



基于SSR标记的广东栽培益智群体遗传多样性分析

刘朝玉, 林艳, 吴保欢, 羊海军, 李薇, 崔大方

引用本文:

刘朝玉, 林艳, 吴保欢, 羊海军, 李薇, 崔大方. 基于SSR标记的广东栽培益智群体遗传多样性分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(3): 329–335.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4433>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

广东省猴耳环遗传多样性研究

Genetic Diversity of *Archidendron clypearia* in Guangdong Province

热带亚热带植物学报. 2021, 29(5): 539–546 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4337>

基于表型性状和SSR标记的57份辣椒种质遗传多样性分析

Genetic Diversity Analysis of 57 Germplasms of *Capsicum annuum* Based on Phenotypic Traits and SSR Markers

热带亚热带植物学报. 2020, 28(4): 356–366 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4185>

19个茶树杂交新品系主要性状比较及其遗传多样性分析

Main Agronomic Characters and Genetic Diversity of 19 Cross New Lines of Tea Cultivars

热带亚热带植物学报. 2021, 29(6): 649–659 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4376>

火龙果种质资源果实特性的遗传多样性分析

Genetic Diversity Analysis of Fruit Traits of *Hylocereus undatus* Germplasm Resources

热带亚热带植物学报. 2019, 27(4): 432–438 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4007>

基于SSR分子标记的草果栽培起源分析

Analysis of Cultivation Origin of *Amomum tsaoko* Based on SSR Marker

热带亚热带植物学报. 2021, 29(6): 660–668 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4377>

向下翻页, 浏览PDF全文

基于 SSR 标记的广东栽培益智群体遗传多样性分析

刘朝玉^{1a,2*}, 林艳^{1a*}, 吴保欢^{1a}, 羊海军^{1b}, 李薇^{1c}, 崔大方^{1a**}

(1. 华南农业大学, a. 林学与风景园林学院; b. 基础实验与实践训练中心; c. 华南农业博物馆, 广州 510462; 2. 贵州省凯里市第一中学, 贵州 凯里 556000)

摘要: 为了解广东栽培益智(*Alpinia oxyphylla*)群体的遗传多样性, 采用 SSR 分子标记技术对 166 份种质的遗传差异进行研究。结果表明, 14 对 SSR 引物共检测到 88 个等位基因, 每对引物检测的有效等位基因为 1.198~3.279, 平均 2.599; Shannon 多样性信息指数为 0.736~1.890, 平均 1.107。方差分析表明 20.87% 的变异来自组间, 79.13% 的变异来自组内。基于主成分分析和遗传结构分析表明, 供试 166 份益智样本可分为 4 大类群, 但没有反映出形态特征的规律性。因此, 益智种质资源具有较高遗传多样性, 且遗传变异主要发生在群体内, 群体间的遗传分化较低, 且基于表型性状的类型划分和基于 SSR 分子标记的聚类未能实现一致性。

关键词: 益智; 表型性状; 遗传多样性; SSR; 遗传结构

doi: 10.11926/jtsb.4433

Genetic Diversity of Cultivated Populations of *Alpinia oxyphylla* in Guangdong Based on SSR Marker

LIU Chaoyu^{1a,2*}, LIN Yan^{1a*}, WU Baohuan^{1a}, YANG Haijun^{1b}, LI Wei^{1c}, CUI Dafang^{1a**}

(1a. College of Forestry and Landscape Architecture; 1b. Center of Experimental Teaching for Common Basic Courses; 1c. South China Agricultural Museum, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Kaili First Middle School of Guizhou, Kaili 556000, Guizhou, China)

Abstract: In order to understand the genetic diversity of *Alpinia oxyphylla* in Guangdong, the genetic differences among 166 germplasms were studied by using SSR molecular markers. The results showed that a total of 88 alleles were detected by 14 pairs of SSR primers, and the effective alleles of each primer varied from 1.198 to 3.279 with an average of 2.599. The Shannon's information index ranged from 0.736 to 1.890 with an average of 1.107. The variance analysis showed that 20.87% of the variation came between groups. Based on principal component analysis and genetic structure analysis, the 166 germplasms could be divided into four groups, which did not show the regularity of morphological characteristics. Therefore, there were high genetic diversity mainly occurred within population, but the classification based on morphological traits and the clustering based on SSR molecular markers could not achieve the consistency.

Key words: *Alpinia oxyphylla*; Phenotypic trait; Genetic diversity; SSR; Genetic structure

益智(*Alpinia oxyphylla*)为姜科(Zingiberaceae)山姜属多年生草本植物, 为中国特有种^[1], 主产于海南、广东、广西、福建和云南。作为传统中药材, 益智以成熟果实入药, 具暖肾固精、温脾止泻的功

效, 被誉为“四大南药”之一^[2-3]。随着研究的深入, 其新的药用价值还在陆续发现, 例如抗肿瘤和治疗帕金森症^[4-5]。20 世纪 80 年代以来, 国内外市场对益智仁的需求逐渐增加, 货源已从野生资源采集转

收稿日期: 2021-04-21

接受日期: 2021-07-09

基金项目: 广东省林业创新专项(2017KJCX039)资助

This work was supported by the Project for Forestry Innovation in Guangdong (Grant No. 2017KJCX039).

作者简介: 刘朝玉(1992~), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物资源保护与利用。E-mail: 1763110190@qq.com

* 共同第一作者

** 通信作者 Corresponding author. E-mail: cuidf@scau.edu.com

化为规模化半野生人工栽培,年交易量达 1 700~3 500 t^[6]。生产方式的改变,促进了益智种质资源的收集、保存、评价和利用,以及优良品种选育、种苗繁育和规范化栽培等方面的研究,不仅更好地满足消费需求,也保护了野生资源。

相对于化学成分、药理药效研究^[7-8],益智的种质资源评定、居群遗传多样性、优良品种选育等领域的研究尚处在初级阶段^[9]。Wang 等^[10]利用 ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记技术,认为益智野生居群具有较高的遗传多态性,建议通过禁止开发野生资源来保护该物种的栖息地,同时加强种质资源库的建设。王茂媛等^[11]的田间观测表明,益智在花果形态方面存在极为丰富的多态性,个体间差异明显,但株丛内具有较高的一致性,其中果序长度、果实大小和形态这 3 个性状可作为鉴别益智种质资源及杂交育种评定的重要性状。形态变异是基因型与环境压力共同作用的结果,可在一定程度上反映生物遗传变异的程度,然而王祝年等^[12]报道益智种质资源间基于 ISSR 标记的聚类与基于表型性状的聚类结果不完全一致,一方面是表型性状不仅受遗传物质影响,也受海拔、经纬度、郁闭度等环境因子要素的影响^[13];另一方面,ISSR 具有通用随机引物特征从而导致物种特性不强。相对的,SSR (simple sequence repeat) 是在复制或修复过程中 DNA 滑动和错配或染色单体不均等交换的结果,具有较高的物种特异性,可用于鉴定杂合子和纯合子^[10,14]。SSR 长度为 100~200 bp。因微卫星中重复单位的数目有极高的变异现象,所表现出的变异现象为微卫星单位数目成整倍性变异或可能出现重复单位序列中的序列不完全一样,从而形成多态性位点。SSR 分子标记技术已成功应用于多种农林植物的遗传多样性分析、目标基因的标定和指纹图谱的构建等研究中^[14-16]。

20 世纪 70 年代开始,广东省从海南引种益智,至今种植面积已近 4 000 hm²,其中茂名地区的信宜、高州最为集中连片^[17-18],由于益智良种选育工作严重滞后,以及农户分散经营的业态,导致目前广东省境内种植的益智种质十分混杂,形态变异多样,产量差异显著,抗逆性参差不齐^[19-20]。本研究利用 SSR 分子标记技术针对广东省益智栽培群体进行遗传多样性的分析研究,探讨其遗传多样性丰富度、遗传结构及类型的划分,为广东省栽培益智种质资源的保护育种及良种选育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样本采集

本试验益智(*Alpinia oxyphylla*)材料分别采自广东省茂名地区的信宜白石镇岳龙村、洪冠镇洪胜村,高州古丁镇大窝村和龙马村、深镇镇良坪村、新垌镇高良村以及阳江市阳春双滘镇榕木村。根据益智果和叶片的形态特征分类划分为 10 个群体(Z1~Z8、DA 和 YC),共 166 份材料(表 1)。采集益智新鲜叶片,放入-80 °C 冰箱保存用于后续 DNA 提取。

表 1 益智样本采集信息

Table 1 Sample collection information of *Alpinia oxyphylla*

种群 Population	形态特征 Morphological character	数量 Number
Z1	中果, 略椭圆形 Medium fruit, slightly elliptic	17
Z2	中果, 披针叶 Medium fruit, lanceolate	18
Z3	小果, 披针叶 Small fruit, lanceolate	17
Z4	中果, 椭圆叶 Medium fruit, oval leaf	18
Z5	长椭圆果 Oblong fruit	15
Z6	大披针叶 Large lanceolate	15
Z7	大圆果 Big round fruit	15
Z8	小披针叶 Small lanceolate	17
DA	-	18
YC	-	16

1.2 DNA 提取和测序

使用北京天根新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP320 提取益智鲜叶片总 DNA,经 1%琼脂糖凝胶电泳和核酸浓度检测合格后稀释至 50 ng/ μ L,用于后续基因组测序。

1.3 SSR 引物扩增

23 对 SSR 引物来自于邹颖^[21](表 2),经 PCR 扩增选择具有稳定扩增和多态性良好的 14 对引物(表 3)。SSR 扩增反应体系总体积为 10 μ L,包括 2 \times Taq PCR Master Mix 5 μ L,模板 DNA 1 μ L (50 ng/ μ L),上游引物 0.1 μ L (100 ng/ μ L),下游引物 0.4 μ L (100 ng/ μ L),带荧光的 M13 引物 0.4 μ L (100 ng/ μ L),ddH₂O 3.1 μ L。扩增反应程序:95 °C 预变性 5 min;然后 95 °C 变性 45 s,52 °C~62 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 20 min。

1.4 SSR 数据分析

SSR 数据采用 PopGene (ver. 1.32)^[22]进行遗传

表 2 SSR 引物序列

Table 2 Sequence of SSR primers

引物 Primer	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (3'~5')
YZ1	GGTAGAAGGATGTGCCAAA	ATCCACGTTTAGGTGCGAAG
YZ2	AAGAAGCGTTGGTGAGAGGA	GGGAGCCAACATCATCTGA
YZ5	GAGGAGGACGAGGAGAGGAC	CCAACAGCCCTCTTTTTGA
YZ7	ACCGAGACTCCACTGCGTAT	TCCTCGTTACTGTGCAATCG
YZ10	CCATGGTTGTGCGAGAAAGGT	CACATTGCCTTCCTCTGTGA
YZ12	GCTGAAGGGAAAAGATTCG	TGGAAAAGTTTATGGGTGTGC
YZ16	ATGTGGAGTCATCGGTAGCC	TATGTCACCTGCGACGTCAT
YZ21	CGCAATTTGAGACCATCTGA	GCATGTTTTTCGGAGGAAGAG
YZ22	CCAAACCCTAGCACACAAT	GACGTCACGAATGTTGGTTG
YZ23	GCAGTGTGGTAAGCAGTCCA	GGGCCAAAATTGAGTGCTAA
YZ24	CATTCGATCTCCTTCGGTTC	CTCATGAATGCTCACGGATG
YZ27	CAAGCTATTGCCACGTGATG	AAGGTCGAGCAGGAGTAGCA
YZ31	CTAAAGCGCCATCTCCAGTC	GGCCATCGGTAGAGGAACA
YZ44	CAGGAAGATTGCGATGAAGC	ACCCTACTCTCCCATCTGC
YZ45	TTGAAATTTGAAAAGCAACATCA	CGAATTGGAAAGTAATATATGACC
YZ46	GATAACTGTCTTCTTCTATTTCTCC	CCTCGCCATCAAAATCATCT
YZ53	TTCGGTGGAAAGACAGAGACA	TTGATTCTGCCTCCCATTTTC
YZ60	TCGACATGAAATCCCTACGA	GTGAAGTGAAAGGGCGAAAAG
YZ61	TGACTCCAAACTTGCAGGAG	AGCAGATCAATGCACGTGAG
YZ65	GCGAAACCCTCTCATCCTTA	CCATCTCCTCGTCTTTTCA
YZ66	ACCTGATGAGTTCCTTGCATC	AGCCAAATGAACGGACAGAT
YZ67	TTGACTTGGGTATGGCAAAA	GGACCCAAGAAGATCGAACA
YZ77	TGTGAACCAGGGAATCCAAA	AACTCACTTGAGGCCAACTT

表 3 益智的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *Alpinia oxyphylla*

引物 Primer	个体数 (<i>N</i>) Number of individuals	等位基因数 (<i>N_a</i>) Number of alleles	有效等位基因数 (<i>N_e</i>) Effective number of alleles	Shannon's 信息指数 (<i>I</i>) Shannon's information index	观测杂合度 (<i>H_o</i>) Observed heterozygosity	期望杂合度 (<i>H_e</i>) Expected heterozygosity
YZ1	166	3.800	2.324	0.883	0.493	0.468
YZ2	165	3.200	2.141	0.809	0.146	0.460
YZ5	165	4.300	3.167	1.176	0.659	0.633
YZ7	161	2.400	1.845	0.682	0.364	0.429
YZ10	164	3.400	2.669	0.966	0.589	0.542
YZ12	165	4.100	3.031	1.176	0.679	0.644
YZ16	160	4.400	3.279	1.235	0.425	0.655
YZ21	166	4.500	3.041	1.055	0.563	0.518
YZ23	166	4.800	2.822	1.074	0.468	0.541
YZ24	164	3.100	2.149	0.654	0.090	0.337
YZ46	166	4.200	2.892	1.167	0.696	0.649
YZ53	162	4.500	2.838	1.052	0.354	0.555
YZ60	145	4.100	2.994	1.123	0.591	0.608
YZ67	142	1.400	1.198	0.190	0.159	0.123
平均 Mean	162	3.729	2.599	0.956	0.448	0.512

多样性统计, 计算 Shannon's 信息指数(Shannon's information index, *I*)、等位基因数(observed number of alleles, *N_a*)、有效等位基因数(effective number of alleles, *N_e*)、观测杂合度(*H_o*)、期望杂合度(*H_e*)、群体间基因流(*N_m*)和 Nei's 遗传距离^[23]。

利用 Arlequin (ver. 3.5.1)分析群体间和群体内差异, 位点和群体间的遗传分化系数(*F_{st}*), 进行 AMOVA 分子方差和显著性分析, 参数“Number of permutations”设置为 9 999, “Number of permutations”设置为 100, 显著性水平设置为 0.05^[24]。利用

Structure (ver. 2.3.4)软件对群体进行遗传结构分析,利用 Structure Harvester 计算 ΔK 值和 $\ln P(D)$ 值,计算群体最佳 K 值^[25]。采用 R 软件(www.r-project.org/)中 ape 包的 pcoa 函数进行 PCoA 主坐标分析,并绘制样本分布散点图。

2 结果和分析

2.1 遗传多样性分析

SSR 位点多态性 从表 3 可见,14 对引物在 166 份栽培益智种质中共检测出 88 个等位基因,每对引物检测等位基因 1.198~3.279 个,平均 3.729 个;Shannon's 信息指数为 0.190~1.235;观测杂合度为 0.090~0.696,平均 0.448;期望杂合度为 0.123~0.655,平均 0.512。

群体遗传多样性比较 采用 PopGene 进行群体遗传多样性分析(表 4),群体间有效等位基因数最小为 1.653 个,最大为 4.023 个,平均 2.599 个;

平均每个群体可扩增出 16.121 个个体,检测到 3.721 个等位基因位点;Shannon's 信息指数为 0.520~1.463,均值为 0.946;观测杂合度和期望杂合度分别为 0.328~0.683 和 0.385~0.714,平均分别为 0.448 和 0.512。其中,DA 群体的 Shannon's 信息指数最高,为 1.463,等位基因数和有效等位基因数分别为 6.000 和 4.017,表明 DA 群体的遗传多样性最为丰富。

群体遗传分化分析 从表 5 可见,益智群体的遗传分化系数 F_{st} 为 0.043~0.265,平均为 0.131, $0.050 \leq F_{st} \leq 0.150$ 的有 27 组,占比 49.1%, $0.150 \leq F_{st} \leq 0.250$ 的有 15 组,占比 27.3%,表明该益智种质大部分群体间处于中等偏高遗传分化程度。Z4 和 Z5 群体的遗传分化系数最高,为 0.265,最低的是 Z2 和 Z3,为 0.043。

AMOVA 方差分析 从表 6 可见,在显著性水平 $P < 0.001$ 下,20.87%的遗传变异发生在群体间,79.13%的遗传变异发生在群体内,说明益智群体遗

表 4 益智群体的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity in *Alpinia oxyphylla* populations

群体 Population	个体数 (N) Number of individuals	等位基因数 (N_a) Number of alleles	有效等位基因数 (N_e) Effective number of alleles	Shannon's 信息指数 (I) Shannon's information index	观测杂合度 (H_o) Observed heterozygosity	期望杂合度 (H_e) Expected heterozygosity
Z1	16.214	3.357	2.406	0.898	0.409	0.505
Z2	17.143	2.357	1.857	0.621	0.328	0.385
Z3	16.357	2.429	1.766	0.594	0.356	0.369
Z4	17.357	2.143	1.653	0.520	0.347	0.322
Z5	14.643	4.571	2.858	1.142	0.453	0.591
Z6	14.857	4.643	3.224	1.212	0.474	0.621
Z7	14.286	3.429	2.374	0.937	0.488	0.532
Z8	16.714	2.714	1.815	0.632	0.355	0.374
DA	17.786	6.000	4.017	1.463	0.683	0.714
YC	15.857	5.571	4.023	1.441	0.590	0.703
平均 Mean	16.121	3.721	2.599	0.946	0.448	0.512

传变异主要发生在群体内,群体间的遗传分化较低。

2.2 群体遗传结构分析

利用 Structure 软件基于贝叶斯数学模型对 166 份益智种质资源进行初步群体结构分析,结果表明,当 K 值为 4 时,模型的后验概率最大(图 1)由此可见,将供试益智样本划分为 4 个类型最为合适(图 2)。从群体遗传结构图可以看出,群体 Z2、Z3、Z4 和 Z8 的遗传背景较为相似,群体 Z5、Z9、Z10 较为独立而各成一体,而群体 Z1、Z6、Z7 存在一

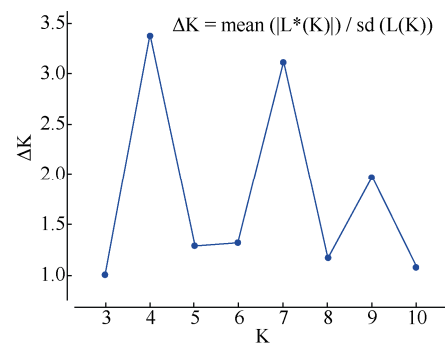


图 1 不同 K 值时 ΔK 值的变化

Fig. 1 Changes in ΔK at different K values

表 5 益智群体间的 F_{st}

Table 5 F_{st} among *Alpinia oxyphylla* populations

群体 Population	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	DA	YC
Z1	****									
Z2	0.087	****								
Z3	0.104	0.043	****							
Z4	0.156	0.075	0.062	****						
Z5	0.151	0.212	0.219	0.265	****					
Z6	0.085	0.103	0.121	0.140	0.082	****				
Z7	0.085	0.058	0.083	0.084	0.162	0.076	****			
Z8	0.091	0.050	0.056	0.075	0.207	0.095	0.072	****		
DA	0.179	0.226	0.237	0.258	0.109	0.119	0.165	0.230	****	
YC	0.139	0.165	0.169	0.184	0.129	0.091	0.124	0.161	0.089	****

表 6 益智群体变异的 AMOVA 分析

Table 6 AMOVA variation analysis of *Alpinia oxyphylla* populations

变异来源 Variance resource	自由度 Degree of freedom	变异组分 Variation component (Φ_{st})	P
群体间 Between groups	9	1.015 (20.87%)	<0.001
群体内 Within group	322	3.855 (79.13%)	<0.001
总和 Total	331	4.865 (100%)	

定的遗传渐渗(图 2)。

PCoA 主坐标分析结果表明(图 3), 所有个体在二维空间上表现出集群分布特征, 大致可分为 4 个区, A 区主要包含来自 Z1、Z2、Z3、Z4、Z7 和 Z8 群体的个体, B 区主要包含来自 Z1、Z5 和 Z6 群体的个体, C 和 D 区则分别来自 YC 和 DA 群体。其

中, C 区的植株形态为叶小、中果, 种子较小; D 区的植株形态为叶大、中果, 种子较大; A 区的植株形态叶较小、果实有大有小, 种子有大有小; B 区的植株形态为叶大、果实为小果, 种子有大有小, 各类群与表型特征之间未呈现出明显关联性。

3 结论和讨论

物种遗传分化程度的高低受地理范围、生态环境以及繁育系统等因素的影响^[26-27]。Wright^[28]首次将群体遗传分化程度进行了划分: $0 \leq F_{st} \leq 0.05$ 表示遗传分化极小, 可以不考虑遗传分化; $0.05 \leq F_{st} \leq 0.15$ 表示处于中等水平; $0.15 \leq F_{st} \leq 0.25$ 表示遗传分化较大; $F_{st} \geq 0.25$ 表示遗传分化极大。本研究采用 SSR 分子标记对 166 份广东产益智种质进行遗传多样性分析, 广东益智的遗传分化系数为 0.043~0.265, Shannon's 指数均值为 0.946, 高于海南产野生种质的 0.337 3^[12], 表明广东栽培的益智种质遗传多样性较高, 遗传背景更为复杂。

本研究在形态分类的基础上对群体遗传结构分析, 可将 166 份广东益智种质分为 4 大类群, 基于 PCoA 分析在二维空间上同样表现出集群分布特征, 但 4 个区域的益智植株个体并没有反映出形态特征的规律性, 表现在基于分子标记的聚类结果出现较多的个体混杂现象, 与基于形态的分类群体不

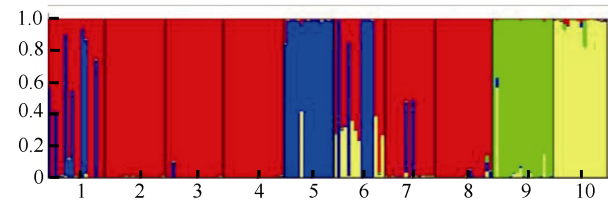


图 2 益智群体的遗传结构图。1~8: Z1~Z8; 9: DA; 10: YC。

Fig. 2 Genetic structure map of *Alpinia oxyphylla* population. 1~8: Z1~Z8; 9: DA; 10: YC.

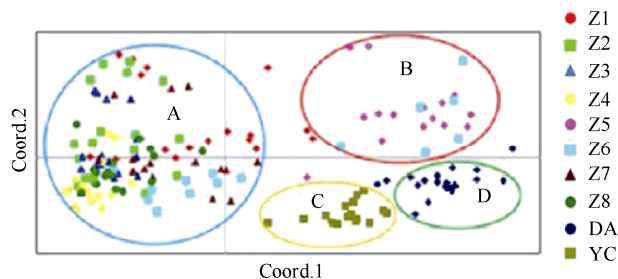


图 3 主坐标分析图

Fig. 3 Principal coordinate analysis map

能较好地实现一致性,可能的原因:首先,益智主产海南,广东后于海南开展益智栽培,很长时间内,农户都自行从海南的不同地方分批引种,造成种源混杂,种质混乱的局面;其次,本研究所采用表型性状仅包含果实,叶片性状以及种子,而影响植物分类精确性的性状多达几十个^[29],因此性状数量不足将会造成分类误差,此外,植物表型性状容易受到人为选择和环境干扰的特性也会使分类结果产生误差^[30];第三,引物数量影响分子标记准确性,本研究所选用引物为 14 对,引物不足会使覆盖的基因组范围受到限制,导致基因组信息显示不全,从而对聚类结果产生影响。因此,后续研究应充分考虑多方面因素,提高植物形态分类和分子标记聚类的精确性。

参考文献

- [1] South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences. Flora of Guangdong [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1987: 418–419.
中国科学院华南植物园. 广东植物志 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1987: 418–419.
- [2] LUO X Z, YU J G, XU L Z, et al. Studeis on the chemical constituents of the fruits from *Alpinia oxyphylla* [J]. Acta Pharm Sin, 2000, 35(3): 204–207. doi: 10.3321/j.issn:0513-4870.2000.03.012.
罗秀珍, 余竞光, 徐丽珍, 等. 中药益智化学成分的研究 [J]. 药理学学报, 2000, 35(3): 204–207. doi: 10.3321/j.issn:0513-4870.2000.03.012.
- [3] CHEN W P. General situation of southern medicine resources in Hainan Province [J]. Trop For, 2004, 32(3): 8–11. doi: 10.3969/j.issn.1672-0938.2004.03.003.
陈伟平. 海南省南药资源概况 [J]. 热带林业, 2004, 32(3): 8–11. doi: 10.3969/j.issn.1672-0938.2004.03.003.
- [4] LI W J, XIAO S, ZHENG Q, et al. Mechanism of volatile oil from *Alpinia oxyphylla* in treating Alzheimer's disease based on GC-MS and network pharmacology [J]. China J Chin Mat Med, 2021, 6(15): 1–8. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20210301.401.
李文静, 肖帅, 郑琴, 等. 基于 GC-MS 技术和网络药理学探讨益智仁挥发油治疗阿尔茨海默病的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 6(15): 1–8. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20210301.401.
- [5] DUAN L H, LI M WANG C B, et al. Protective effects of organic extracts of *Alpinia oxyphylla* against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells [J]. Neur Regener Res, 2020, 15(4): 682–689. doi: 10.4103/1673-5374.266918.
- [6] HU Y H, TAO Z L, ZHANG L H, et al. Investigation report on the production and market of *Alpinia oxyphylla* Miq. [J]. Chin J Trop Agric, 2003, 23(4): 28–34. doi: 10.3969/j.issn.1009-2196.2003.04.008.
胡耀华, 陶忠良, 张令宏, 等. 几种阴生药用植物产销情况调查报告 (I. 益智) [J]. 热带农业科学, 2003, 23(4): 28–34. doi: 10.3969/j.issn.1009-2196.2003.04.008.
- [7] DUAN Z W, CHEN T, CHEN L, et al. Optimization of different extraction process and antioxidant activity of polyphenols from *Alpinia oxyphylla* fructus hull [J]. Food Sci Technol, 2021, 46(4): 180–187. doi: 10.13684/j.cnki.spkj.2021.04.028.
段宙位, 陈婷, 陈龙, 等. 益智仁壳多酚不同提取工艺优化及其提取物的抗氧化性比较 [J]. 食品科技, 2021, 46(4): 180–187. doi: 10.13684/j.cnki.spkj.2021.04.028.
- [8] THAPA P, LEE Y J, NGUYEN T T, et al. Eudesmane and eremophilane sesquiterpenes from the fruits of *Alpinia oxyphylla* with protective effects against oxidative stress in adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. Molecules, 2021, 26(6): 1762. doi: 10.3390/molecules26061762.
- [9] CHEN Y R, GAO B M, PENG C, et al. Application of PCR-based molecular markers in southern medicine *Alpinia oxyphylla* Miquel study [J]. Mol Plant Breed, 2016, 14(7): 1804–1808. doi: 10.13271/j.mpb.014.001804.
陈玉容, 高炳淼, 彭超, 等. 基于 PCR 技术的分子标记在南药益智研究中的应用 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(7): 1804–1808. doi: 10.13271/j.mpb.014.001804.
- [10] WANG H Y, LIU X J, WEN M F, et al. Analysis of the genetic diversity of natural populations of *Alpinia oxyphylla* Miquel using inter-simple sequence repeat markers [J]. Crop Sci, 2012, 52(4): 1767–1775. doi: 10.2135/cropsci2011.06.0323.
- [11] WANG M Y, YAN X X, WANG Z N, et al. Studies on morphological diversity of *Alpinia oxyphylla* flowers and fruits [J]. Bot Res, 2019, 8(1): 99–106. doi: 10.12677/BR.2019.81014.
王茂媛, 晏小霞, 王祝年, 等. 益智花果形态多样性研究 [J]. 植物学研究, 2019, 8(1): 99–106. doi: 10.12677/BR.2019.81014.
- [12] WANG Z N, QIU Y L, YAN X X, et al. Morphological variation and ISSR analysis of *Alpinia oxyphylla* germplasm resources from Hainan Island [J]. Chin J Trop Crops, 2016, 37(9): 1695–1702. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2016.09.007.
王祝年, 邱燕连, 晏小霞, 等. 海南岛益智种质资源表型变异及 ISSR 分析 [J]. 热带作物学报, 2016, 37(9): 1695–1702. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2016.09.007.
- [13] DIAO S F, SHAO W H, JIANG J M, et al. Phenotypic diversity in natural populations of *Sapindus mukorossi* based on fruit and seed traits

- [J]. *Acta Ecol Sin*, 2014, 34(6): 1451–1460. doi: 10.5846/stxb201306211756.
- 刁松锋, 邵文豪, 姜景民, 等. 基于种实性状的无患子天然群体表型多样性研究 [J]. *生态学报*, 2014, 34(6): 1451–1460. doi: 10.5846/stxb201306211756.
- [14] YAO M Z, CHEN L, MA C L, et al. Comparative analysis of genetic diversity among the tea cultivars from China, Japan and Kenya revealed by ISSR and EST-SSR [J]. *Mol Plant Breed*, 2009, 7(5): 897–903. doi: 10.3969/mpb.007.000897.
- 姚明哲, 陈亮, 马春雷, 等. ISSR 和 EST-SSR 标记在检测中国、日本和肯尼亚茶树品种遗传多样性上的比较分析 [J]. *分子植物育种*, 2009, 7(5): 897–903. doi: 10.3969/mpb.007.000897.
- [15] CASASOLI M, MATTIONI C, CHERUBINI M, et al. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102(8): 1190–1199. doi: 10.1007/s00122-001-0553-1.
- [16] HE D H, XING H Y, LI T T, et al. Genetic diversity of 92 cotton accessions evaluated with SSR markers [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2010, 30(8): 1557–1564.
- 贺道华, 邢宏宜, 李婷婷, 等. 92 份棉花资源遗传多样性的 SSR 分析 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(8): 1557–1564.
- [17] ZENG W, WU Z Q, LIN J R. The present situation and development strategy of *Alpinia oxyphylla* Miq. in Maoming [J]. *Trop For*, 2015, 43(3): 14–15. doi: 10.3969/j.issn.1672-0938.2015.03.004.
- 曾武, 吴祖强, 林锦容. 茂名地区益智产业现状及发展对策 [J]. *热带林业*, 2015, 43(3): 14–15. doi: 10.3969/j.issn.1672-0938.2015.03.004.
- [18] YAN X X, WANG M Y, WANG J R, et al. Breeding of new *Alpinia oxyphylla* variety “Qiongzong No. 1” [J]. *J Chin Med Mat*, 2019, 42(6): 1211–1214. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2019.06.001.
- 晏小霞, 王茂媛, 王建荣, 等. 益智新品种“琼中 1 号”的选育研究 [J]. *中药材*, 2019, 42(6): 1211–1214. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2019.06.001.
- [19] WU Z Q, ZENG W, HUA L, et al. The present situation and development way of *Alpinia oxyphylla* industry in Gaozhou City [J]. *China Trop Agric*, 2016(1): 26–28. doi: 10.3969/j.issn.1673-0658.2016.01.008.
- 吴祖强, 曾武, 华列, 等. 高州市益智产业现状与发展途径 [J]. *中国热带农业*, 2016(1): 26–28. doi: 10.3969/j.issn.1673-0658.2016.01.008.
- [20] JIA Y X. Assessment and investigation of germplasm resources of *Alpinia Oxyphylla* Miq. in Maoming [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.
- 贾益兴. 茂名地区益智种质资源分类与评价 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [21] ZHOU Y. Genetic diversity and structure of *Alpinia oxyphylla* Miquel (Zingiberaceae) [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013.
- 邹颖. 益智(姜科)遗传多样性和遗传结构的研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.
- [22] YEH F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE Version 1.32: Microsoft window-based freeware for population genetics analysis [R]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [23] NEI M. Genetic distance between populations [J]. *Am Nat*, 1972, 106(949): 283–292. doi: 10.1086/282771.
- [24] EXCOFFIER L, LISCHER H E L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Mol Ecol Res*, 2010, 10(3): 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- [25] PRITCHARD J K, WEN X Q, FALUSH D. Documentation for *structure* software, version 2.3 [R]. Chicago: University of Chicago, 2010.
- [26] HAMRICK J L, GODT M J W, SHERMAN-BROYLES S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. *New For* 1992, 6(1/2/3/4): 95–124. doi: 10.1007/BF00120641.
- [27] NYBOM H, BARTISH I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Persp Plant Ecol Evol Syst*, 2000, 3(2): 93–114. doi: 10.1078/1433-8319-00006.
- [28] WRIGHT S. The genetical structure of populations [J]. *Ann Eugen*, 1949, 15(1): 323–354. doi: 10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x.
- [29] LIU D H. On classification and diversity of *Echinochloa* Beauv. in main rice regions of China [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2014. doi: 10.7666/d.Y2526772.
- 刘德好. 中国主要稻区稗属植物分类与多样性研究 [D]. 上海: 上海师范大学, 2014. doi: 10.7666/d.Y2526772.
- [30] ZHANG Q Q, LIANG S, WANG Y, et al. Genetic diversity analysis of 57 germplasm of *Capsicum annuum* based on phenotypic traits and SSR markers [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2020, 28(4): 356–366. doi: 10.11926/jtsb.4185.
- 张强强, 梁赛, 王艳, 等. 基于表型性状和 SSR 标记的 57 份辣椒种质遗传多样性分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2020, 28(4): 356–366. doi: 10.11926/jtsb.4185.