产地何首乌的 ITS 序列研究[J]. 中草药, 2007, 38 (6): 911.
[15] 余永邦, 秦民坚, 梁之桃, 等. 不同产区太子参的 rDNA ITS 区序列的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12 (4): 1.
[16] 严寒静, 房志坚, 余世孝. 不同种源何首乌的 ITS 序列分析及其亲缘关系研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28 (5): 922.
[17] 蒋玲艳, 郭志刚, 王翀, 等. 中国不同地区绞股蓝 ITS 序列分析[J]. 中草药, 2009, 40 (7): 1123.
[18] 闫坤, 赵楠, 李宏庆. 地黄属种间亲缘关系研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27 (6): 1112.
[19] 辛天怡, 姚辉, 罗焜, 等. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究[J]. 药学报, 2012, 47 (8): 1098.
[20] Ge X J, Zhang L B, Yuan Y M, et al. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) [J]. Biodivers Conserv, 2005, 14 (4): 849.
[21] Lei Y D, Gao H, Tsering T, et al. Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats [J]. Genet Mol Biol, 2006, 29 (2): 339.
[22] Liu J M, Wang L, Geng Y P, et al. Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau [J]. Genetica, 2006, 128 (1/3): 385.

[责任编辑 吕冬梅]