

• 药材与资源 •

基于 ISSR 的地黄栽培品种与野生群体遗传多样性研究

李翠翠, 胡赛文, 夏 至*

河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002

摘要:目的 基于 ISSR 分子标记研究地黄 *Rehmannia glutinosa* 栽培品种与野生群体遗传多样性, 比较它们的遗传多样性差异, 构建它们之间亲缘关系, 为地黄种质资源保护及新品种选育提供参考。方法 应用 ISSR 分子标记技术对地黄栽培品种, 野生群体及其近缘种 106 个样品进行分析, 利用 POPGEN 软件分析 Nei's 基因多样性指数 (H) 等遗传信息参数, 应用 NTSYS 软件构建亲缘关系 UPGMA 聚类图。结果 7 条引物在所有取样群体中, 共检测到 85 个位点, 其中多态性位点 83 个, 多态位点百分率 (PPB) 为 97.65%。地黄栽培品种与野生群体及其近缘种的种群间 H 值为 0.265 9, Shannon's 多样性信息指数 (I) 为 0.412 5。地黄栽培品种的多态性位点 26 个, PPB 为 30.59%。河南省地黄野生群体多态性位点 71 个, PPB 为 83.53%。ISSR 聚类分析结果显示地黄栽培品种, 野生群体及其近缘种共分成 7 个组。结论 ISSR 分子标记揭示地黄野生群体比栽培品种具有更高的遗传多样性, 河南分布的野生地黄群体的遗传多样性高于其他地区, 与其作为栽培地黄的道地产区, 具有一定的相关性。地黄野生群体间亲缘关系与其地理分布格局并无明显相关性。

关键词: 地黄; 栽培; 野生群体; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)23-6054-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.019

Genetic diversity analysis on cultivar and wild population of *Rehmannia glutinosa* based on ISSR markers

LI Cui-cui, HU Sai-wen, XIA Zhi

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

Abstract: **Objective** To study the genetic diversity and genetic relationship of cultivar and wild population of *Rehmannia glutinosa* and its relative species by ISSR molecular marker technique, and provide the reference for *R. glutinosa* germplasm protection and breeding. **Methods** 106 samples including cultivar and wild population of *R. glutinosa* and its relative species were studied by ISSR-PCR markers. Nei's genetic diversity index (H) and other parameters of genetic information were calculated by POPGEN 32, and a cluster dendrogram of different samples was established based on the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) by NTSYS-pc software. **Results** Seven ISSR primers generated 85 loci of which 83 loci were polymorphic. The percentage of polymorphic bands (PPB) of all samples was 97.65%. Nei's genetic diversity index (H) and Shannon's information index (I) were 0.2659 and 0.4125. The percentage of polymorphic bands (PPB) of cultivar of *R. glutinosa* was 30.59%. The percentage of polymorphic bands (PPB) of wild population of *R. glutinosa* in Henan province was 83.53%. In the cluster dendrogram, all samples were clustered into seven groups at the level of Genetic similarity coefficient (GS) 0.67. **Conclusion** The results of ISSR analysis revealed that the level of genetic diversity between wild populations of *R. glutinosa* was higher than that within cultivar populations of *R. glutinosa*. The genetic diversity among wild populations of *R. glutinosa* in Henan province was higher than other region, which was consistent with authentic producing areas of *R. glutinosa* in this area. The relationships of wild population of *R. glutinosa* had no obvious correlation with their geographical distribution pattern.

Key words: *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch; wild populations; ISSR; genetic diversity

收稿日期: 2020-03-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31770370); 河南省高等学校重点科研项目计划 (18A360006)

作者简介: 李翠翠 (1995—), 女, 河南周口人, 硕士研究生, 研究方向为中药资源的分子鉴定。

*通信作者 夏 至, 副教授, 主要从事中药资源的分子鉴定及功能基因组学研究。E-mail: xiazhiemail@126.com

地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch 为玄参科 Scrophulariaceae 地黄属 *Rehmannia* L. 多年生草本植物, 该植物在我国广为分布, 栽培历史悠久^[1-2]。栽培地黄主产于河南、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”, 是我国著名的“四大怀药”之一^[3-4]。先前有关地黄的研究主要集中在化学成分^[5]、药理^[6]及栽培地黄的连作障碍^[7]等方面。近年来, 基于 DNA 条形码^[8-10]、RAPD^[11-15]、简单重复序列区间扩增 (ISSR)^[14-18]、相关序列扩增多态性 (SRAP)^[19-20]和目标起始密码子多态性 (SCoT)^[21-22]等分子标记技术, 对地黄种内遗传多样性和亲缘关系进行大量研究。然而, 上述研究取样局限于“怀地黄”不同的栽培品种间, 或地黄部分区域野生群体不同个体间的遗传多样性研究, 缺乏对地黄栽培品种与野生群体的比较群体遗传学研究, 且对地黄野生群体取样缺乏代表性, 特别是栽培地黄传统的道地区域^[23-24], 如文献典籍记载陕西的长安^[25], 河北冀县 (今河北衡水), 山东临沂县和陕西大荔县^[26]等上述区域的野生群体的取样。确定哪些地理分布的野生自然居群参与栽培品种的形成, 是药用植物驯化育种研究首先要解决的问题, 对有效利用野生种的种质资源具有重要的理论和应用价值^[27]。对比栽培药用植物传统的道地产区与目前道地产区的种质资源遗传多样性差异, 有助于揭示栽培药用植物与其道地产区的相关性。简单重复序列间扩增 (inter simple sequence repeat, ISSR) 技术是 Zietkeiwitz 等^[28]于 1994 年发展起来的一种 DNA 分子标记, 用于检测简单重复序列间 DNA 序列差异^[29]。该技术比 SSR^[30]、RAPD^[31]多态性丰富, 具有简单快捷、易操作、成本低、重复性好、稳定性好、安全性高^[32]等优势, 已经成功地应用于麻花艽 *Gentiana straminea* Maxim.^[29]、牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.^[33]、对叶百部 *Stemona tuberosa* Lour.^[34]、三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg^[35]、连翘 *Forsythia suspensa* Vahl.^[36]等药用植物^[37-38]种质资源鉴定、亲缘关系和遗传多样性分析等多方面的研究中。因此, 探讨栽培地黄品种与野生地黄居群间遗传多样性和亲缘关系, 对比栽培地黄与野生地黄遗传多样性的差异, 为揭示栽培地黄与其道地产区的相关性奠定基础。本研究对地黄栽培品种, 野生群体及其近缘种进行广泛取样, 选取来自河南焦作

和山西临汾地区 13 个有代表性的地黄栽培品种及 89 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 106 个样本。对上述种类开展 ISSR 分子标记研究, 旨在为药用植物地黄资源的收集、鉴定、保护和栽培育种等方面提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

实验材料的收集包括地黄属 5 个种共 106 个样品, 其中地黄栽培品种 13 个 (分别来自河南的温县、武陟、孟州及山西的襄汾县、万荣县、永济县), 地黄野生群体 89 个, 分别来自河南、河北、山东、山西、陕西和北京, 基本覆盖了野生地黄的主要地理分布区域及栽培地黄历史记载的道地产区。另取 4 个地黄属内近缘物种湖北地黄 *R. henryi* N. E. Brown、裂叶地黄 *R. piasezkii* Maxim、茄叶地黄 *R. solanifolia* Tsoong et China、天目地黄 *R. chingii* Li 各 1 个代表居群, 用于联合聚类分析。地黄属各物种由河南农业大学农学院中药材系高致明教授和夏至副教授鉴定。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 °C 冰箱, 实验材料详细信息 (表 1)。

1.2 仪器与试剂

采用北京天根生化植物 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech 有限公司, 中国) 提取样品 DNA, PCR 扩增应用 PTC0200PCR 仪 (BIO-RAD 公司), 样品 DNA 和 PCR 扩增产物采用 DYYIII 型电泳仪 (北京六一仪器厂), 凝胶紫外成像系统 (BIORAD 公司) 检测, ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 设计的 31 个引物系列筛选出 7 个能扩增出清晰且具多态性条带的引物, 引物序列由上海生工公司 (Sangon 公司) 合成, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

2 方法

2.1 DNA 的提取

取硅胶干燥的叶片约 10 mg, 研磨 1 min 后, 利用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。用浓度为 1% 琼脂糖凝胶电泳筛选出 DNA 主带清晰, 无弥散带, 无明显的 RNA 带, 且经 DNA 质量检测仪 Nandrop 2000 微量分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 值均在 1.8~2.0 DNA 的样品进行实验。

2.2 PCR 扩增及产物检测

PCR 反应体系: 基因组 DNA 1.0 μ L (约 40 ng), 1.0 μ L 引物 (10 μ mol/L), 12.5 μ L (2 $\times$ Taq PCR

表 1 植物样品来源

Table 1 Plant samples used in this study

编号	种名	采集地	编号	种名	采集地
1	地黄	河南林州	54	地黄	陕西咸阳秦都区
2	地黄	河南南阳市	55	地黄	陕西榆林子洲县
3	地黄	河南安阳汤阴县	56	地黄	陕西商洛
4	地黄	河南新密	57	地黄	陕西大荔县
5	地黄	河南洛阳灵山寺	58	地黄	陕西渭南市
6	地黄	河南洛阳孟津县	59	地黄	河北承德
7	地黄	河南禹州	60	地黄	河北高碑店
8	地黄	河南项城	61	地黄	河北易县
9	地黄	河南栾川县	62	地黄	河北定兴县
10	地黄	河南新郑	63	地黄	河北保定
11	地黄	河南滑县	64	地黄	河北顺平县
12	地黄	河南温县	65	地黄	河北高阳县
13	地黄	河南许昌	66	地黄	河北河间
14	地黄	河南灵宝	67	地黄	河北沧州运河区
15	地黄	河南鹤壁	68	地黄	河北青县
16	地黄	河南孟州	69	地黄	河北武邑县
17	地黄	河南博爱县	70	地黄	河北衡水冀州区
18	地黄	河南新乡市	71	地黄	河北石家庄鹿泉区
19	地黄	河南获嘉县	72	地黄	河北正定县
20	地黄	河南辉县	73	地黄	河北邢台桥西区
21	地黄	河南郑州	75	地黄	河北邯郸市邯山区
22	地黄	河南开封市	76	地黄	河北涉县
23	地黄	河南延津县	77	地黄	山西太原小店区
24	地黄	河南兰考县	78	地黄	山西忻州忻府区
25	地黄	河南商丘市	79	地黄	山西原平市
26	地黄	河南濮阳市	80	地黄	山西孟县
27	地黄	河南范县	81	地黄	山西阳泉城区
28	地黄	北京圆明园	82	地黄	山西晋中平遥县
29	地黄	北京香山	83	地黄	山西霍州
30	地黄	北京北中医药大学良乡校区	84	地黄	山西临汾尧都区
31	地黄	北京工商大学	85	地黄	山西襄汾滨河公园
32	地黄	山东单县	86	地黄	山西新绛县
33	地黄	山东济南市市中区	87	地黄	山西运城盐湖区
34	地黄	山东济南市天桥区	88	地黄	山西万荣南里庄村
35	地黄	山东德州平原县	89	地黄	山西永济滨河公园
36	地黄	山东德州德城区	90	地黄(栽培)	河南孟州大仇村
37	地黄	山东乐陵	91	地黄(栽培)	河南武陟蔡庄
38	地黄	山东滨州沾化区	92	地黄(栽培)	河南温县徐堡中街村
39	地黄	山东淄博张店区	93	地黄(栽培)	河南温县徐堡中街村
40	地黄	山东泰安泰山区	94	地黄(栽培)	河南武陟县魁张镇村
41	地黄	山东临沂蒙阴县野店村	95	地黄(栽培)	河南温县汜水滩
42	地黄	山东菏泽市曹县郑庄	96	地黄(栽培)	河南武陟县魁张镇村
43	地黄	山东菏泽天香公园	97	地黄(栽培)	河南温县白庄村
44	地黄	山东临沂费县颜真卿公园	98	地黄(栽培)	河南武陟古樊村
45	地黄	山东临沂兰陵县邓王山前	99	地黄(栽培)	河南武陟古樊村
46	地黄	山东临沂平邑人民医院旁	100	地黄(栽培)	山西襄汾荀董村
47	地黄	山东济宁任城区	101	地黄(栽培)	山西万荣荣河镇
48	地黄	山东济宁嘉祥县纸坊镇	102	地黄(栽培)	山西永济常青村
49	地黄	山东德州德城区	103	茄叶地黄	重庆城口
50	地黄	陕西杨凌	104	天目地黄	浙江临安
51	地黄	陕西眉县	105	裂叶地黄	湖北宜昌
52	地黄	陕西宝鸡	106	湖北地黄	湖北宜昌
53	地黄	陕西凤翔县			

Master Mix), 加灭菌双蒸水至 25 μ L, 总反应体系为 25 μ L。PCR 扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50~54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 完全延伸 5 min; 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, GoldView 染色, 凝胶成像系统成像, 用 DL2000 Marker 作相对分子质量标记, 观察记录结果, 分析扩增谱带。PCR 扩增引物 (表 2) 及每条引物扩增的退火温度见表 3。

2.3 数据的统计分析

每一条引物均重复扩增、电泳 3 次, 选取稳定

清晰的条带进行统计分析。采用人工读带和 Gel-pro32 软件读带相结合的方法, 根据分子标记的迁移率及其有无统计所有的二元数据, “有”赋值为“1”(包括强带和重复性好的弱带), “无”赋值为“0”, 从而得到原始数据矩阵, 计算多态性条带比率。利用软件 POPGEN (Version 1.32) 对数据进行遗传多样性统计, 分析各种群多态位点百分率 (PPB)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 多态性信息指数 (I)、Nei's 遗传距离 (D), 并应用 NTSYS (Version 2.10e) 软件采用基于遗传相似性系数 (G_S) 的 UPGMA 法构建系统树状图。

表 2 ISSR 备选引物及其序列
Table 2 The primer name and sequence

引物名称	引物序列(5'→3')	引物名称	引物序列(5'→3')
802	ATATATATATATATATG	834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
804	TATATATATATATATAA	835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	837	TATATATATATATATART
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	844	CTCTCTCTCTCTCTRC
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	846	CACACACACACACART
816	CACACACACACACACAT	849	GTGTGTGTGTGTGTGYA
818	CACACACACACACACAG	855	ACACACACACACACACYT
822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT
824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	864	ATGATGATGATGATGATG
825	ACACACACACACACACT	868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
826	ACACACACACACACACC	874	CCCTCCCTCCCTCCCT
829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	876	GATAGATAGACAGACA
832	ATATATATATATATATYC		

加粗的引物为本研究筛选后的引物

Bold primer name and sequence are used in this study

表 3 ISSR 引物及扩增的退火温度

Table 3 ISSR primers and the annealing temperature of PCR reaction

引物	序列(5'→3')	退火温度/ $^{\circ}$ C
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	54
822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	54
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	54
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	50
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52
855	ACACACACACACACACYT	52
876	GATAGATAGACAGACA	50

Y 为简并碱基 (C 或 T)

Y is a degenerate base (C or T)

3 结果与分析

3.1 扩增结果

用选取的 7 个 ISSR 引物对 106 份材料进行扩增, 结果显示每个样品均能扩增出清晰、数量较多的条带。共扩增出 85 条带, 每条引物平均能扩增出 12.1 条带。其中引物 UBC840 对所有 106 样品的扩增结果如图 1 所示。

3.2 遗传多样性分析

3.2.1 地黄栽培品种和地黄野生群体及其近缘种的遗传多样性分析 选取 7 条 ISSR 引物对地黄栽培品种, 不同地区野生地黄群体及其近缘种 106 个个体进行了 PCR 扩增, 统计结果见表 4。通过 POPGEN (Version 1.32) 软件处理分析结果显示地

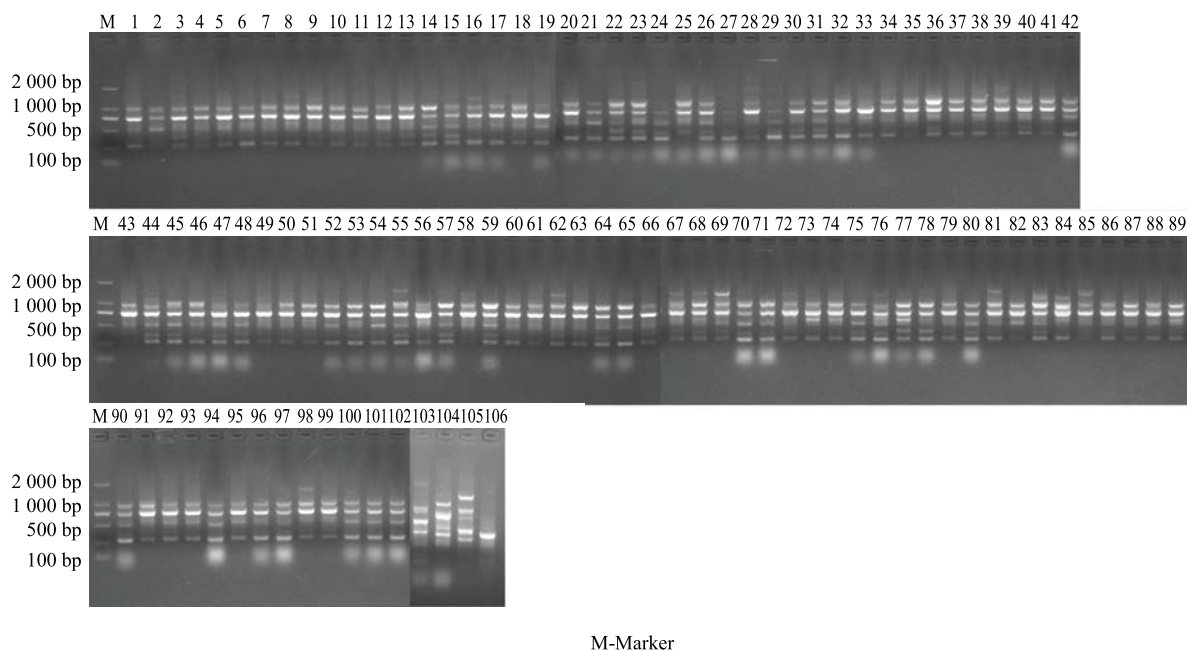


图 1 引物 UBC840 对 106 个样品的 ISSR 扩增

Fig. 1 The amplification results on 106 samples by primer UBC 840

表 4 地黄栽培品种, 不同地区地黄野生群体种群的遗传信息参数

Table 4 Parameters of genetic information on varieties and wild population of *Rehmannia glutinosa*

产地	总位点	多态性位点	PPB/%	N_a	N_e	H	I
河南	85	71	83.53	$1.835\ 3 \pm 0.373\ 1$	$1.390\ 4 \pm 0.354\ 4$	$0.235\ 4 \pm 0.182\ 6$	$0.363\ 4 \pm 0.249\ 1$
北京	85	38	44.71	$1.447\ 1 \pm 0.500\ 1$	$1.308\ 5 \pm 0.392\ 1$	$0.174\ 7 \pm 0.208\ 4$	$0.256\ 6 \pm 0.298\ 3$
山东	85	65	76.47	$1.764\ 7 \pm 0.426\ 7$	$1.406\ 5 \pm 0.367\ 3$	$0.240\ 7 \pm 0.189\ 7$	$0.365\ 8 \pm 0.262\ 8$
陕西	85	51	60.00	$1.600\ 0 \pm 0.492\ 8$	$1.295\ 3 \pm 0.356\ 1$	$0.177\ 3 \pm 0.189\ 0$	$0.273\ 2 \pm 0.268\ 6$
河北	85	67	78.82	$1.788\ 2 \pm 0.411\ 0$	$1.435\ 8 \pm 0.373\ 2$	$0.255\ 8 \pm 0.188\ 8$	$0.386\ 8 \pm 0.259\ 8$
山西	85	65	76.47	$1.764\ 7 \pm 0.426\ 7$	$1.404\ 9 \pm 0.351\ 5$	$0.243\ 3 \pm 0.184\ 5$	$0.370\ 6 \pm 0.257\ 8$
栽培	85	26	30.59	$1.305\ 9 \pm 0.463\ 5$	$1.161\ 0 \pm 0.303\ 9$	$0.095\ 9 \pm 0.167\ 3$	$0.146\ 1 \pm 0.243\ 7$
总数据	85	83	97.65	$1.976\ 5 \pm 0.152\ 5$	$1.436\ 9 \pm 0.336\ 8$	$0.265\ 9 \pm 0.167\ 0$	$0.412\ 5 \pm 0.217\ 4$

黄栽培品种, 不同地区野生地黄群体及其近缘种群间共检测到 85 个位点, 其中多态性位点为 83 个, 多态性位点百分率(PPB)平均为 97.65%, Shannon's 多态性信息指数 (I) 平均值为 0.412 5, Nei's 基因遗传多样性指数 (H) 平均值为 0.265 9, 等位基因数 (N_a) 平均值为 1.976 5, 平均每个位点的有效等位基因数 (N_e) 平均值为 1.436 9, 表明地黄栽培品种, 不同地区野生地黄群体及其近缘种的基因组水平多态性较高, 基因库较为丰富。

3.2.2 地黄栽培品种群体的遗传多样性分析 通过 POPGEN (Version 1.32) 软件处理分析, 结果 (表 4) 显示地黄栽培品种检测到 85 个位点, 其中多态性位点仅为 26 个, PPB 平均为 30.59%, I 平均值为 0.146 1, H 平均值为 0.095 9, N_a 平均值为 1.305 9, N_e 平均值为 1.161 0, 表明地黄栽培品种遗传多样性指数均低于野生群体。

3.2.3 不同地区地黄野生群体的遗传多样性分析 通过 POPGEN (Version 1.32) 软件处理分析, 结果 (表 4) 显示河南地区野生地黄群体种群间共检测到 85 个位点, 其中多态性位点为 71 个, PPB 平均为 83.53%, I 平均值为 0.363 4, H 平均值为 0.235 4, N_a 平均值为 1.835 3, N_e 平均值为 1.390 4。河北地区野生地黄群体种群间共检测到 85 个位点, 其中多态性位点为 67 个, PPB 平均为 78.82%, I 平均值为 0.386 8, H 平均值为 0.255 8, N_a 平均值为 1.788 2, N_e 平均值为 1.435 8。山东地区野生地黄群体种群间共检测到 85 个位点, 其中多态性位点为 65 个, PPB 平均为 76.47%, I 平均值为 0.365 8, H 平均值为 0.240 7, N_a 平均值为 1.764 7, N_e 平均值为 1.406 5。陕西地区野生地黄群体种群间共检测到 85 个位点, 其中多态性位点为 51 个, PPB 平均为 60.00%, I 平均值为 0.273 2, H 平均值为 0.177 3, N_a 平均值为

为 1.600, N_e 平均值为 1.295 3。山西地区野生地黄群体种群间共检测到 85 个位点, 其中多态性位点为 65 个, PPB 平均为 76.47%, I 平均值为 0.370 6, H 平均值为 0.243 3, N_a 平均值为 1.764 7, N_e 平均值为 1.404 9。北京地区野生地黄群体种群间共检测到 85 个位点, 其中多态性位点为 38 个, PPB 平均为 44.71%, I 平均值为 0.256 6, H 平均值为 0.174 7, N_a 平均值为 1.447 1, N_e 平均值为 1.308 5。

3.2.4 地黄栽培品种, 地黄野生群体的 ISSR 聚类分析 地黄栽培品种及地黄野生群体种群聚类分析结果如图 2 所示。结果表明所有取样个体以相似系数 0.62 为标准, 分为 3 个主要分支。其中第 1 分支 (分支 A) 包括地黄属其他 3 个物种, 湖北地黄, 裂叶地黄和天目地黄。第 2 分支 (分支 B) 以陕西省分布的地黄野生群体为主 (4 个陕西省的野生地黄群体), 还包括河南省的 3 个地黄野生群体, 山西省的 2 个地黄野生群体, 河北省的 2 个和山东省的 1 个地黄野生群体。第 3 分支 (分支 C) 内包括 5 个亚分支 (分支 I~V)。

其中, 在第 3 大分支内, 以相似性系数 0.67 为标准分为分支 I、分支 II、分支 III、分支 IV 和分支 V。分支 I 仅包括河南省和山西省取样的地黄栽培品种, 13 个地黄栽培品种聚在一支。河南省分布的其中一个地黄野生群体 (第 26 样品), 位于分支 I 和分支 II 之间。分支 II 以陕西省和山东省地黄野生群体为主, 包括 2 个陕西省地黄野生群体和 2 个山东省地黄野生群体为主, 及 1 个北京市地黄野生群体。分支 III 仅包括山西省的 2 个地黄野生群体和 1 个山东省地黄野生群体。分支 IV 仅包括山西省的 5 个地黄野生群体和河北省 4 个地黄野生群体。分支 V 内, 茄叶地黄和地黄一起聚在该分支内, 该分支以河南省分布的地黄野生群体为主 (23 个河南省地黄野生群体), 包括山东省 13 个地黄野生群体, 河北省的 12 个地黄野生群体, 4 个山西省的地黄野生群体, 3 个北京市的地黄野生群体及 3 个陕西省的地黄野生群体。聚类分析结果表明, 地黄栽培品种及地黄野生群体间聚类结果与其地理分布区域没有相关性。

4 讨论

地黄栽培品种众多, 野生群体分布范围广, 本研究基于在全国大范围取样后对地黄栽培品种, 地黄野生群体及其近缘种 ISSR 数据的遗传多样性分析, 结果显示地黄属内物种 DNA 多态性好, 条带清晰,

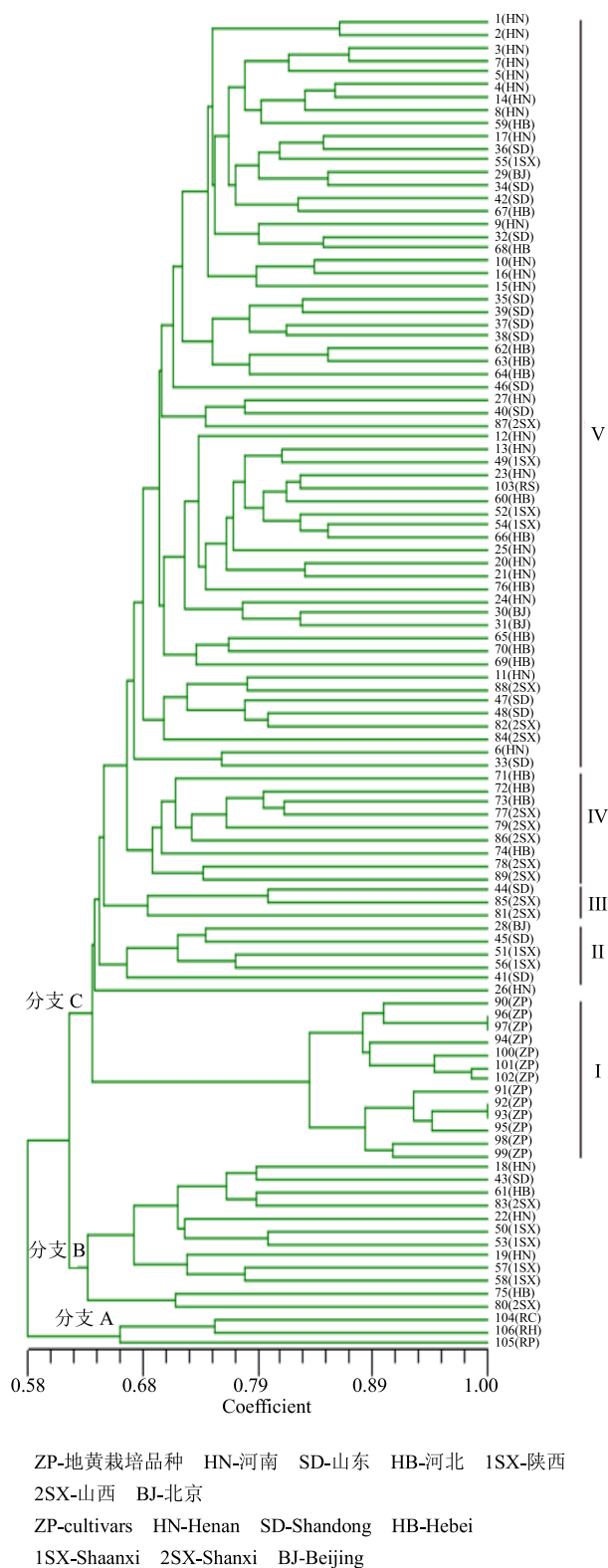


图 2 地黄的 UPGMA 聚类树

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *Rehmannia glutinosa*

共扩增出 85 条带, 多态性条带 83 条, PPB 为 97.65%。但地黄栽培品种 PPB (30.59%) 和 H (0.095 9) 明显低于地黄野生群体。本研究结果支持赵楠等^[16-17]、

周延清等^[15,18]、陈京荔等^[11]、吴志刚等^[12]和王艳等^[14]等结果,表明地黄栽培品种的遗传基础狭窄,基因组水平的遗传多样性低下,品种间遗传分化不明显,地黄野生居群比栽培品种具有更高的遗传多样性,支持夏至等^[8-9]研究结果,地黄栽培品种主要来源于野生居群的人工驯化。基于 ISSR 分析不同区域地黄野生群体的遗传多样性结果表明,河南分布的野生地黄群体的遗传多样性最高(其中多态性位点为 71 个,PPB 平均为 83.53%)。这表明河南较高的地黄野生群体的遗传多样性有助于当地栽培地黄品种种质资源筛选和新品种的选育,这与目前把河南焦作作为栽培地黄的道地产区,具有一定的相关性。

ISSR 聚类分析结果(图 2)表明,地黄属的茄叶地黄和地黄聚在一支,裂叶地黄,湖北地黄和天目地黄聚在一支,与地黄和茄叶地黄区分开来。本研究支持夏至等^[39-41]研究结果,认为茄叶地黄和地黄亲缘关系最近,二者形态特征相似,可能为同一种。石海霞等^[19]研究结果表明,地黄野生群体间亲缘关系与地理分布紧密相关,同一区域野生地黄亲缘关系较近。但在本研究 ISSR 聚类树图上(图 2),来源于不同省份的野生地黄群体零散的聚在不同分支上,这表明地黄野生群体间亲缘关系与其地理分布格局并无明显相关性。植物的生活史特征,特别是繁育方式对物种群体间基因交流有着重要影响,地黄具有较强的自交不亲和性,有性生殖主要依靠异花授粉,为虫媒传粉远交,种子易于散布的植物^[16-17]。因此,不同地区的地黄野生群体间存在广泛的基因流,导致其不同地区的地黄野生群体亲缘关系复杂多样。河南和山西 2 个区域的地黄栽培品种取样分析表明,这 2 个地区地黄栽培品种聚在一支(图 2,分支 I),没有与本区域分布的地黄野生群体聚在一起,这表明栽培地黄品种间并没有出现令人信服的遗传分化^[16]。其主要原因可能有 2 个方面,一方面是地黄通过其地下茎营养繁殖延续,有利于维持居群奠基者效应,基因交流通常发生在同一克隆内,造成栽培品种内遗传多样性降低;另一方面,地黄作为常用的中药材,引种栽培历史悠久,目前,山西当地种植户仍习惯从河南焦作购买“怀地黄”品种的种栽,进行繁殖,导致这两个区域的地黄栽培品种间遗传多样性较低,亲缘关系较近,这与笔者的调查结果基本一致。因此,今后在地黄栽培品种选育上,应加大对本地区的地黄野生群体

的利用,筛选优质和抗性高的地黄种质资源,提高当地栽培地黄品种的抗性和质量。

关于地黄栽培品种的起源,文献古籍考证方面研究表明,今陕西的长安,河北衡水(古称冀州),山东临沂县,陕西的大荔县和河南焦作都曾是栽培地黄的道地产区^[23-26],因此确定栽培地黄品种最初的祖先来源于上述哪一地区的地黄野生群体,就显得尤为重要。但 ISSR 聚类分析表明,地黄栽培品种构成的分支 I,并没有与特定区域的地黄野生群体单独聚在一支,这可能与 ISSR 分析提供的信息位点较少有关,进一步分析叶绿体基因组和地黄块根组织转录组数据,在地黄属内开展分子系统发育基因组学研究,方能全面探讨地黄栽培品种的起源。本研究对地黄的野生群体,栽培品种及其近缘种开展广泛深入的取样,基于 ISSR 分析栽培地黄和地黄野生群体间的遗传多样性差异,探讨了河南作为地黄的道地产区与其具有较高的地黄野生群体遗传多样性的相关性。这将为地黄属的药用植物的资源保护、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] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 丁自勉. 地黄 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 夏至, 黄勇, 李贺敏, 等. 基于核基因 ITS 及叶绿体 psbA-trnH 和 trnS-trnG 基因探讨怀地黄栽培起源 [J]. 中草药, 2018, 47(4): 648-654.
- [10] 李建芳, 黄静, 程芳婷, 等. 地黄属核基因与叶绿体基因 DNA 条形码比较研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 165-171.
- [11] 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.
- [12] 吴志刚, 王 敏, 黄璐琦, 等. 地黄不同品种遗传关系的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1865-1869.
- [13] Qi JJ, Li X E, Song J Y, *et al.* Genetic relationships among *Rehmannia glutinosa* cultivars and varieties [J]. *Planta Med*, 2008, 74: 1846-1852.
- [14] 王 艳, 李先恩, 李学东, 等. 野生地黄种内遗传多样性的 RAPD, ISSR 分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2591-2595.
- [15] 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.
- [16] 赵 楠, 李宏庆. 地黄居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 河南科学, 2009, 11: 1386-1391.
- [17] 赵 楠. 地黄的遗传多样性研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [18] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 怀区地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 257-261.
- [19] 石海霞, 肖承鸿, 周 涛, 等. 地黄不同种质的遗传多样性和质量分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4210-4216.
- [20] 谷风平. 怀地黄遗传多样性及品种鉴定的 SRAP 研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2009.
- [21] 石海霞, 肖承鸿, 周 涛, 等. 地黄种质资源的 SCoT 分子标记遗传多样性分析 [J]. 中药材, 2018, 41(7): 1577-1580.
- [22] 杨 珂, 周延清, 段红英, 等. 地黄 SCoT 分子标记体系的建立和指纹图谱的构建 [J]. 广西植物, 2019, 39(5): 608-614.
- [23] 赵燠黄. 国产地黄类生药学的研究 [J]. 药学报, 1953, 1: 41.
- [24] 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.
- [25] 曹元宇. 本草经 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [26] 刘文泰 (明). 本草品精要 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [27] 王云生, 黄宏文, 王 璞. 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: 221-229.
- [28] Zietkiewica E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplified [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [29] 王 笠, 赵志礼, 倪梁红, 等. 基于 ISSR 标记的麻花苘遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3168-3174.
- [30] Liu T, Zhu S, Fu L, *et al.* Development and characterization of 1827 expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers for ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60346.
- [31] 任爱农, 秦民坚. 基于 RAPD 分子标记技术的中药材鉴定研究进展 [J]. 中南药学, 2008, 3(6): 338-341.
- [32] 杨春芳, 曾 阳, 郭凤霞, 等. 分子标记技术在樟牙菜属植物研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3238-3244.
- [33] 张旻桓, 金晓玲, 成仿云, 等. 湖南产牡丹遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1193-1198.
- [34] 王晓彤, 罗 点, 陈 高, 等. 对叶百部遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4051-4056.
- [35] 尹明华, 谢妮妮, 徐文慧, 等. 三叶青种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4884-4891.
- [36] 李 璐, 董诚明, 朱昀昊, 等. 基于 ISSR 的连翘遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3673-3680.
- [37] 时圣明, 潘明佳, 王 洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [38] 詹忠根. 地黄分子鉴定及功能基因研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5611-5620.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.