

基于核基因 ITS 及叶绿体 psbA-trnH 和 trnS-trnG 基因怀地黄栽培起源探讨

夏至, 黄勇, 李贺敏, 周艳, 高致明*

河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002

摘要: 目的 从野生型驯化为栽培品种角度分析地黄 *Rehmannia glutinosa* 的遗传多样性, 探讨河南焦作地区怀地黄的栽培起源。方法 对地黄野生自然居群, 栽培品种及其近缘物种 ITS、psbA-trnH 和 trnS-trnG 序列进行扩增和测序, 分析比较中药材地黄野生自然居群, 栽培品种间各序列的单倍型类型和核苷酸多态性, 构建 Neighbor-Joining (NJ) 分子系统发育树。结果 单倍型分析结果显示, 地黄野生居群单倍型类型数量 (ITS 6 个, psbA-trnH 8 个, trnS-trnG 9 个) 明显高于怀地黄栽培品种单倍型类型数量 (ITS 3 个, psbA-trnH 2 个, trnS-trnG 3 个)。地黄野生居群的单倍型多样性和核苷酸多样性均远高于怀地黄栽培品种间, 在 3 个基因联合系统树上, 地黄野生居群和栽培品种所有样品与茄叶地黄聚在一支, 支持率为 90%; 23 个栽培品种 (29 个样本) 与来自温县的 10 号地黄野生居群聚为一支, 支持率为 78%。结论 地黄野生型驯化为栽培品种过程发生了明显的遗传瓶颈, 导致现存怀地黄栽培品种遗传基础狭窄, 遗传多样性降低。怀地黄栽培品种可能起源于河南温县区域的地黄野生群体。

关键词: ITS; psbA-trnH; trnS-trnG; 怀地黄; 起源

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0423-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.024

Origin of cultivated *Rehmannia glutinosa* based on chloroplast gene psbA-trnH, trnS-trnG, and nuclear ITS sequences

XIA Zhi, HUANG Yong, LI He-min, ZHOU Yan, GAO Zhi-ming

College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Objective In order to understand the genetic diversity of cultivated and wild *Rehmannia glutinosa*, and to unravel the origin of cultivated *R. glutinosa*. **Methods** The sequences of nuclear gene ITS and chloroplast gene psbA-trnH, trnS-trnG in cultivar and wild population of *R. glutinosa* were amplified and sequenced. Haplotype (gene) diversity and nucleotide polymorphism of three genes from wild and cultivars of *R. glutinosa* were analyzed and compared in this study. Phylogenetic tree was constructed based on combined three genes using Bayesian inference (BI) methods. **Results** Analysis of sequences indicated that the number of haplotype (ITS, 6; psbA-trnH, 8; trnS-trnG, 9) in wild population of *R. glutinosa* was obviously higher than the number of Haplotype (ITS, 3; psbA-trnH, 3; trnS-trnG, 3) in cultivars of *R. glutinosa*. Haplotype diversity and nucleotide polymorphism of wild population of *R. glutinosa* were far higher than that of cultivars of *R. glutinosa*. The NJ tree (combined three genes data) indicated that all cultivated and wild population of *R. glutinosa*, and *R. solanifolia* form a monophyletic clade [Posterior probability (PP) = 90%]. Twenty-three cultivars of *R. glutinosa* (including 29 samples) were clustered with Wenxian wild populations (PP = 78%). **Conclusion** The results implied very low genetic diversity existed in cultivars of *R. glutinosa* induced by the severe genetic bottleneck during the process of domestication of wild *R. glutinosa*, which resulted in the narrow genetic basis of the existing cultivars and decreased genetic diversity. Furthermore, it appeared that wild populations in Wenxian-Henan area were involved in the origin of cultivars of *R. glutinosa*.

Key words: internal transcribed spacer (ITS); psbA-trnH; trnS-trnG; *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch; origin

地黄来源于玄参科 (Scrophulariaceae) 植物地 植物在我国广为分布, 栽培历史悠久^[1-2]。作为传统
黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch, 该 的大宗中药材品种, 栽培地黄主产于河南、河北、

收稿日期: 2017-05-13

基金项目: 国家自然科学基金-面上项目(31770370); 河南省科技攻关计划项目(162102110078); 河南省高等学校重点科研项目计划(18A360006); 国家自然科学基金河南联合基金项目 (U1404302)

作者简介: 夏至 (1974—), 男, 河南固始人, 副教授, 博士, 研究方向为中药资源的分子鉴定。

Tel: (0371)63554995 Fax: (0371)63554995 E-mail: xiazhiemail@126.com

*通信作者 高致明, 教授, 主要从事中药资源的规范化种植研究。E-mail: gaozhiming672@shou.com

山东、山西等地，尤以旧称“怀庆府”的河南焦作地区为地黄道地产区，该地区出产地黄被称之为“怀地黄”，以其质量优良享誉海内外，是我国著名的“四大怀药”之一^[3]。《中国药典》2015 年版中地黄以块根入药，药材分为“鲜地黄”、“生地黄”和“熟地黄”，具有清热生津、凉血、止血；补血滋阴，益精填髓等功效。用于热病伤阴、舌绛烦渴、温毒发斑、吐血、衄血、咽喉肿痛、骨蒸劳热，肝肾阴虚、腰膝酸软等症的治疗^[4]，临床应用十分广泛。

“怀地黄”作为河南栽培的主要道地药材品种，种内变异显著，以其块根膨大成纺锤形与野生地黄有着显著区别^[5]。据文献记载，由于长期的人工栽培，“怀地黄”栽培品种多达 52 个^[6]。细胞学研究表明，野生地黄与“怀地黄”栽培品种均为四倍体 ($2n=56$)^[7-9]，关于“怀地黄”栽培品种起源被认为主要来源于四倍体野生地黄的人工驯化^[6-7,10]。但也有学者，认为现存的“野生地黄居群”很可能是地黄栽培品种逸生的产物^[11-12]。确定栽培药用植物品种是从哪种野生种驯化而来，及那些地理分布的野生种的自然居群参与栽培品种的形成，是对药用植物进行驯化育种研究首先要解决的问题，对有效利用野生种质资源具有重要的理论和应用价值^[13]。以前有关地黄的研究主要集中在药理^[14]、化学成分^[15]、遗传多样性^[11-12,16-19]及栽培地黄的连作障碍^[20]等方面。而对于“怀地黄”栽培品种的起源研究主要集中在古籍考证方面。夏至等^[21]基于 DNA 条形码序列，认为栽培“怀地黄”品种可能起源于温县当地的地黄野生群体，但该研究所选取的栽培品种较少（仅 3 个栽培品种），缺乏代表性。因此，本研究对栽培“怀地黄”品种进行广泛取样，选取来自焦作地区 25 个有代表性的怀地黄栽培品种，及 14 份采集不同区域的地黄野生居群，还包括地黄近缘物种 4 个种，共计 62 个样本。对上述种类核基因 ITS 和叶绿体基因 psbA-trnH 和 trnS-trnG 序列核苷酸多态性进行比较分析，构建系统发育树，探讨地黄野生群体在栽培驯化过程是否经历遗传的瓶颈效应，并通过上述序列构建“怀地黄”栽培品种与地黄野生居群、近缘种类的亲缘关系，探讨“怀地黄”栽培品种的起源。

1 材料与方法

1.1 材料

材料的收集包括地黄属 5 个种共 62 个样品，其

中地黄样品 58 个（包括“怀地黄”25 个栽培品种的 31 个样品，14 个地黄野生居群的 27 个样品），地黄属其他种 4 个样品，实验材料由中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室王印政研究员和河南农业大学农学院中药材系高致明教授鉴定。实验材料来源于植物新鲜叶片，经硅胶快速干燥后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱，实验材料详细信息见表 1。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的提取、扩增和测序 采用北京天根生化植物 DNA 提取试剂盒（Tiangen Biotech Co., 中国）提取样品 DNA，ITS 序列扩增使用 Wendel 等^[22]设计的引物 ITS1（5'-AGAAGTCGTAACAAG-GTTTCCGTA-3'）和 ITS4（5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'）；psbA-trnH 和 trnS-trnG 序列扩增使用叶绿体通用引物^[23]，引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应条件及扩增程序参考 Xia 等^[24]和 Shaw 等^[23]的研究。PCR 产物纯化后，送北京三博远志生物测序公司，用 ABI 3730X 测序仪（Applied Biosystems Co., 美国）进行双向测序。

1.2.2 数据处理 测序所得的峰图采用 CodonCode Aligner V 3.0（CodonCode Co., 美国）进行校对拼接，去除引物区和低质量的序列。同源 DNA 序列使用 ClustalX 软件^[25]进行排对，使用 Bioedit 软件^[26]剪切掉两端的低质量测序位点，保留高质量测序位点的一致序列进行分析。利用 DAMBE 软件^[27]进行单倍型分析，DnaSP 5.10.01 软件^[28]进行核苷酸多态分析。分子系统发育树构建利用贝叶斯法分析（MrBayes version 3.0b4）^[29]，通过 Modeltest 3.06^[30]，从 56 种 DNA 替代模型中筛选出最优替代模型。系统发生的后验概率（posterior probability, PP）是通过运行蒙特卡罗（MCMC）模拟以及对后验概率分布树取样进行估计的。选择玄参科的北玄参 *Scrophularia buergeriana* Miq. 作为外类群。利用 PP 检验各分支的支持率。探讨“怀地黄”栽培品种，地黄野生居群及其近缘种类的系统发育关系。

2 结果与分析

2.1 不同 DNA 序列单倍型分析

所有样品的基因组 DNA 提取质量较高，并成功进行了 3 个基因片段的 PCR 扩增及 PCR 产物测序，扩增和测序成功率均为 100%。本研究中“怀

表 1 植物样品来源
Table 1 Plant samples

编号	种名	采集地	编号	种名	采集地
1	裂叶地黄 <i>Rehmannia piasezkii</i>	湖北宜昌	32	地黄 (栽培郭里毛)	河南温县
2	湖北地黄 <i>R. henryi</i>	湖北兴山	33	地黄 (栽培北京 1 号)	河南温县
3	茄叶地黄 <i>R. solanifolia</i>	重庆城口	34	地黄 (栽培红薯王 2 号)	河南温县
4	天目地黄 <i>R. chingii</i>	浙江临安	35	地黄 (栽培增白 3 号)	河南温县
5	地黄 <i>R. glutinosa</i>	北京	36	地黄 (栽培增白 1 号)	河南温县
6	地黄	河南洛阳	37	地黄 (栽培增白 2 号)	河南温县
7	地黄	河南洛阳	38	地黄 (栽培沁怀 1 号)	河南温县
8	地黄	河南林州	39	地黄 (栽培 9302)	河南温县
9	地黄	河南南阳	40	地黄 (栽培保和堂 1 号)	河南温县
10	地黄	河南温县	41	地黄 (栽培 83-抚育)	河南温县
11	地黄	河南郑州	42	地黄 (栽培金九-1)	河南温县
12	地黄	河南嵩县	43	地黄 (栽培金九-2)	河南温县
13	地黄	河南安阳	44	地黄 (栽培金九-3)	河南温县
14	地黄	河南汤阴	45	地黄 (栽培金九-4)	河南温县
15	地黄	河南汤阴	46	地黄 (栽培小黑英)	河南武陟
16	地黄	河南汤阴	47	地黄 (栽培山东种)	河南温县
17	地黄	河南汤阴	48	地黄 (栽培脱毒 85-5)	河南温县
18	地黄	河南新密	49	地黄 (栽培狮子头)	河南温县
19	地黄	河南新密	50	地黄 (栽培金线钓鱼)	河南温县
20	地黄	河南新密	51	地黄 (栽培 85-5-1)	河南温县
21	地黄	河南新密	52	地黄 (栽培 85-5-2)	河南温县
22	地黄	河南新密	53	地黄 (红薯王 4 号-1)	河南温县
23	地黄	河南宜阳	54	地黄 (红薯王 4 号-2)	河南温县
24	地黄	河南宜阳	55	地黄 (栽培脱毒北京 3 号)	河南温县
25	地黄	河南宜阳	56	地黄 (栽培吨王)	河南温县
26	地黄	河南宜阳	57	地黄 (栽培怀丰-1)	河南温县
27	地黄	河南宜阳	58	地黄 (栽培怀丰-2)	河南温县
28	地黄	河南孟津	59	地黄 (栽培北京 3 号)	河南温县
29	地黄	河南孟津	60	地黄 (栽培金状元)	河南武陟
30	地黄	河南禹州	61	地黄 (北京 3 号与 85-5 杂交)	河南温县
31	地黄	河北承德	62	地黄 (栽培新 85-5)	河南温县

地黄”栽培品种与地黄野生居群单倍型分析结果显示:在取样的全部 58 份材料中,ITS 序列共出现了 8 个单倍型,分别将其命名为 A1~A8,地黄野生居群的 27 个样品中,出现 6 个单倍型,“怀地黄”栽培品种 31 个样品中,出现 3 个单倍型(表 2)。其中,29 个“怀地黄”栽培品种样品(去除 47 号栽培山东种和 55 号栽培脱毒北京 3 号)与 22 个地黄野生居群样品(去除 7、8、12、13 和 31 号野生居群)共享 A1 单倍型。地黄野生居群中,单倍型 A2、

A3、A5、A6 和 A7 分别来源 31 号河北承德野生居群、8 号河南林州野生居群、12 号河南嵩县野生居群、13 号河南安阳野生居群和 7 号河南洛阳野生居群。栽培品种中,除了共享的 A1 单倍型,其余 2 个单倍型 A4 和 A8 分别来源于 47 号栽培山东种和 55 号脱毒北京 3 号。除 A1 单倍型多频出现外,其余的 7 个单倍型在地黄野生居群和“怀地黄”栽培品种均属低频单倍型,仅出现在 1 份材料中,且 ITS 序列没有出现缺失和插入。

表 2 地黄野生居群和怀地黄栽培品种 ITS 基因单倍型数量及变异位点

Table 2 Number of ITS haplotypes and mutant sites in wild population and cultivars of *R. glutinosa*

单倍型	ITS 序列变异位点							
	157	179	214	266	279	363	471	551
A1	C	C	T	G	G	C	G	T
A2	A	T	T	G	G	C	G	T
A3	A	C	T	G	G	C	G	T
A4	C	C	C	G	G	T	G	T
A5	C	C	T	C	G	C	G	T
A6	C	C	T	C	G	C	C	T
A7	C	C	T	G	A	C	G	T
A8	C	C	T	G	G	C	G	C

在取样的全部 58 份材料中, *psbA-trnH* 序列共出现了 9 个单倍型, 分别将其命名为 B1~B9, 地黄野生居群的 27 个样品中, 出现 8 个单倍型, “怀地黄”栽培品种 31 个样品中, 出现 2 个单倍型(表 3)。其中, 29 个栽培品种样品(去除 48 号栽培脱毒 85-5 和 62 号栽培新 85-5)与 5 个地黄野生居群(来源于 9 号南阳、10 号温县、11 号郑州、12 号嵩县和 13 号安阳)共享 B1 单倍型。地黄野生居群中, 单倍型 B2、B5、B6、B8 和 B9 均属低频单倍型, 仅出现在 1 份材料中, 分别来源 8 号河南林州野生居群、5 号北京野生居群、17 号河南汤阴野生居群、18 号河南新密野生居群和 31 号河北承德野生居群。B3 和 B7 单倍型均属多频单倍型, 其中 B3 单倍型包含来自 6 号洛阳野生居群、28 和 29 号孟津野生居群。B7 单倍型包含来自 23~27 号河南宜阳 5 个野生居群, 19~22

号河南新密 4 个野生居群, 14~16 号河南汤阴 3 个野生居群, 7 号河南洛阳野生居群和 30 号河南禹州野生居群。栽培品种样品中, 除共享单倍型 B1 外, 栽培品种 48 号脱毒 85-5 和 62 号新 85-5 共享单倍型 B4。在 *psbA-trnH* 序列中出现多个碱基的缺失和插入, 在第 245~249 位点, 栽培品种 48 号脱毒 85-5 和 62 号新 85-5 出现 5 个碱基的缺失, 在第 250~254 位点, 5 号地黄北京野生居群出现 5 个碱基插入, 在第 276~278 位点、379~381 位点和 408~512 位点, 17 号地黄河南汤阴野生居群出现 3 个碱基缺失, 3 个碱基插入和 5 个碱基插入。此外在第 382~386 位点, 387~393 位点, 部分“怀地黄”栽培品种和地黄野生居群, 分别出现 5 个碱基的缺失和插入, 7 个碱基的插入和缺失。

在取样的全部 58 份材料中, *trnS-trnG* 序列共出现了 10 个单倍型, 分别将其命名为 C1~C10,

表 3 地黄野生居群和怀地黄栽培品种 *psbA-trnH* 基因单倍型数量及变异位点Table 3 Number of *psbA-trnH* haplotypes and mutant sites in wild population and cultivars of *R. glutinosa*

单倍型	<i>psbA-trnH</i> 序列变异位点										
	211	241	245~249	250~254	276~278	372	378	379~381	382~386	387~393	408~412
B1	C	T	TTTTA	-----	AAG	A	T	---	-----	ATTAAAT	-----
B2	T	C	TTTTA	-----	AAG	A	T	---	-----	-----	-----
B3	T	T	TTTTA	-----	AAG	A	T	---	-----	-----	-----
B4	C	T	-----	-----	AAG	T	-	---	AGTAA	ATTAAAT	-----
B5	C	T	TTTTA	TTTTA	AAG	A	G	---	-----	ATTAAAT	-----
B6	C	T	TTTTA	-----	---	T	-	AAA	AGTAA	ATTAAAT	TGCAA
B7	C	T	TTTTA	-----	AAG	T	-	---	AGTAA	ATTAAAT	-----
B8	C	T	TTTTA	-----	AAG	T	--	---	-----	-----	-----
B9	C	T	TTTTA	-----	AAG	A	T	---	TAAAT	ATTAAAT	-----

“-”表示缺失碱基, 下同

“-”means missing base, same as below

地黄野生居群的 27 个样品中,出现 9 个单倍型,“怀地黄”栽培品种 31 个样品中,出现 3 个单倍型(表 4)。其中,29 个“怀地黄”栽培品种样品(去除 37 号栽培增白 2 号和 48 号栽培脱毒 85-5)与来自 10 号温县地黄野生居群共享 C1 单倍型。“怀地黄”栽培品种 48 号脱毒 85-5 与来自宜阳的 5 个野生居群共享 C5 单倍型。栽培品种增白 2 号表现为单倍型 C4,属于低频单倍型。地黄野生居群中,单倍型 C2、C6、C7 和 C10 均属低频单倍型,仅出现在 1 份材料中,分别来源 8 号河南林州野生居群、31 号河北承德野生居群、9 号河南南阳野生居群和 31 号河南禹州野生居群。单倍型 C3、C8 和 C9 属于多

频单倍型,其中单倍型 C3 包含来自 6 号河南洛阳野生居群、28 和 29 号河南孟津野生居群。单倍型 C8 包含来自 11 号河南郑州野生居群,18~22 号河南新密 5 个野生居群,14~17 号河南汤阴 4 个野生居群,7 号河南洛阳野生居群。单倍型 C9 包含来自 5 号北京野生居群、12 号河南嵩县野生居群、13 号河南安阳野生居群。在 trnS-trnG 序列中出现多个碱基的缺失和插入,在第 25~34 位点,来自 8 号河南林州居群对比其他种类,有 10 个碱基的插入。在第 73~92 位点,栽培品种和部分野生类群出现 20 个碱基的插入和缺失。此外,在 105~111 位点和 583~590 位点分别出现 7 个和 8 个碱基的插入和缺失。

表 4 地黄野生居群和怀地黄栽培品种 trnS-trnG 基因单倍型类型及变异位点

Table 4 Number of trnS-trnG haplotypes and mutant sites in wild population and cultivars of *R. glutinosa*

单倍型	trnS-trnG 序列变异位点										
	25~34	73~92	105~111	234	279	299	358	359	381	497	583~590
C1	-----	TATATATACT TTCTCTATTC	TAGA ATA	T	-	A	T	-	A	G	-----
C2	TACAC ATAAT	TATATATACT TTCTCTATTC	-----	C	-	A	T	-	A	G	-----
C3	-----	-----	-----	C	-	C	T	T	G	G	-----
C4	-----	TATATATACT TTCTCTATTC	TAGA ATA	C	-	A	T	-	A	G	-----
C5	-----	-----	-----	C	-	A	-	-	G	A	-----
C6	-----	TATATATACT TTCTCTATTC	-----	C	T	A	T	-	A	G	-----
C7	-----	-----	-----	C	-	C	-	-	G	G	-----
C8	-----	-----	-----	C	-	A	-	-	G	G	-----
C9	-----	TATATATACT TTCTCTATTC	-----	C	-	A	T	-	A	G	-----
C10	-----	-----	-----	C	-	A	-	-	G	G	TTATTAAA

2.2 核苷酸多态性分析

核苷酸多态性分析结果(表 5)表明,地黄野生居群和“怀地黄”栽培品种的核基因 ITS 基因位点没有出现插入/缺失变异,叶绿体基因 psbA-trnH 和 trnS-trnG 基因出现多个碱基的插入和缺失。在地黄野生居群和“怀地黄”栽培品种中,混合群体的核基因 ITS、叶绿体基因 psbA-trnH 和 trnS-trnG 单倍型多样性(H_d)分别为 0.229、0.525 和 0.675。3 个基因(ITS/psbA-trnH/trnS-trnG)的核苷酸多态性分别为核苷酸多样性(π)0.000 61、0.001 37、0.001 91;核苷酸多态度(θ)0.002 82、0.001 47、0.001 27;核苷酸平均差异数(k)0.376、0.601、1.307,混合

群体的遗传多样性主要来自地黄野生居群。“怀地黄”栽培品种对比地黄野生居群的遗传多样性较低,野生地黄居群 3 个基因(ITS/psbA-trnH/trnS-trnG)单倍型多样性分别为 0.342、0.590 和 0.746,远远高于“怀地黄”栽培品种的 3 个基因单倍型多样性 0.127、0.125 和 0.127。野生地黄居群 3 个基因的 π 为 0.000 94、0.001 88、0.001 59; θ 为 0.002 12、0.001 75、0.001 91; k 为 0.575、0.838、1.083,均远远高于“怀地黄”栽培品种 3 个基因的 π 为 0.000 32、0.000 28、0.000 37; θ 为 0.001 23、0.000 56、0.001 10; k 为 0.194、0.125、0.254。野生地黄居群群体中的遗传多样性要远远高于“怀地黄”栽培品种间。

表 5 地黄野生居群和怀地黄栽培品种的核苷酸多样性

Table 5 Genetic diversity of different ecological populations of wild and cultivated *R. glutinosa*

位点	群体	序列数	基因座位数	H_d	π	θ	k
ITS	野生居群	27	613	0.342	0.000 94	0.002 12	0.575
	栽培品种	31	613	0.127	0.000 32	0.001 23	0.194
	混合群体	58	613	0.229	0.000 61	0.002 82	0.376
psbA-trnH	野生居群	27	474	0.590	0.001 88	0.001 75	0.838
	栽培品种	31	461	0.125	0.000 28	0.000 56	0.125
	混合群体	58	474	0.525	0.001 37	0.001 47	0.601
trnS-trnG	野生居群	27	736	0.746	0.001 59	0.001 91	1.083
	栽培品种	31	711	0.127	0.000 37	0.001 10	0.254
	混合群体	58	736	0.675	0.001 91	0.001 27	1.307

 H_d -单倍型多样性 H_d -Haplotype (gene) diversity

2.3 分子系统发育树的聚类分析

应用 PAUP* version 4.0b10 构建中药材“怀地黄”栽培品种、地黄野生居群及其近缘种类的 NJ (邻接) 系统发育树。在核基因 ITS 序列与叶绿体基因 psbA-trnH 和 trnS-trnG 联合的分子系统树上 (图 1), 野生地黄居群、“怀地黄”栽培品种与茄叶地黄聚在一支, 支持率为 90%, 支持地黄与茄叶地黄亲缘关系最近。取样 25 个栽培品种 (31 个群体) (除怀地黄栽培品种 37 号增白 2 号和 48 号脱毒 85-5), 其余 23 个栽培品种 (29 个群体) 与来自温县的 10 号地黄野生居群聚为一支, 支持率为 78%。所有野生地黄居群并没有聚成一单系分支。其中 48 号栽培品种脱毒 85-5 与来自宜阳 5 个野生居群聚在一支, 支持率为 90%。6、9、28、29 号聚为一单系分支, 支持率为 93%。37 号栽培品种增白 2 号, 与其他地黄野生居群一起, 单独分散为一支。

3 讨论

“怀地黄”栽培品种众多, 品种间形态特征具有丰富的变异^[12], 但是, 基于分子标记如 RAPD 和 ISSR 的地黄遗传多样性研究显示, “怀地黄”栽培品种的遗传多样降低, 许多主流品种间并没有出现令人信服的遗传分化^[16]。本研究基于核基因 ITS 和叶绿体基因 psbA-trnH 和 trnS-trnG 对“怀地黄”栽培品种遗传多样性分析, 支持赵楠等^[12]、周延清等^[18]和陈京荔等^[16]的研究结果, 表明“怀地黄”栽培品种的遗传基础狭窄, 品种间遗传分化不明显。通过对野生地黄居群和“怀地黄”栽培品种的核基因 ITS 和叶绿体基因 psbA-trnH 和 trnS-trnG 序列分析, 显示地黄野生居群间的单倍型多样性, 及核苷酸的多态性远远高于“怀地黄”栽培品种间, 这表明地黄在最初的驯化阶段, 少量的野生群体被选择

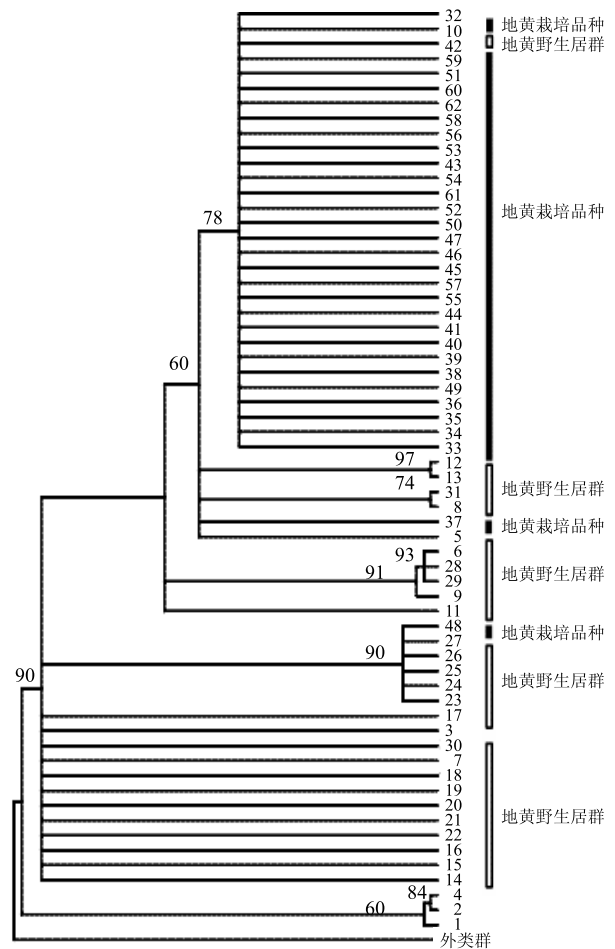


图 1 基于贝叶斯法 (ITS、psbA-trnH 和 trnS-trnG 数据) 构建系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on NJ methods (ITS, psbA-trnH, and trnS-trnG data)

作为栽培地黄祖先, 产生了所谓遗传“瓶颈效应”^[31]。后来, 表现为“怀地黄”栽培品种基因组水平的遗传多样性低下, 对比野生地黄居群, 栽培品种的单倍型数量尤其是稀有单倍型的数量大大减少。这也

表明,地黄野生居群比“怀地黄”栽培品种具有更高的遗传多样性,“怀地黄”栽培品种主要来源于地黄野生居群的人工驯化,而现存的野生地黄可能并不是“怀地黄”栽培品种逸生的产物。

关于“怀地黄”的栽培起源,文献典籍记载说法不一。据文献记载,今陕西的咸阳^[32]、河北翼县、山东临沂县和山西大荔县都曾栽培地黄的道地产区^[33],其中,长安(今陕西咸阳)道地历史最为悠久,汉代至宋代都有记载。自明代以后才提及怀庆(今河南焦作)道地产区^[34]。本研究基于 3 个基因片段联合分析,构建分子系统发育树(图 1),结果支持夏至等^[21]的研究结果,显示取样的 25 个怀地黄栽培品种中,有 23 个品种的 29 个样品与来自温县 10 号地黄野生居群聚在一支,具有 78%的支持率。48 号栽培品种脱毒 85-5 与来自河南宜阳 5 个野生居群聚在一支,支持率为 90%,37 号栽培品种增白 2 号,与其他地黄野生居群一起,单独分散为一支。单倍型(3 个基因)分析结果表明,仅来源于温县的野生地黄居群与多数怀地黄栽培品种(其中 ITS 序列、psbA-trnH、trnS-trnG 均有 29 个样品)共享 A1、B1、C1 3 个单倍型。这表明对比野生地黄,栽培地黄的遗传多样性已明显降低。中药的栽培起源不像农作物那样规模庞大,时间长,人们只是零星的种植从本区域野外收集的药用植物,所以只有有限的野生群体参与了中药的栽培起源^[35]。因此,推测“怀地黄”主流栽培品种可能起源于分布温县区域的地黄野生群体,对于极少数的栽培品种如 48 号脱毒 85-5 可能来源于河南宜阳的野生居群。本研究对“怀地黄”栽培起源进行初步探讨,栽培品种取样仅限于河南焦作,野生地黄居群取样也主要是分布在河南地区,但鉴于中药材地黄的栽培品种众多,且地黄又是一个广布种,因此进一步扩大取样范围(特别是文献记载的栽培地黄的道地产区,如陕西咸阳、河北翼县、山东临沂县和山西大荔县等地栽培和野生群体),选取其他多基因片段(特别是基于转录组数据筛选的功能基因片段)开展分子系统发育研究,方能全面探讨地黄栽培品种的起源地、栽培历史、及经历了单次起源还是多次起源、同地域起源还是异地域起源等。这将为地黄属的药用植物的资源开发与利用、品种选育、引种栽培提供可靠的理论依据。

参考文献

[1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第 67 (2) 卷

[M]. 北京: 科学出版社, 1979.

- [2] 王太霞, 李景原, 胡正海. 地黄的形态结构与化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 585-587.
- [3] 丁自勉. 地黄 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 赵焯黄. 国产地黄类生药学的研究 [J]. 药学报, 1953, 1(1): 41.
- [6] 温学森, 杨世林, 魏建和, 等. 地黄栽培历史及其品种考证 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 946-949.
- [7] 温学森, 李先恩, 赵华英, 等. 地黄常见种质的染色体观察 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 124-125.
- [8] 李宏庆. 地黄属分类学与系统学研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2005.
- [9] 夏至. 地黄属和崖白菜属的分子系统学研究—兼论地黄属和崖白菜属的科级系统位置 [D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2009.
- [10] 夏至, 李家美. 地黄属及其近缘属的药用植物资源调查研究 [J]. 商丘师范学院学报, 2009, 25(12): 96-98.
- [11] 赵楠. 地黄的遗传多样性研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [12] 赵楠, 李宏庆. 地黄居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 河南科学, 2009, 27(11): 1386-1391.
- [13] 王云生, 黄宏文, 王瑛. 作物驯化的遗传学研究及其在大豆育种中的应用 [J]. 植物学通报, 2008, 25(2): 221-229.
- [14] 刘彦飞, 梁东, 罗桓, 等. 地黄的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 16-22.
- [15] 邢洁, 徐为人, 刘鹏, 等. 栀子和地黄环烯醚萜类成分抗炎作用的虚拟评价 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 930-935.
- [16] 陈京荔, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 地黄不同品种的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 505-508.
- [17] Qi JJ, Li X E, Song J Y, et al. Genetic Relationships among *Rehmannia glutinosa* cultivars and varieties [J]. *Planta Med*, 2008, 74(15): 1846-1852.
- [18] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性 [J]. 遗传, 2004, 26(6): 922-928.
- [19] 刘春艳. 地黄属植物遗传多样性和遗传结构的研究 [D]. 西安: 西北大学. 2015.
- [20] 张重义, 李改玲, 牛苗苗, 等. 连作地黄的生理生态响应与品质评价 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9): 1133-1136.
- [21] 夏至, 王璐静, 黄勇, 等. 地黄属植物 DNA 条形码鉴定及地黄栽培起源研究 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 648-654.
- [22] Wendel J F, Schnabel A S, Seelanan T. Bidirectional inter locus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci*

- USA, 1995, 92: 280-284.
- [23] Shaw J, Lickey E B, Beck J T, *et al.* The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis [J]. *Am J Bot*, 2005, 92(1): 142-166.
- [24] Xia Z, Wang Y Z, Smith J F. Familial placement and relationships of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae sensu lato) inferred from five different gene regions [J]. *Am J Bot*, 2009, 96(2): 519-530.
- [25] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(25): 4876-4882.
- [26] Hall T A. BIOEDIT A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41(41): 95-98.
- [27] Xia X, Xie Z. DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *J Hered*, 2001, 30(7): 371-373.
- [28] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [29] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics* 2003, 19: 1572-1574.
- [30] Posada D, Crandall K A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14: 817-818.
- [31] Tanksley S D, Mccouch S R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild [J]. *Science*, 1997, 277: 1063-1066.
- [32] 曹元宇. 本草经 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [33] 刘文泰 (明). 本草品精要 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [34] 李时珍 (明). 本草纲目 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [35] 陈 川. 药用植物玄参的栽培起源、亲缘地理及东亚玄参系统发育研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.