

• 药材与资源 •

多花黄精遗传多样性和遗传变异规律研究

刘 新, 斯金平, 段承俐*, 刘京晶*

浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 临安 311300

摘 要: **目的** 揭示多花黄精遗传多样性及地理分布特征。**方法** 采用 ISSR 分子标记技术, 对来自浙江、安徽、江西、福建、湖南、湖北 6 省 20 个种源 118 株多花黄精进行综合分析。**结果** 16 条引物共扩增出 130 条清晰条带, 其中多态性条带 123 条, 平均多态百分率 (PPL) 为 94.62%, 种源内遗传多样性在 33.85%~60.00%, 平均 Nei's 基因多样性 (H_e) 为 0.183 8, Shannon 信息指数 (I) 为 0.267 4, 遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.529 3。UPGMA 聚类分析显示, 同一种源的种质基本上聚在一起, 说明种源间的遗传分化大于种源内不同个体间的基因遗传分化; 在遗传相似系数值等于 0.61 时可将 118 份种质聚为武夷山脉、武陵山脉和罗霄山脉、大别山脉、洞宫山脉和天目山脉 4 类。**结论** 多花黄精具有丰富的遗传多样性, 遗传变异与山脉密切相关, 山脉之间的平原、水域隔离可能是导致群体间遗传分化的主要原因之一。研究结果对黄精种质资源保护、品种选育具有重要的理论价值与现实意义。

关键词: 多花黄精; 种质资源; ISSR; 遗传多样性; 地理变异

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2835-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.026

Study on genetic diversity and genetic variation law of *Polygonatum cyrtonema*

LIU Xin, SI Jin-ping, DUAN Cheng-li, LIU Jing-jing

State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China

Abstract: Objective To study the genetic diversity and geographical distribution of *Polygonatum cyrtonema* resources. **Methods** ISSR technique was applied to analyze 118 individuals from 20 *P. cyrtonema* provenances in six provinces, including Anhui, Jiangxi, Fujian, Hunan, Hubei, and Zhejiang. **Results** The results showed that 130 clear bands were amplified by 16 primers with 123 polymorphic bands and the average percentage of polymorphic loci (PPL) was 94.62%, PPL within provenances was 33.85%—60.00%. Nei's genetic diversity index (H_e) was 0.183 8, Shannon's information index (I) was 0.267 4 and gene differentiation index (G_{st}) was 0.529 3. There were abundant genetic diversities existing in wild resources of *P. cyrtonema*. The UPGMA clustering analysis revealed that individuals from the same provenance were almost clustered together firstly, explaining that the genetic differentiation among different provenances was higher than those within provenances. When genetic similarity (GS) was 0.61, 118 germplasms can be divided into four categories, including Wuyi Mountains, Wuling and Luoxiao Mountains, Dabie Mountains, Donggong, and Tianmu Mountains. **Conclusion** *P. cyrtonema* has high genetic diversity, genetic variation was closely related to mountains, and the isolation of plains and water areas between mountains was one of the main causes of genetic differentiation among groups. This study had essentially theoretical value and practical significance for the protection of the germplasm resources and the breeding of the species.

Key words: *Polygonatum cyrtonema* Hua; germplasm resources; ISSR; genetic diversity; geographical variation

黄精始载于《神农本草经》, 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾等功效, 具有广阔的开发应用前景^[1-4]。多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua 是《中国药典》2015 年版药材黄精的基原植物之一, 主要分布于浙江、江苏、安徽、江西、福建、

湖南、湖北等省, 研究其遗传多样性与遗传变异规律, 对黄精种质资源保护、品种选育具有重要的理论价值与现实意义。ISSR (inter-simple sequence repeat) 自 1994 年由 Zietkiewicz 创建以来, 因可揭示出比限制性片段长度多态性 (RFLP)、

收稿日期: 2020-01-19

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2016C02058)

作者简介: 刘 新, 在读硕士, 研究方向为中药遗传多样性研究。Tel: 15957129303 E-mail: 2863648033@qq.com

*通信作者 段承俐, 副教授, 研究方向为药用植物资源评价和利用研究。Tel: 15257100887 E-mail: chenglidian@hotmail.com

刘京晶, 讲师, 研究方向为天然产物化学成分分析。Tel: 18258183852 E-mail: jing_jing_6@163.com

随机扩增多态性 DNA (RAPD)、微卫星 DNA (SSR) 更多的多态性而被广泛应用于植物种质资源鉴定、进化与亲缘关系分析、遗传多样性与居群遗传结构检测、遗传作图、基因定位、分子标记辅助育种等方面研究^[5-6]。近年来,分子标记技术在黄精属 *Polygonatum* Mill. 植物的种源鉴定、遗传多样性分析、亲缘关系等方面的研究中得到了广泛应用^[7-12],但对多花黄精主要分布区种质资源遗传多样性与地理变异规律研究未见报道。为此,本实验基于 ISSR 分子标记技术,对采自安徽、江西、福建、湖南、湖北及浙江 6 省 20 个种源多花黄精遗传多样性和遗传变异规律进行了综合分析。

1 材料

2016 年 8 月至 2017 年 12 月,对安徽、江西、湖南、湖北、福建、浙江、云南、重庆、贵州等 16 个省“黄精”资源进行调查与收集,每个种源采集 15 个单株以上,采样单株间隔 5 m 以上,并详细记录采集地的海拔、经纬度、植被等样品采集信息^[13],种质资源统一种植于杭州市临安区天目山镇横塘村麻泥角弄浙江农林大学黄精种质资源圃。经斯金平教授鉴定采自安徽、江西、福建、湖南、湖北、浙江 6 个省 20 个种源地的种质为多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua, 样品信息见表 1。ISSR 材料为采自黄精种质资源圃的新鲜叶片, DNA 提取前用冰盒保存,置于实验室-20 °C 冰箱里保存备用。

表 1 多花黄精样品采集地信息

Table 1 Location information of *P. cyrtonema* samples collected

样品编号	采集地区	样品个数	海拔/m	东经 E	北纬 N
ZJ-AJ 1~7	浙江湖州安吉	7	272	119°40'	30°24'
ZJ-TS 1~7	浙江温州泰顺	7	687	119°41'	27°42'
ZJ-JN 1~6	浙江丽水景宁	6	200	119°41'	28°02'
ZJ-QY 1~7	浙江丽水庆元	7	416	118°59'	27°35'
ZJ-LQ 1~6	浙江丽水龙泉	6	1 214	119°11'	27°54'
ZJ-FH 1~6	浙江宁波奉化	6	344	121°20'	29°36'
ZJ-SZ 1~6	浙江绍兴嵊州	6	261	121°41'	29°24'
ZJ-SX 1~4	浙江绍兴	4	145	121°33'	29°51'
AH-HS 1~6	安徽黄山	6	453	118°08'	30°13'
ZJ-LA 1~6	浙江杭州临安区	6	188	119°05'	30°15'
JX-XS 1~5	江西九江修水	5	400	114°46'	29°05'
FJ-TN 1~6	福建三明泰宁	6	1 000	117°11'	26°59'
HN-GZ 1~4	湖南古丈	4	841	109°59'	28°40'
HB-CY 1~6	湖北宜昌长阳	6	207	110°10'	30°35'
AH-JZ 1~7	安徽六安金寨	7	744	115°51'	31°10'
JX-PX 1~5	江西萍乡	5	400	113°51'	27°38'
JX-LHS 1~6	江西鹰潭龙虎山	6	300	116°59'	28°07'
ZJ-YJ 1~7	浙江温州永嘉	7	760	120°46'	28°30'
ZJ-PA 1~5	浙江金华磐安	5	457	120°28'	28°54'
ZJ-JD 1~7	浙江杭州建德	6	110	119°17'	29°29'

2 方法

2.1 DNA 提取

将保存于-20 °C 的多花黄精叶片,在液氮中研磨至细粉末状,利用改良的 CTAB 法提取 DNA^[14],用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。将 DNA 稀释至 10 ng/μL,置于-20 °C 冰箱保存备用。

2.2 PCR 扩增及引物筛选

参照加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的 100 条 ISSR 引物序列,从中筛选出 16 个扩增条带多、

稳定性好、多态性强、背景清晰的引物,引物序列见表 2,用于正式扩增。

以 1×TAE 为缓冲液,取 5 μL PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶于 120 V 电压下电泳 30 min,再用凝胶成像分析系统对其观测、拍照。

2.3 数据统计与分析

按照相同迁移位上有条带记为“1”,反之记为“0”,模糊不清或无法准确标记的条带忽略不计数的方法构建 0/1 矩阵。利用 POPGENE 32.0 软件对

表 2 16 条 ISSR 引物序列与最佳退火温度

Table 2 Sixteen ISSR primer sequences and their optimum annealing temperatures

引物	序列	退火温度/℃	引物	序列	退火温度/℃
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	57.0	UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	60.9
UBC818	CACACACACACACACAG	57.0	UBC843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	55.8
UBC822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	55.2	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	55.8
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	52.1	UBC854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG	54.7
UBC825	ACACACACACACACACT	56.5	UBC855	ACACACACACACACACYT	59.0
UBC826	ACACACACACACACACC	53.2	UBC856	ACACACACACACACACYA	56.5
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	58.0	UBC857	ACACACACACACACACYG	59.8
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52.5	UBC861	ACCACCACCACCACCACC	58.5

全部群体和各单个群体分别进行遗传参数分析, 观测点等位基因数 (N_a)、多态位点比率 (PPL)、Shannon 信息指数 (I)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H_e)、多态性位点数 (K)、Nei's 基因分化指数 (G_{st})、基因流 (N_m) 等遗传参数分析。基于遗传相似系数, 利用 NTSYS PC2.10e 软件对多花黄精 20 个种源地 118 个样品进行不加权成对算术平均法 (UPGMA) 聚类分析。

3 结果与分析

3.1 ISSR 扩增结果及多态性分析

利用筛选的 16 条 ISSR 引物对 20 个种源的 118 份多花黄精样品进行 PCR 扩增, 部分扩增结果见图 1。共检测到 130 个位点, 其中多态性位点共 123 个, 多态性比率为 94.62%; 16 条 ISSR 引物扩增出 5~13

条数目不等的条带, 平均每条引物扩增 8.13 条带; 引物 UBC855 扩增的条带数最多为 13 条; UBC818 扩增的条带数最少, 只有 5 条; 16 条引物扩增平均多态性条带为 7.69 条, 多态性比率在 71.42%~100.00%, 有 10 条引物的多态性比率达到 100%, 引物 UBC861 多态性比率最低为 71.42%, 扩增情况见表 3。

3.2 遗传多样性分析

将筛选出来的 16 条引物所得的扩增结果进行“0/1”赋值, 转换成二元矩阵, 使用 Popgene32 进行统计分析, 所得结果列于表 4。

从表 4 可见, 多花黄精种源间的 ISSR 遗传多样性差异较大, 各种源的多态位点比率 (PPL) 在 33.85%~60.00%, 平均为 48.54%, PPL 由高到低的顺序为 JX-LHS=ZJ-JN>AH-JZ=ZJ-QY>

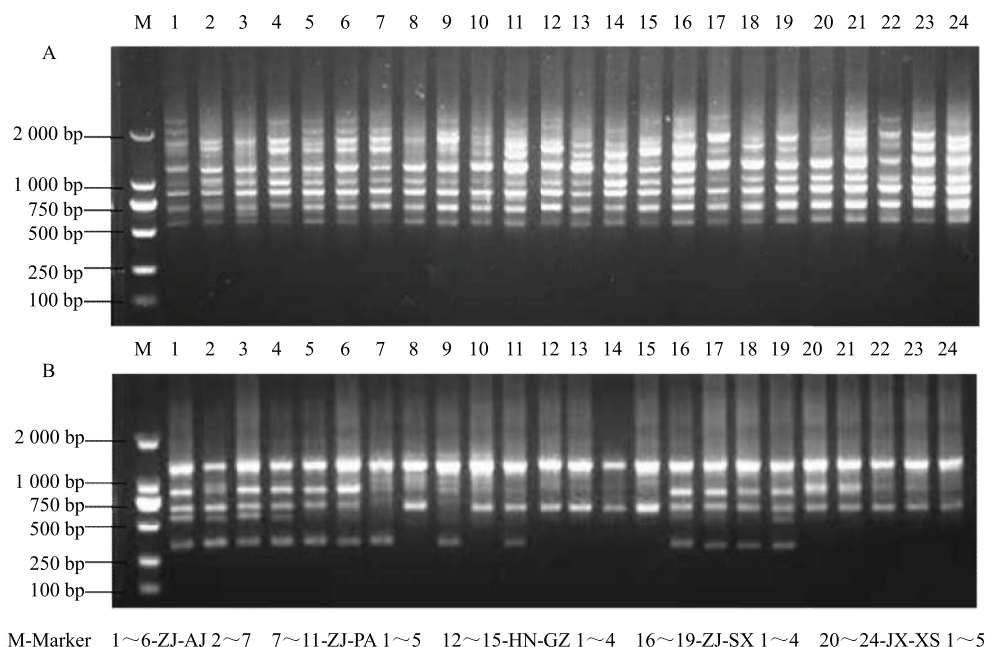


图 1 引物 UBC861 (A)、引物 UBC826 (B) 对 24 个多花黄精样品的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 1 ISSR-PCR amplification results of 24 *P. cyrtoneura* samples by primer UBC861 (A) and primer UBC826 (B)

表 3 ISSR 引物在多花黄精样品中扩增情况

Table 3 ISSR-PCR amplified results of 16 selected primers in *P. cyrtanema* samples

引物	总条带数	多态性条带数	PPL/%	引物	总条带数	多态性条带数	PPL/%
UBC811	9	9	100.00	UBC841	12	12	100.00
UBC818	5	5	100.00	UBC843	7	6	85.71
UBC822	7	6	85.71	UBC853	7	6	85.71
UBC824	8	8	100.00	UBC854	8	8	100.00
UBC825	8	8	100.00	UBC855	13	13	100.00
UBC826	7	6	85.71	UBC856	10	10	100.00
UBC835	7	7	100.00	UBC857	8	7	87.50
UBC840	7	7	100.00	UBC861	7	5	71.42

表 4 多花黄精不同种源地的遗传多样性指标

Table 4 Genetic diversity index of different provenances of *P. cyrtanema*

种源地	N_a	N_c	H_c	I	K	PPL/%
AH-HS	1.561 5	1.361 2	0.207 1	0.307 2	72	55.38
AH-JZ	1.584 6	1.375 2	0.216 0	0.320 1	75	57.69
JX-XS	1.476 9	1.317 8	0.180 8	0.266 8	62	47.69
JX-PX	1.523 1	1.345 1	0.195 8	0.289 4	66	50.77
JX-LHS	1.600 0	1.380 3	0.218 6	0.324 8	78	60.00
FJ-TN	1.515 4	1.328 9	0.188 6	0.279 9	65	50.00
HN-GZ	1.438 5	1.298 2	0.168 9	0.248 6	56	43.08
HB-CY	1.453 8	1.292 7	0.169 0	0.250 7	59	45.38
ZJ-AJ	1.461 5	1.258 9	0.155 8	0.235 9	60	46.15
ZJ-TS	1.507 7	1.312 4	0.180 7	0.269 2	66	50.77
ZJ-YJ	1.423 1	1.253 8	0.147 7	0.221 1	54	41.54
ZJ-JN	1.600 0	1.383 4	0.218 5	0.324 0	78	60.00
ZJ-QY	1.584 6	1.379 9	0.218 0	0.322 3	75	57.69
ZJ-LQ	1.538 5	1.345 5	0.198 5	0.294 5	70	53.85
ZJ-FH	1.353 8	1.257 1	0.142 1	0.206 6	46	35.38
ZJ-SX	1.453 8	1.282 9	0.162 8	0.242 6	57	43.85
ZJ-SZ	1.338 5	1.250 7	0.137 2	0.199 2	44	33.85
ZJ-LA	1.538 5	1.338 4	0.193 2	0.287 4	70	53.85
ZJ-JD	1.423 1	1.265 6	0.154 2	0.229 6	55	42.31
ZJ-PA	1.415 4	1.268 6	0.154 0	0.228 2	54	41.54
种源地水平	1.489 6	1.314 8	0.183 8	0.267 4	63	48.54
物种水平	1.946 2	1.666 5	0.377 6	0.551 9	123	94.62

AH-HS > ZJ-LA > ZJ-LQ > ZJ-TS = JX-PX > FJ-TN > JX-XS > ZJ-AJ > HB-CY > ZJ-SX > HN-GZ > ZJ-JD > ZJ-PA > ZJ-YJ > ZJ-FH > ZJ-SZ。其中江西鹰潭龙虎山 (JX-LHS) 与浙江丽水景宁 (ZJ-JN) 种源内的多态位点比率最高为 60.00%，其次是安徽六安金寨 (AH-JZ) 与浙江丽水庆元 (ZJ-QY) 种

源内多态性比率为 57.69%，浙江绍兴嵊州 (ZJ-SZ) 的 PPL 最低为 33.85%，20 个种源的平均 PPL 为 48.54%，小于物种多态性位点比率 94.62%。20 个种源的 N_a 在 1.338 5~1.600 0，平均值为 1.489 6； N_c 在 1.250 7~1.380 3，平均值为 1.314 8； H_c 在 0.137 2~0.218 6，平均值为 0.183 8； I 在 0.199 2~

0.324 8, 平均值为 0.267 4。

多花黄精总的基因多样性 (H_t) 为 0.378 8, 各种源内的基因多样性 (H_s) 为 0.178 3, 群体间的基因多样性 (D_{st} , $D_{st}=H_t-H_s$) 为 0.200 5, G_{st} 为 0.529 3, 这表明多花黄精种源内和种源间均有一定的遗传分化。6 个省的多花黄精种源 N_m 为 0.222 3, 说明了不同种源间的基因流动程度较低, 遗传背景较单纯。

3.3 群体的遗传距离及聚类分析

采用 NTsys-pc 2.10 软件对 20 个多花黄精种群的遗传关系按 UPGMA 建立聚类分析树状图 (图 2), 从图可知, 同一种源的多花黄精基本上聚在一起, 说明种源间的遗传分化大于种源内不同个体间的基因遗传分化, 遗传相似系数值为 0.61 时, 118 份种质分为 4 类。聚类具有明显的地域特征, 与山脉密切相关 (图 3), 山脉之间的平原、水域隔离可能是导致群体

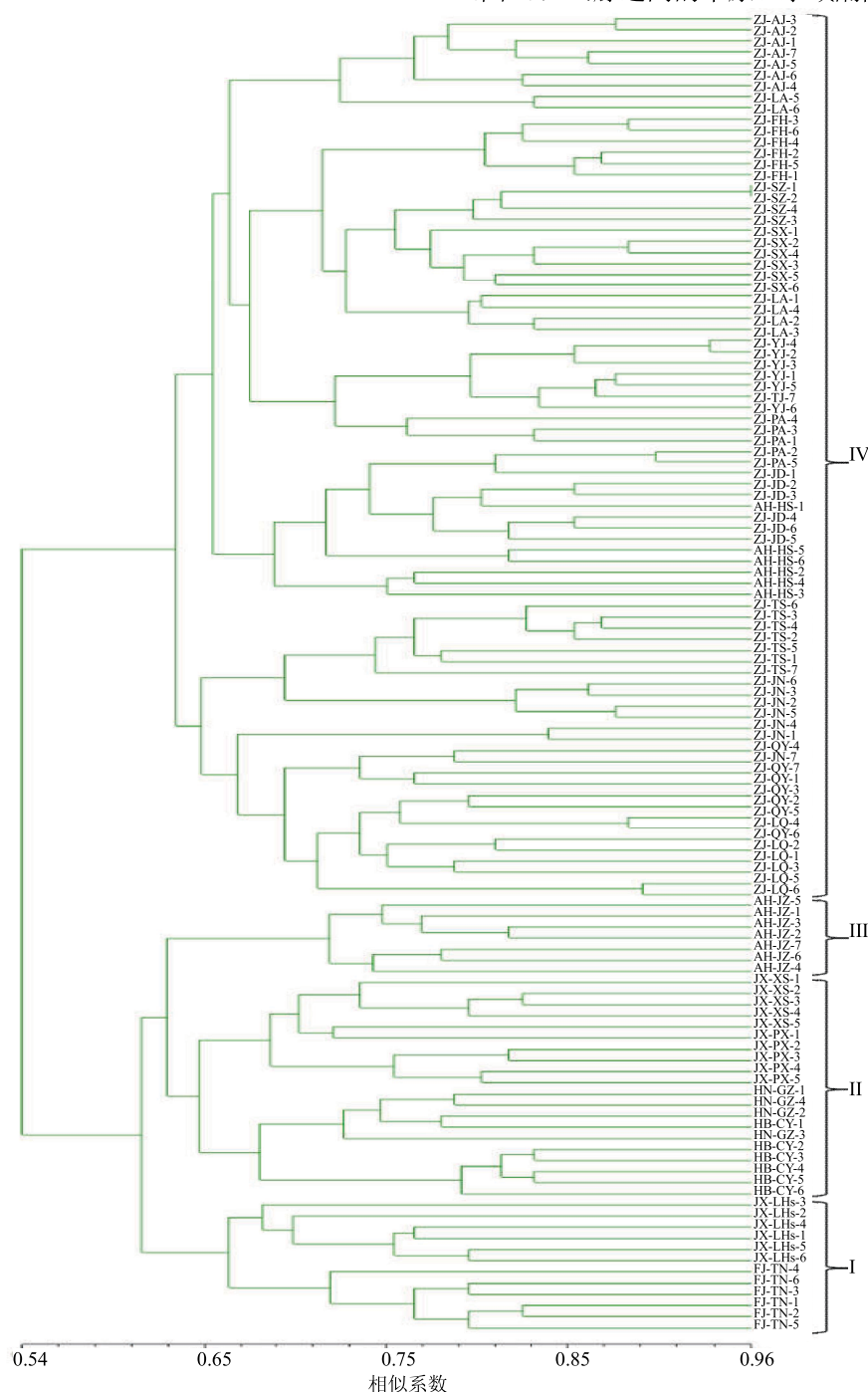


图 2 多花黄精种质资源的 ISSR 聚类

Fig. 2 Dendrogram of 118 germplasm resources of *P. cyrtoneura* based on ISSR data

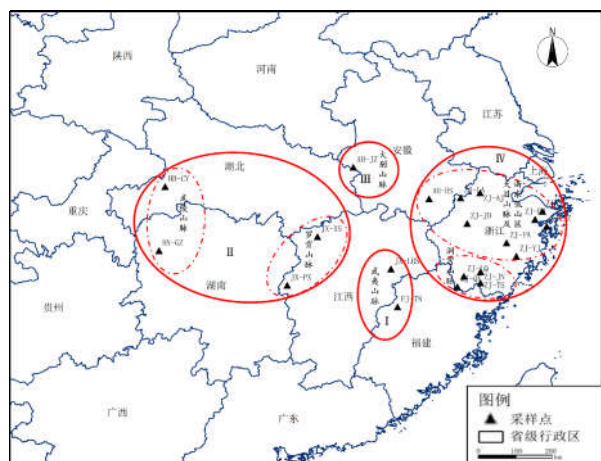


图 3 多花黄精 20 个种群采样分布图

Fig. 3 Sampling distribution of 20 *P. cyrtoneura* populations

间遗传分化的主要原因之一。

第 I 类为武夷山脉的种质，包括武夷山脉西段的江西九江龙虎山种源，武夷山脉中段西南麓的福建泰宁县种源。第 II 为武陵山脉与罗霄山脉的种质，遗传相似系数值为 0.65 时可分为 2 组，第 1 组为来自武陵山脉古丈和长阳的 10 个种质；第 2 组为来自罗霄山脉江西萍乡和修水的 10 个种质。第 III 类为大别山脉安徽六安金寨的种质，位于多花黄精分布区北缘。第 IV 类洞宫山脉和天目山脉及浙东低山区的种质。在遗传相似系数值 0.63 时分为 2 组，第 1 组包括天目山脉及浙东低山区的安吉、奉化、嵊州、绍兴、临安、永嘉、磐安、建德和安徽黄山的 53 个种质。第 2 组为洞宫山脉的包括泰顺、庆元、景宁和龙泉的 27 个种质。

4 讨论

通过对浙江、安徽、江西、湖北、湖南、福建 6 个省多花黄精主产区 20 个种源 118 份种质进行 ISSR 分析，16 条引物共扩增出 130 条清晰条带，其中多态性条带 123 条，PPL 为 94.62%，种源内的 PPL 为 33.85%~60.00%，平均 48.54%。自然分布范围广的物种通常趋向于具有更高的遗传多样性，反之则具有相对较低的遗传多样性^[15]，多花黄精分布区域较广，各地气候、土壤、环境类型多样，也就形成了其丰富的遗传多样性；对黄精属植物分类及系统学研究结果表明，各类群间性状交叉，地理分布区重叠，新的变异型不断发现，预示该属植物仍处于较活跃的分化阶段^[16]，这可能也是多花黄精遗传多样性丰富的原因之一。多花黄精种源间的 D_{st} 为 0.200 5， G_{st} 为 0.529 3， N_m 为 0.222 3，表明多花黄精种源间具有较大程度的遗传分化，不同种

源间的基因流动程度较低。由于多花黄精主要分布于 500~2 100 m 的生林、灌丛或山坡阴处^[17]，种源间存在不适生境阻隔，限制了基因交流，从而使得种源间遗传分化程度越来越高，地理隔离造成的较低的基因流动可能是多花黄精遗传分化产生的重要原因。

对 20 个多花黄精种群的遗传关系按 UPGMA 建立聚类分析树状图（图 2）表明，同一种源的种质基本上都聚在一起，地理位置相近的种源样品也能相邻而聚，种源间的遗传分化大于种源内不同个体间的基因遗传分化。从聚类图中可以看出在遗传相似系数值等于 0.61 时可将 118 份种质聚为以下 4 类：第 I 类为武夷山脉的 2 个种源 12 个种质，第 II 为武陵山脉和罗霄山脉的 4 个种源 20 份种质，第 III 类为大别山安徽六安金寨种源 7 份种质，第 IV 类洞宫山脉和天目山脉及浙东低山区的 13 个种源 80 份种质，多花黄精的遗传变异与山脉密切相关。由于多花黄精主要分布于山地，种源间存在平原与水域的隔离，使得空间距离较远，影响花粉和种子的传播，减弱基因的交流；不同山脉各自的气候特征、地形、土壤和水热等生态环境均有差异，从而形成不同的生境，在环境压力的作用下，居群之间也就形成了稳定的遗传变异，推测山脉之间的平原、水域隔离可能是导致群体间遗传分化的主要原因之一。

参考文献

- [1] 刘京晶, 斯金平. 黄精本草考证与启迪 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 37-42.
- [2] 姜程曦, 张铁军, 陈常青, 等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 1-16.
- [3] 苏文田, 刘跃钧, 蒋燕锋, 等. 黄精产业发展现状与可持续发展的建议 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(13): 2381-2386.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-178.
- [6] 朱岩芳, 祝水金, 李永平, 等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用 [J]. 种子, 2010, 29(2): 55-59.
- [7] 周 晔, 王润玲, 唐 钺, 等. ISSR 法鉴定中药黄精与卷叶黄精 [J]. 天津医科大学学报, 2006, 12(2): 178-180.

- [8] 潘清平, 周日宝, 陈玉秀, 等. 玉竹不同品种的 ISSR 分子鉴定 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(10): 28-30.
- [9] 李巧玲, 罗敏, 秦民坚, 等. 黄精属 8 种药用植物遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中药材, 2017, 40(9): 2042-2045.
- [10] 张红梅. 安徽省黄精种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [11] 朱巧, 邓欣, 张树冰, 等. 黄精属 6 种植物的 SSR 遗传差异分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2935-2943.
- [12] 陈友吾, 廖荣俊, 叶碧欢, 等. 多花黄精转录组 SSR 位点分析及分子标记开发 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 182-189.
- [13] 苏文田, 谢建秋, 潘心禾, 等. 多花黄精多糖与浸出物的时空变异规律 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 270-273.
- [14] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法 [J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16.
- [15] Hamrick J L, Godt M J W, Brown A H D, *et al.* Allozyme diversity in plant species [J]. *Plant Pop Gen Breed Gen Res*, 1989, 12: 43-63.
- [16] 吴世安, 吕海亮, 杨继, 等. 叶绿体 DNA 片段的 RFLP 分析在黄精族系统学研究中的应用 [J]. 植物分类学报, 2000, 38(2): 97-110.
- [17] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第十五卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.