

广西甜茶种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

陈宗游^{1,2,3}, 黄夕洋², 唐 辉^{1,2,*}, 王满莲², 柴胜丰^{1,2}

(¹广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西桂林 541006; ²广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006; ³广西大学农学院, 南宁 530005)

摘 要: 采用 ISSR 分子标记对广西甜茶 (*Rubus suavissimus* S. Lee) 种质资源的遗传多样性进行分析。14 条引物在 4 个广西甜茶种群总共 85 个个体上共检测到 164 个位点, 其中多态性位点 148 个, 多态位点百分率 (PPL) 为 90.24%, 物种水平 Nei 氏基因多样性指数 (H_e) 和香农多样性指数 (H_o) 分别为 0.2514 和 0.3875, 表现出较高的遗传多样性; 而在种群水平上, PPL 为 57.32% ~ 68.90% (均值为 61.74%), H_e 为 0.1831 ~ 0.2161 (均值为 0.1958), H_o 为 0.2776 ~ 0.3264 (均值为 0.2956), 遗传多样性为中等偏低水平。Nei 氏遗传多样性分析和 AMOVA 分析表明, 广西甜茶的遗传变异主要存在于种群内, 但其种群间存在极显著的遗传变异 ($P < 0.01$), 其种群遗传分化达到极大水平 ($\Phi_{st} = 0.262 > 0.25$)。Mantel 检测表明, 种群间的遗传距离和地理距离之间存在显著相关性 ($r = 0.967$, $P < 0.05$)。UPGMA 聚类分析和主成分分析 (PCA) 结果一致, 4 个广西甜茶种群可分成 2 个遗传分支。鉴于广西甜茶在种群水平上表现出中等偏低的遗传多样性水平, 且其生境受到破坏以及野生资源受到滥挖乱采, 广西甜茶面临种群退化的威胁, 对其应加强保护, 做到保护和利用并举。

关键词: 广西甜茶; 遗传多样性; ISSR; 遗传分化; 基因流

中图分类号: S 571; S 567.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 01-0161-09

ISSR Analysis on Genetic Diversity for Germplasm Resources of *Rubus suavissimus*

CHEN Zongyou^{1,2,3}, HUANG Xiyang², TANG Hui^{1,2,*}, WANG Manlian², and CHAI Shengfeng^{1,2}

(¹Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guilin, Guangxi 541006, China; ²Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi 541006, China; ³College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: In this study, the genetic diversity of germplasm resources of *Rubus suavissimus* S. Lee was analyzed by ISSR (Inter simple sequence repeats) molecular marker technique. Fourteen ISSR primers were used to amplify 85 DNA samples which were extracted from the individuals of four natural populations of *R. suavissimus*. A total of 164 bands were detected, of which 148 bands were polymorphic with a polymorphic proportion of 90.24%. At the species level, the Nei's genetic diversity (H_e) and Shannon's information index (H_o) were 0.2514 and 0.3875, respectively. *R. suavissimus* maintained a relatively high genetic variability at the species level. At the population level, PPL range from 57.32% to

收稿日期: 2016 - 11 - 14; **修回日期:** 2016 - 12 - 23

基金项目: 桂林市科技成果转化与推广项目 (20140124-2); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金课题 (FPRU2015-4); 广西植物研究所基本业务费项目 (桂植业 16004)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: th@gxib.cn)

68.90% with a mean of 61.74%, H_e range from 0.1831 to 0.2161 with a mean of 0.1958, H_o range from 0.2776 to 0.3264 with a mean of 0.2956. And there was a lower middle genetic variability at the population level. Although most variation consistently originated from the interior of populations which was detected based on Nei's genetic diversity analysis and analysis of molecular variance, a significantly genetic differentiation existed among populations ($P < 0.01$, $\Phi_{st} = 0.262 > 0.25$). A mantel test indicated there was a significant relationship between genetic distance and geographic distance among the populations studied ($r = 0.967$, $P < 0.05$). The result of UPGMA clustering analysis was basically similar to that of the principle coordinate analysis (PCA), and four populations could be classified into two distinct genetic groups. Given the lower middle genetic variability at the population level and a serious habitat destruction and indiscriminate digging Luancai in the species, the populations of *R. suavissimus* faces the threat of degradation, and it should be taken practical measures to enhance the protection and rational utilization of resources for the species.

Keywords: *Rubus suavissimus*; genetic diversity; ISSR; genetic differentiation; gene flow

广西甜茶 (*Rubus suavissimus* S. Lee) 为蔷薇科悬钩子属多年生灌木, 别名为甘叶悬钩子, 主产于中国广西 (李树刚, 1981), 是低热能, 高甜度, 具有保健功能的珍稀甜味植物 (徐位坤, 1984)。其性凉, 味甘、平, 无毒, 具有清热解毒、润肺、祛痰止咳、清肝明目、促进新陈代谢、调节人体免疫功能、强身健体和抗衰老等功效 (廖曼云和覃国忠, 1985; 梁坚 等, 2003); 广西甜茶还具有抗炎症和抗过敏性作用 (徐健飞 等, 2007)。在民间, 广西甜茶有悠久的历史, 因其叶味甜, 常被作茶饮用, 故而得名“甜茶” (梁盛业 等, 1998)。

近年来, 由于广西甜茶产地开荒等活动, 生境受到不同程度的破坏, 野外调查 (唐辉 等, 2011) 发现其自然分布区域和面积在逐年减少。植物生境丢失造成种群和个体数的减少会致使其种内遗传多样性的丢失, 最终不利于植物的生存。ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记已成功应用于悬钩子属植物种间亲缘关系的分析 (董晓莉, 2009; 和志娇 等, 2011a; 杨正送 等, 2013) 和遗传多样性的检测 (Hong et al., 2003; Anne et al., 2011; 和志娇 等, 2011b)。鉴于广西甜茶的自然资源日益减少的状况, 本研究中应用 ISSR 分子标记对 4 个广西甜茶种群总共 85 个个体进行了分析, 目的在于研究其遗传多样性水平、种群遗传结构等, 为广西甜茶种质资源的保护和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2012 年 5 月, 采集 4 个广西甜茶自然种群, 即连山种群、平南种群、象州种群和永福种群 (表 1), 共 85 份样品。每个种群采集的植株株间距尽量达到 10 m 以上。选取生长良好的植株采集幼嫩叶片, 置于密封袋中并用硅胶进行快速干燥, 室温下保存备用。

ISSR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 为加拿大哥伦比亚大学所公布的第 9 套 ISSR 引物; $MgCl_2$ 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶等购于宝生物工程 (大连) 有限公司; λ -EcoT14 I Digest DNA Marker 购于华美生物工程公司。

仪器设备包括: 离心机(珠海黑马医学仪器有限公司); TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); PCR 仪(美国 BIO-RAD 伯乐公司, Model: PTC-200); DYCP-34 型电泳槽(北京市六一仪器厂); UVP 凝胶成像系统。

表 1 广西甜茶 4 个自然种群的采样点概况
Table 1 Details of the four sampling sites of wild *R. suavisissimus*

种群 Population	采样地点 Sampling locality	纬度/经度 Latitude/Longitude	海拔/m Altitude	取样数 Sampling size
连山 Lanshan	广东连山县 Lianshan County, Guangdong Province	24°03'47.7"/112°01'26.5"	439 ± 4.19	24
平南 Pingnan	广西平南县 Pingnan County, Guangxi Province	23°57'1"/110°18'37.8"	171 ± 1.24	16
象州 Xiangzhou	广西象州县 Xiangzhou County, Guangxi Province	23°50'41.2"/109°51'43.3"	601 ± 4.65	23
永福 Yongfu	广西永福县 Yongfu County, Guangxi Province	24°40'13.1"/110°06'11.4"	710 ± 5.12	22

1.2 ISSR 分析

采用改良 CTAB 法(Doyle, 1991)提取叶片总 DNA, 用 1%琼脂糖凝胶电泳法检验 DNA 质量, 用紫外可见分光光度计测定 DNA 浓度, 并将其稀释到 20 ng · μL⁻¹, -20 °C 保存备用。

ISSR-PCR 反应体系: 25 μL 的体系中含 MgCl₂ 2.0 mmol · L⁻¹, dNTP 0.2 mmol · L⁻¹, 引物 0.8 μmol · L⁻¹, 0.75 U *Taq* 酶, 80 ng 模板 DNA, 10×缓冲液 2.5 μL, 超纯水补至 25 μL。扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min, 随后循环扩增 35 次(包括 94 °C 变性 1 min, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min)最后 72 °C 延伸 10 min(黄夕洋 等, 2013)。以连山种群的样本 DNA 为模板对 100 条引物进行筛选, 将条带清晰、多态性好且能稳定重复的引物筛选出来, 备用。

电泳检测: 取 8 μL 扩增产物, 加 2 μL 缓冲液, 以 λ-EcoT14 I Digest DNA Marker 作为标准分子量对照, 在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳 1.5 h, 经溴化乙锭(EB, 0.5 μg · mL⁻¹)染色 15 min, 然后置 UVP 凝胶成像系统中拍照、记录。

ISSR 电泳结果采取 0/1 赋值记带, 同一引物的同一位点有带记为 1, 无带记为 0, 构建表型数据矩阵。就数据矩阵对各引物的位点数和多态性位点数进行人工统计并计算其多态位点百分率(PPL), 而各种群及物种水平的多态位点百分率(PPL)、等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei 氏基因多样性指数(H_e)和香农多样性指数(H_o)采用 POPGENE 1.32 软件(Yeh et al., 1997)进行计算, 同时采用该软件计算遗传参数: Nei 氏遗传距离(D)、遗传一致度(I)、总的基因多样性(H_t)、种群内基因多样性(H_s)、遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m), 种群间基因多样性(D_{st})由公式 $D_{st} = H_t - H_s$ (Nei, 1973) 求算。采用 Mathematica 软件(Wolfram Research)通过经纬度计算种群间的地理距离。采用 GenALEx 6.3 软件(Peakall & Smouse, 2006)进行 Mantel test 分析, 以检测种群间遗传距离与地理距离间的相关性, 同时采用该软件进行分子方差分析(AMOVA)及主成分分析(PCA), 分子方差分析(AMOVA)用于判断种群内、种群间的变异方差分布, 其中, PHlst 系数(Φ_{st})是反映群体遗传分化程度的重要指标(Buso et al., 1998)。根据 Nei 氏遗传距离, 用 NTSYSp 2.02 软件(Rohlf, 1998)对各种群进行聚类分析, 确定各种群间的相互关系。

2 结果与分析

2.1 不同引物检测的位点数和多带性

从 100 条 ISSR 引物中共筛选出 14 条扩增谱带清晰并呈多态性的引物, 对广西甜茶 4 个种群 85

个个体进行扩增(表2)。14条引物总共检测到164个位点,其中多态性位点148个,多态位点百分率(PPL)为71.42%~100%,平均89.97%。每条引物扩增出的位点数8到16个不等,平均为11.71个,而平均多态位点为10.57个。

表2 ISSR引物序列及其扩增结果
Table 2 The sequences and amplification results of 14 ISSR primers

引物 Primer	引物序列* Sequence (5'→3')	位点数 Number of loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态位点百分率/% Percentage of polymorphic loci (PPL)
UBC807	(AG) ₈ T	15	15	100.00
UBC809	(AG) ₈ G	11	11	100.00
UBC810	(GA) ₈ T	11	10	90.91
UBC811	(GA) ₈ C	16	14	87.50
UBC817	(CA) ₈ A	11	10	90.91
UBC818	(CA) ₈ G	9	7	77.78
UBC841	(GA) ₈ YC	13	12	92.31
UBC842	(GA) ₈ YG	14	13	92.86
UBC853	(TC) ₈ RT	9	9	100.00
UBC855	(AC) ₈ YT	11	10	90.91
UBC856	(AC) ₈ YA	14	10	71.42
UBC857	(AC) ₈ YG	12	12	100.00
UBC864	(ATG) ₆	10	9	90.00
UBC881	(GGGTG) ₃	8	6	75.00
合计 Total		164	148	
均值 Mean		11.71	10.57	89.97

*: R = (A, G), Y = (C, T) .

2.2 种群遗传多样性

在物种水平上,广西甜茶的等位基因数(N_a)为1.9024,有效等位基因数(N_e)为1.4170,多态位点百分率(PPL)为90.24%,Nei氏基因多样性指数(H_e)为0.2514,香农多样性指数(H_o)为0.3875(表3)。

在种群水平上,等位基因数(N_a)的变化范围为1.5732~1.6890,平均为1.6174;有效等位基因数(N_e)变化范围为1.3071~1.3688,平均为1.3331;多态位点百分率(PPL)的变化范围为57.32%~68.90%,平均为61.74%;Nei氏基因多样性指数(H_e)的变化范围为0.1831~0.2161,平均为0.1958,香农多样性指数(H_o)的变化范围为0.2776~0.3264,平均为0.2956。 N_a 、 N_e 、 H_e 和 H_o 均以连山种群的最大,永福种群的最小,4个种群的遗传多样性水平差异不大(表3)。

表3 基于14条ISSR引物的4个广西甜茶种群的遗传多样性水平
Table 3 Statistics analysis of genetic diversity for the four populations of *R. suavissimus* based on 14 ISSR primers

种群 Population	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Nei氏基因多样性指数 H_e	香农多样性指数 H_o	多态位点百分率/% PPL
连山 Lianshan	1.6890 ± 0.4643	1.3688 ± 0.3748	0.2161 ± 0.1983	0.3264 ± 0.2783	68.90
平南 Pingnan	1.5793 ± 0.4952	1.3306 ± 0.3705	0.1939 ± 0.1995	0.2913 ± 0.2847	57.93
象州 Xiangzhou	1.6280 ± 0.4848	1.3261 ± 0.3764	0.1900 ± 0.2003	0.2871 ± 0.2823	62.80
永福 Yongfu	1.5732 ± 0.4961	1.3071 ± 0.3559	0.1831 ± 0.1940	0.2776 ± 0.2782	57.32
均值 Mean	1.6174	1.3331	0.1958	0.2956	61.74
物种水平 Species level	1.9024 ± 0.2976	1.4170 ± 0.3494	0.2514 ± 0.1776	0.3875 ± 0.2390	90.24

注: 部分描述性统计值用“平均值 ± 标准差”表示。
Note: Some parameters were showed by the model of “Mean ± Standard deviation” .

2.3 广西甜茶的种群遗传遗传分化

广西甜茶种群基因多样性 Nei 氏分析结果是：总的基因多样性 (H_t) 为 0.2491 (标准差 0.0314)，种群内基因多样性 (H_s) 和种群间基因多样性 (D_{st}) 分别为 0.1958 (标准差 0.0210) 和 0.0533，种群间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.2142， H_s 和 D_{st} 分别占 H_t 的 78.60%、21.40%，这表明广西甜茶的遗传变异主要存在于种群内。

AMOVA 分析的结果同样反映出相似的结论，在总的遗传变异中，73.80%的变异发生在种群内，26.20% ($\Phi_{st} = 0.262$) 的变异发生在种群间，但种群间的遗传变异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。广西甜茶种群间的基因流 (N_m) 为 1.8339。

2.4 种群间的遗传距离和遗传一致度

广西甜茶 4 个种群两两之间的遗传一致度和遗传距离 (表 4) 的范围分别 0.8826 ~ 0.9419 和 0.0599 ~ 0.1249，平均值分别为 0.91145 和 0.0931。其中平南种群和象州种群遗传一致度最大 (0.9419)，遗传距离最小 (0.0599)；连山种群和永福种群遗传一致度最小 (0.8826)，遗传距离最大 (0.1249)。

表 4 广西甜茶 4 个种群的遗传一致度 (对角线上方) 和遗传距离 (对角线下方)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between populations of *R. suavisissimus*

种群 Population	连山 Lianshan	平南 Pingnan	象州 Xiangzhou	永福 Yongfu
连山 Lianshan		0.9034	0.8838	0.8826
平南 Pingnan	0.1016		0.9419	0.9393
象州 Xiangzhou	0.1236	0.0599		0.9177
永福 Yongfu	0.1249	0.0627	0.0859	

在 UPGMA 聚类图中 (图 1)，平南种群先和象州种群聚在一起，接着这两个种群再与永福种群聚在一起，最终才与连山种群聚在一起。

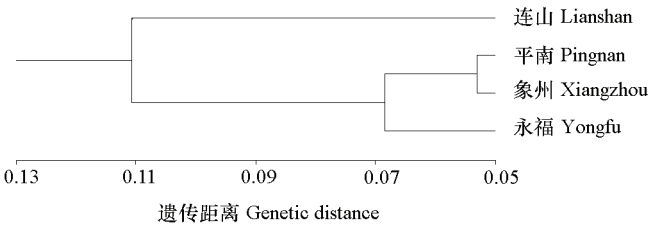


图 1 基于 Nei 氏遗传距离的广西甜茶种群 UPGMA 聚类

Fig. 1 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distances among 4 populations of *R. suavisissimus*

主成分分析的结果 (图 2)，横轴 PC1 和纵轴 PC2 所代表的差异分别为 32.53%和 24.81%，平南种群、象州种群和永福种群聚在一起，它们远离连山种群。经 Mantel 检测，种群间的遗传距离和地理距离之间存在显著的相关性 ($r = 0.967$, $P < 0.05$)。

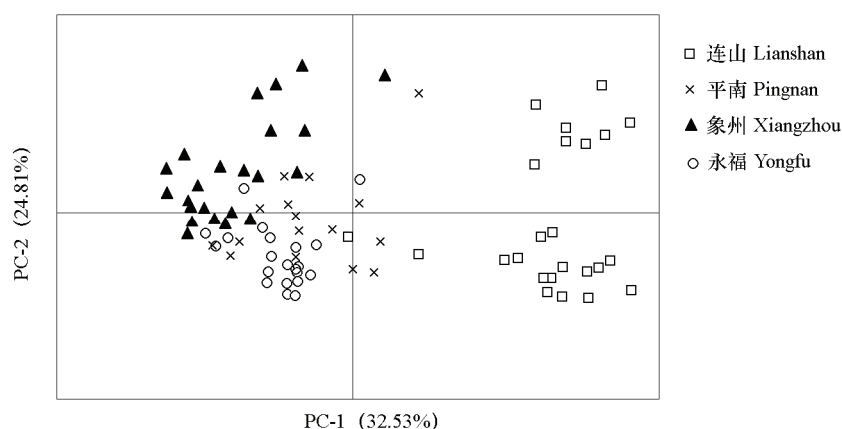


图2 广西甜茶4个种群个体的主成分分析

Fig. 2 Principal coordinates analysis (PCA) on the individuals of 4 populations in *R. suavisissimus*

3 讨论

3.1 广西甜茶的遗传多样性

遗传多样性是生物生存（适应）和发展（进化）的前提（沈浩和刘登义，2001），对种群（或物种）遗传多样性的准确评价有助于分析其进化潜力和预测其未来命运，对物种种质资源的保护和利用有重要的指导意义。本研究发现，4个广西甜茶种群的遗传多样性水平差异不大， $PPL = 57.32\% \sim 68.90\%$ ， $H_e = 0.1831 \sim 0.2161$ ， $H_o = 0.2871 \sim 0.3264$ ，种群水平的遗传多样性 $H_e = 0.1958$ ，虽然略微高于同属的三叶悬钩子的 $H_e = 0.177$ （和志娇等，2012），但低于 Nybom（2004）基于 RAPD、AFLP、ISSR 等显性标记所统计的多种植物种群水平遗传多样性的平均值（0.22 或 0.23），这表明广西甜茶种群遗传多样性为中等偏低水平。相对而言，广西甜茶在物种水平上还保持着较高的遗传多样性（ $PPL = 90.24\%$ ， $H_e = 0.2514$ ， $H_o = 0.3875$ ）。这种在种群水平上遗传多样性偏低而在物种水平上保持较高遗传多样性的现象也出现在其同属植物三叶悬钩子和红泡刺藤上（和志娇等，2011b, 2012）。

能确定和改变植物种群遗传多样性的因素有物种的繁育系统、遗传漂变、基因突变和基因流等内部因素，同时还包括由于环境变化和人为干扰引起的种群隔离、生境片段化等外部因素（文亚峰等，2010），并且这些因素彼此之间具有联系和协同性。广西甜茶是广西及粤北地区特有的野生珍稀甜味植物，其零星地分布于北纬 $22^{\circ}43'23.3'' \sim 24^{\circ}40'13.1''$ ，东经 $109^{\circ}51'43.3'' \sim 112^{\circ}01'26.5''$ 区域内的金秀、永福、象州、岑溪等县（市）（唐辉等，2011），分布区域狭窄，种群规模有限。长期以来因过渡采挖等不合理的开发利用方式，导致其野生资源逐年锐减。而近 10 余年来，由于经济建设的迅速发展以及农村产业结构的调整，许多广西甜茶野生资源区域已被拓为建设用地或大面积垦荒为农用地，其天然分布区域被严重破坏，生境的片段化加剧。野外调查发现广西甜茶成片的植株已为罕见，其多呈零星分布。而广西的桂平和昭平在 20 世纪 80 年代被发现广西甜茶分布，目前已难觅踪迹（唐辉等，2011）。

一般而言，种群变小及隔离会增加种群内的亲缘个体之间的交配机会，从而增加了遗传漂变和近交的作用，进而导致遗传多样性的丧失，最终使得种群内遗传多样性下降。因此推测广西甜茶的祖先可能具有较丰富的遗传基础，但随着人类活动的日益频繁，生境片段化加剧，其种群水平

的遗传多样性随着各种群的个体数目和分布范围变小而下降, 而在物种水平上所有种群一起在整体上保留了其祖先较为丰富的总体遗传多样性。当然, 导致狭域种在物种水平上具有较高水平遗传多样性的因素还有很多, 如新种形成、繁育系统、形态突变、多次奠基者效应等 (Lewis & Crawford, 1995; Zawko et al., 2001), 而这些因素如何影响广西甜茶的总体遗传多样性则有待进一步深入研究。

3.2 广西甜茶种群的遗传结构与分化

Nei 氏遗传多样性分析和 AMOVA 分析均表明, 广西甜茶的遗传变异主要存在于种群内, 其自然种群间的遗传分化程度 ($G_{st} = 0.2142$, $\Phi_{st} = 0.262$) 低于 Nybom (2004) 所统计的基于 ISSR 标记研究的植物的平均分化水平 ($G_{st} = 0.34$, $\Phi_{st} = 0.350$), 也低于其同属植物三叶悬钩子 ($G_{st} = 0.3351$, $\Phi_{st} = 0.330$) (和志娇 等, 2012) 和红泡刺藤 ($G_{st} = 0.2815$, $\Phi_{st} = 0.345$) (和志娇 等, 2011b) 的遗传分化水平。然而, Wright (1951) 认为分化指数 (Φ_{st} 相当于分化指数) 介于 0 ~ 0.05 之间说明种群间分化很弱, 0.05 ~ 0.15 之间表示中等分化, 0.15 ~ 0.25 之间表示分化大, 大于 0.25 表明分化极大, 本研究结果 Φ_{st} 为 0.262, 说明广西甜茶种群间遗传分化极大。这可能与广西甜茶的繁育系统及其种群间的地理隔离有关, Cozzolino 等 (2003) 研究表明, 高山或河道的物理隔离对生物种群间的遗传分化有一定的影响。

调查发现, 广西甜茶的繁殖方式主要有种子繁殖和根蘖繁殖。野外不少的广西甜茶植株是通过其母株的根蘖苗发育而形成的, 而这种通过根蘖繁殖的后代, 其向外扩散的能力有限, 根蘖繁殖方式很难使得遗传物质在不同种群间进行迁移。至于种子繁殖方式, 目前未发现关于广西甜茶的繁育系统的研究报道, 尚不清楚其花粉或种子如何在不同的种群间进行传播, 但广西甜茶分布区域地形复杂, 一些种群之间被连绵的山地或丘陵所隔离, 而且它们之间有一定的地理距离, 这种地理上的物理隔离势必对广西甜茶种群间的花粉或种子交流带来不利的影响。另外, 由于人类活动干扰使种群数量及规模逐渐缩小, 种群之间的地理距离增加, 这也给种群间的基因交流带不利影响。物种种群间的基因交流受到限制后, 其种群间的遗传分化水平也会相应的增大。

在本研究中, UPGMA 聚类图和主成分分析 (PCA) 图均显示出分布于广西的 3 个自然种群在亲缘上聚为一支, 它们之间的地理距离较近, 其亲缘关系亦较为相近。而广东连山种群则单独成为一支。Mantel 检测也表明广西甜茶种群间的遗传距离和地理距离之间存在显著的相关性 ($r = 0.967$, $P < 0.05$), 高的相关系数表明: 93.5% 的遗传距离差异是由于地理距离的因素造成。事实上, 地理距离相近的种群更有利于花粉或种子在种群间传播, 基因交流相对容易, 种群间的遗传相似度更高。

3.3 广西甜茶的保护及利用

广西甜茶在种群水平上表现出中等偏低的遗传多样性水平, 又因其分布区域狭窄且生境受到破坏而面临种群退化的威胁。因此, 对广西甜茶应保护和利用并举, 两者并重。植物遗传多样性是植物种质资源创新和品种改良的物质基础 (张文婧 等, 2013), 保护广西甜茶应着重保护其遗传多样性。广东连山和广西平南种群具有较高的遗传多样性, 建议将其作为优先保护和利用的种群, 同时, 注意其他区域广西甜茶的保护与利用。应采取就地保护和迁地保护相结合。就地保护目的在于让其群落保持自然的更新演替, 使之能够在自然界继续生存下去的; 迁地保护可以通过建立广西甜茶种质圃, 收集和保存不同类型 (品系) 的广西甜茶, 以保证该物种绝大部分的遗传多样性得到保存。加强广西甜茶良种选育、引种驯化和种群内优良单株的选择等方面的研究, 通过人工规模化种植广

西甜茶以满足甜茶加工业的原料需求。

References

- Anne F L, Irwin N F, Dennis F W, Melissa K M. 2011. Genetic diversity in the invasive *Rubus phoenicolasius* as compared to the native *Rubus argutus* using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biological Invasions*, 13 (8): 1735 - 1738.
- Buso G S C, Rangel P H, Ferreira M E. 1998. Analysis of genetic variability in south American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology*, 7 (1): 107 - 117.
- Cozzolino S, Cafasso D, Pellegrino G. 2003. Fine-scale phylogeographical analysis of mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 12: 2783 - 2792.
- Dong Xiao-li. 2009. Study on molecular phylogeny of the genus *Rubus* from southwest China and the genetic relationship wild excellent germplasm and introduced cultivars [Ph. D. Dissertation]. Chengdu: Sichuan Agricultural University. (in Chinese)
- 董晓莉. 2009. 西南地区悬钩子属植物分子系统学研究及其与栽培品种的遗传差异分析 [博士学位]. 成都: 四川农业大学.
- Doyle J. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation, In://: Hewitt G M, Johnston A. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin: Springer: 283 - 293.
- He Zhi-jiao, He Jia-wei, Cheng Zai-quan, Yang Zheng-song, Li Yan, Yang Yan-lin, Yang Hong-tao. 2011a. Analysis of genetic relationship of *Rubus* in Yunnan by ISSR. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 20 (11): 164 - 169. (in Chinese)
- 和志娇, 和加卫, 程在全, 杨正松, 李燕, 杨燕林, 杨洪涛. 2011a. 滇西北部分悬钩子属植物亲缘关系的 ISSR 分析. *西北农业学报*, 20 (11): 164 - 169.
- He Zhi-jiao, He Jia-wei, Cheng Zai-quan, Yang Zheng-song, Yang Hong-tao, He Wen-jia. 2012. Genetic diversity in the natural population of *Rubus delavayi* demonstrated by inter-simple sequence repeats. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (11): 2142 - 2150. (in Chinese)
- 和志娇, 和加卫, 程在全, 杨正松, 杨洪涛, 和文佳. 2012. 三叶悬钩子自然居群遗传多样的 ISSR 分析. *园艺学报*, 39 (11): 2142 - 2150.
- He Zhi-jiao, He Jia-wei, Yang Zheng-song, Cheng Zai-quan, Yang Yan-lin, Li Yan, Huang Xing-e. 2011b. ISSR analysis of genetic diversity of *Rubus niveus* Thumb. population. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 31 (12): 2406 - 2411. (in Chinese)
- 和志娇, 和加卫, 杨正松, 程在全, 杨燕林, 李燕, 黄杏娥. 2011b. 红泡刺藤居群的遗传多样性研究. *西北植物学报*, 31 (12): 2406 - 2411.
- Hong Y P, Kim M J, Hong K N. 2003. Genetic diversity in natural populations of two geographic isolates of Korean black raspberry. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78 (3): 350 - 354.
- Huang Xi-yang, Tang Hui, Kong De-xin, Wang Man-lian, Shi Yan-cai, Zou Rong. 2013. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions in *Rubus suavissimus* S. Lee. *Genomics and Applied Biology*, 32 (4): 526 - 532. (in Chinese)
- 黄夕洋, 唐辉, 孔德鑫, 王满莲, 史艳财, 邹蓉. 2013. 广西甜茶 ISSR-PCR 反应条件的建立与优化. *基因组学与应用生物学*, 32 (4): 526 - 532.
- Lewis P O, Crawford D J. 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*, 82: 141 - 149.
- Li Shu-gang. 1981. Sweet tea, a new *Rubus* (Rosaceae) from Guangxi. *Guihaia*, 1 (4): 17 - 19. (in Chinese)
- 李树刚. 1981. 甜茶, 悬钩子属一新种. *广西植物*, 1 (4): 17 - 19.
- Liang Jian, Zhao Peng, Li Bin, Yang Jun-feng, Liu Rong-zhen, Huang Chao-pei, He Li, He Qi-qun, Li Yu-sheng. 2003. Acute and chronic toxicity of *Rubus suavissimus*. *Guangxi Medical Journal*, 25 (12): 2395 - 2397. (in Chinese)
- 梁坚, 赵鹏, 李彬, 杨俊峰, 刘荣珍, 黄超培, 何励, 何启君, 李裕生. 2003. 甜茶的急性和长期毒性研究. *广西医学*, 25 (12): 2395 - 2397.
- Liang Sheng-ye, Deng Shao-lin, Liang Gui-juan. 1998. *Rubus suavissimus* S. Lee. *Plants*, (3): 10 - 11. (in Chinese)
- 梁盛业, 邓绍林, 梁桂娟. 1998. 广西甜茶. *植物杂志*, (3): 10 - 11.

- Liao Man-yun, Qin Guo-zhong. 1985. A study of toxicological experimient on sweet tea. *Guihaia*, 5 (11): 43 - 49. (in Chinese)
- 廖曼云, 覃国忠. 1985. 甜茶的毒理学实验研究. *广西植物*, 5 (11): 43 - 49.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70 (12): 3321 - 3323.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143 - 1155.
- Peakall R, Smouse P E. 2006. GenALEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288 - 295.
- Rohlf F J. 1998. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Software, Setauket, New York.
- Shen Hao, Liu Deng-yi. 2001. Summary of genetic diversity. *Journal of Biology*, 18 (3): 5 - 7. (in Chinese)
- 沈 浩, 刘登义. 2001. 遗传多样性概述. *生物学杂志*, 18 (3): 5 - 7.
- Tang Hui, Liang Hui-ling, Wang Man-lian, Kong De-xin, Huang Xi-yang, Shi Yan-cai. 2011. Investigation of wild germplasm resources of *Rubus suavisissimus* S. Lee. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 34 (1): 26 - 31. (in Chinese)
- 唐 辉, 梁惠凌, 王满莲, 孔德鑫, 黄夕洋, 史艳财. 2011. 广西甜茶野生种质资源调查研究. *中药材*, 34 (1): 26 - 31.
- Wen Ya-feng, Han Wen-jun, Wu Shun. 2010. Plant genetic diversity and its influencing factors. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 30 (12): 80 - 87. (in Chinese)
- 文亚峰, 韩文军, 吴 顺. 2010. 植物遗传多样性及其影响因素. *中南林业科技大学学报*, 30 (12): 80 - 87.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenices*, 15: 323 - 354.
- Xu Jian-fei, Chen Quan-bin, Zhang Qiao-yun. 2007. Bibliometrics analysis of state-of-art of *Rubus suavisissimus* S. Lee. *Guangxi Journal of Light Industry*, (1): 26 - 28. (in Chinese)
- 徐健飞, 陈全斌, 张巧云. 2007. 广西蔷薇科甜茶研究现状文献计量分析. *广西轻工业*, (1): 26 - 28.
- Xu Wei-kun. 1984. Sweet tea. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 徐位坤. 1984. 甜茶. 北京: 中国林业出版社.
- Yang Zheng-song, He Zhi-jiao, He Jia-wei, Cheng Zai-quan, Bi Hai-lin, Wang Chao-wen. 2013. Genetic relationship analysis between wild species and cultivars of *Rubus* L. by ISSR marker. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 26 (2): 691 - 696. (in Chinese)
- 杨正送, 和志娇, 和加卫, 程在全, 毕海林, 王朝文. 2013. 悬钩子属野生种及品种亲缘关系的 ISSR 分析. *西南农业学报*, 26 (2): 691 - 696.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, Ye Z H, Mao J X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis (Ver. 1.32) . Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Zawko G, Krauss S L, Dixon K W, Sivasithamparam K. 2001. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae) . *Molecular Ecology*, 10: 2389 - 2396.
- Zhang Wen-jing, Zhang Yong-qing, Yuan Qing-jun, Huang Lu-qi, Jiang Dan, Jing Li. 2013. Prospect and application of microsatellite population genetics in study of geoh herbs. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 38 (24): 4232 - 4237. (in Chinese)
- 张文婧, 张永清, 袁庆军, 黄璐琦, 姜 丹, 荆 礼. 2013. 微卫星在道地药材群体遗传学研究中的应用与展望. *中国中医杂志*, 38 (24): 4232 - 4237.