

基于 ISSR 和 SRAP 分子标记的黄精种质遗传多样性研究

姜 武¹, 李亚萍², 陈家栋¹, 陶正明^{1,2*}

1. 浙江省亚热带作物研究所, 浙江 温州 325005

2. 浙江农林大学 省特色中药资源保护与创新利用重点实验室, 浙江 临安 311300

摘 要: 目的 研究黄精 *Polygonati Rhizoma* 居群遗传多样性, 为黄精药材资源保护和新品种培育提供依据。方法 以 4 个居群 22 个种源 47 份黄精种质资源为材料, 选用 14 条 ISSR 和 11 对 SRAP 分子标记进行多态性检测、遗传多样性比较和聚类分析, 揭示黄精种质的遗传多样性及地理分布特征。结果 ISSR 引物和 SRAP 引物分别扩增出 186 和 142 条清晰带数, 其中多态性条带数分别为 185 和 140, 多态性比率 (percentage of polymorphic bands, PPB) 分别为 99.46% 和 98.59%; 遗传多样性分析显示, ISSR 和 SRAP 标记下基因分化系数 (G_{st}) 分别为 0.279 9 和 0.231 6, 即黄精遗传变异主要发生在种群内, 居群间基因流 (N_m) 分别为 1.286 4 和 1.659 3, 遗传相似系数在 0.053 3~0.948 1 和 0.032 8~0.967 7。聚类结果显示, 相同黄精药材基原种质聚在一起, ISSR 和 SRAP 标记分别将黄精居群分为 5 和 3 大类群, 且以 ISSR 标记的聚类结果更符合实际地域分布。结论 黄精种质遗传多样性丰富, ISSR 和 SRAP 标记可适用于黄精亲缘性鉴定, 研究结果可为黄精资源的保护和育种提供一定参考。

关键词: 黄精; 分子标记; 遗传多样性; 种质资源; ISSR; SRAP

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6865-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.025

Genetic diversity analysis of *Polygonati Rhizoma* based on ISSR and SRAP molecular markers

JIANG Wu¹, LI Ya-ping², CHEN Jia-dong¹, TAO Zheng-ming^{1,2}

1. Zhejiang Institute of the Subtropical Crops, Wenzhou 325005, China

2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Resources Protection and Innovation of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China

Abstract: Objective To analysis the genetic diversity of Huangjing (*Polygonati Rhizoma*), and to provide the evidences for resource protection and new variety breeding of *Polygonati Rhizoma*. **Methods** Taking 47 germplasm resources from 22 provenances of four community as materials, 14 ISSR and 11 SRAP markers were used for polymorphism detection, genetic diversity comparison and cluster analysis, to reveal the genetic diversity and geographical distribution characteristics of germplasm. **Results** A total of 186 and 142 clear bands were amplified by ISSR and SRAP primers, and the number of polymorphic bands was 185 and 140, respectively; The percentage of polymorphic bands (PPB) was 99.46% and 98.59%, respectively. The genetic diversity analysis showed that the coefficient of gene differentiation (G_{st}) of ISSR and SRAP markers were 0.279 9 and 0.231 6, respectively, indicating that the genetic variation was mainly within the population, and the interpopulation gene flow (N_m) value was 1.286 4 and 1.659 3, respectively. The genetic similarity coefficients ranged from 0.053 3 to 0.948 1 and 0.032 8 to 0.967 7. The clustering results showed that the populations were divided into five and three groups by ISSR and SRAP markers, respectively, and the clustering results of ISSR markers were more consistent with the actual regional distribution. **Conclusion** The germplasm of *Polygonati Rhizoma* is rich in genetic diversity, ISSR and SRAP markers can be used to identify the phylogeny of *Polygonati Rhizoma*. The results can provide some reference for the conservation and breeding of *Polygonati Rhizoma*.

Key words: *Polygonati Rhizoma*; molecular labeling; genetic diversity; germplasm resources; ISSR; SRAP

收稿日期: 2022-03-06

基金项目: 浙江省中药资源保护与创新利用重点实验室项目 (2021E10013); 温州市农业新品种选育协作组项目 (2019ZX003-1)

作者简介: 姜 武 (1987—), 男, 助理研究员, 研究方向为中药材新品种选育及开发。E-mail: jiangwu8888@163.com

*通信作者: 陶正明 (1970—), 男, 研究员, 研究方向为药用植物资源评价利用。Tel: (0577)88526876 E-mail: zmtao2002@aliyun.com.cn

黄精为百合科黄精属多年生草本植物,我国对黄精的食用和药用历史已逾 2000 年^[1]。黄精历来被视为益寿延年的珍品,又名“仙人余粮”^[2]。传统中医学认为黄精具有补中益气、润心肺、强筋骨等功能。现代药理学研究证明,黄精具有增强免疫功能、调血脂、降血糖、延缓衰老等多种药理作用^[3]。据《中国药典》年 2020 版收载,药材黄精为黄精 *Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute、滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl 或多花黄精 *P. cyrtonema* Hua 的干燥根状茎^[4]。黄精主产于河北、内蒙古、陕西等省;滇黄精主产于贵州、广西、云南等省;多花黄精主产于贵州、湖南、云南、安徽、江西、福建、浙江等省^[5-6]。黄精药材的需求量及栽培规模逐年递增,已是林药种植产业重要发展品种。因此,黄精不仅具有极高的保健价值,而且经济效益和生态效益显著^[7]。

当前,研究人员对不同基原黄精药材的种子休眠机制、有效成分合成途径、药理功效等方面已有较多研究^[8-13],而对黄精药材品种选育研究相对缺乏。优良品种选育研究的滞后,不仅易导致黄精栽培种质混乱,部分基地存在使用非药典规定物种混杂栽培,且以消耗大量的药材资源为代价存在种性退化问题,不利于黄精产业的健康可持续发展。黄精种质资源是其优良品种选育的基础材料,育种成效不仅取决于种质资源圃的数量,还取决于对各种种质资源多样性的遗传规律掌握。分子标记能够直接在 DNA 水平检测个体间差异,具特异性强、准确度高及微量、快速等优点^[14],已广泛应用于中药材相关育种工作中,是资源遗传多样性研究的重要手段^[15-16]。本研究基于分子标记技术阐明黄精药材遗传多样性和地理分布特征,有助于深入开展黄精药材的新品种选育研究。

近年来,已有较多科研人员将各种分子标记技术应用在黄精属植物亲缘关系和遗传多样性研究领域,吴世安等^[17]运用限制性片段长度多态性技术(restriction fragment length polymorphism, RFLP)对黄精属 13 个物种进行系统发育分析;王世强等^[18]采用简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)对鉴定 32 个野生黄精种质亲缘关系;陈友吾等^[19]基于转录组数据开发鉴定多花黄精优良品种 SSR 标记;刘跃均等^[20]利用目标起始密码子多态性分子标记(start codon targeted polymorphism, SCoT)对 19 份不同种源黄精材料

进行遗传多样性分析;刘新等^[21]采用简单重复序列(inter simple sequence repeat, ISSR)对 20 个种源多花黄精进行了遗传多样性和遗传变异规律研究。然而,尚未见相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)在黄精属资源分析中的应用,对同时使用多个分子标记进行黄精种质遗传多样性分析比较也未见报道。本研究基于 ISSR 和 SRAP 分子标记技术,对采自 10 省 22 个种源 47 份黄精种质的遗传多样性进行比较和综合分析,后续可有针对性选择具有优良性状亲本并进行基因型鉴别,对进一步利用分子标记缩短育种年限有现实意义。研究结果将为黄精药材的植物资源鉴定、科学保护和新品种开发选育提供一定参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

2016 年 4 月至 2019 年 10 月,收集浙江、福建、江西、安徽、云南、贵州、湖南、四川、陕西、河北省的 3 种黄精药材基原植物带芽根茎,浙江省亚热带作物研究所经陶正明研究员鉴定为黄精为黄精 *Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute、滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl 或多花黄精 *P. cyrtonema* Hua, 具体信息见表 1。样品根据采集地来源分 4 个居群:华东(HD)29 个;华中(HZ)4 个;西南(XN)11 个;北方(BF)3 个。

1.2 仪器

ETC821 型东胜龙 PCR 仪(苏州东胜兴业科学仪器有限公司);Gel Doc XR 型凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司);NanoDrop One 型微量核酸蛋白浓度测定仪(美国 Thermo Scientific 公司);JY300 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);JY-SPCT 型水平电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);Milli-Q Academic A10 型超纯水系统(美国 Millipore 公司);H3-18KR 型台式高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司)。

1.3 试剂

PlantDNAzol 植物基因组 DNA 提取试剂(杭州莱枫生物科技有限公司);引物由有康生物科技有限公司合成;DL2000 DNA marker (Takara Bio 公司);2×PCR Solution Premix PrimerSTAR HS 高保真聚合酶(R010A, Takara Bio 公司);琼脂糖(111806, 西班牙 Biowest Agrose);Gelred 核酸染料(41003, 美国 Biotium);乙醇(AR)、异丙醇(AR)、三氯甲烷(AR)等购自上海贤鼎生物科技有限公司。

表 1 黄精种质采集信息

Table 1 Collected informations of *Polygonati Rhizoma* germplasm

编号	采样点	样品数	基原	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m	居群
ZJTS1	浙江泰顺	1	多花黄精	119.79°	27.70°	229	华东
ZJCA2~3	浙江淳安	2	多花黄精	118.95°	29.50°	169	华东
ZJYJ4	浙江永嘉	1	多花黄精	120.79°	28.44°	919	华东
ZJJD5	浙江建德	1	多花黄精	119.15°	29.43°	300	华东
ZJOH6	浙江瓯海	1	多花黄精	120.64°	28.00°	10	华东
ZJYQ7	浙江乐清	1	多花黄精	121.06°	28.39°	123	华东
ZJQY8~14	浙江庆元	7	多花黄精	119.24°	27.59°	943	华东
ZJSY15	浙江松阳	1	黄精	119.15°	28.23°	606	华东
ZJSY16~17	浙江松阳	2	多花黄精	119.15°	28.24°	145	华东
ZJLQ18~20	浙江龙泉	3	多花黄精	119.08°	28.30°	671	华东
ZJJN21~22	浙江景宁	2	多花黄精	119.69°	27.89°	1190	华东
HBBD23~24	河北保定	2	黄精	115.36°	39.16°	103	北方
FJZH25~26	福建政和	2	多花黄精	118.53°	27.21°	519	华东
FJFZ27	福建福州	1	多花黄精	119.40°	26.06°	789	华东
SXLT28	陕西临潼	1	多花黄精	109.19°	34.36°	454	北方
HNAH29~32	湖南安化	4	多花黄精	111.43°	28.35°	149	华中
SCBZ33~34	四川巴中	2	多花黄精	106.45°	31.25°	441	西南
GZTR35~36	贵州同仁	2	多花黄精	108.49°	27.74°	1394	西南
YNDG37~40	云南大关	4	多花黄精	103.53°	27.64°	2611	西南
AHQM41~42	安徽祁门	2	多花黄精	117.57°	29.68°	487	华东
JXWY43~44	江西婺源	2	多花黄精	117.51°	29.19°	183	华东
YNPE45~47	云南普洱	3	滇黄精	101.30°	24.00°	1280	西南

2 方法

2.1 样品的处理

每个种质 10 份单株以上, 采挖间隔 5 m 以上, 带采集地土移栽统一于泰顺县司前镇溪口村浙江省亚热带作物研究所黄精种质资源圃。结合花型、根茎、叶片等形态学指标, 采集生长良好的黄精幼嫩叶片于变色硅胶密封袋中干燥保存, 用于后续 DNA 提取, 一个样品为同一采样地的 5 丛不同植株叶片共同研磨提取所得。

2.2 基因组 DNA 提取

黄精药材基因组 DNA 采用 plant DNAzol 试剂进行提取。取 100~500 mg 叶片加液氮破碎后进行 DNA 沉淀、DNA 清洗、DNA 溶解去杂, 每份黄精样品逐一提取 DNA, 稀释至 20 ng/ μ L 后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测质量后置于 -20 °C 保存备用。

2.3 引物筛选及 PCR 扩增

在加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布 100 条 ISSR 随机引物中的 50 条引物中和近年来已发表论文中较常用的 88 对 SRAP 引物中, 分别筛选得到扩增条带多、背景清晰、多态性强、稳定性好的 14 条 ISSR 引物和 11 对 SRAP 引物, 引物序列见表 2。

ISSR 和 SRAP-PCR 反应体系设定: 12.5 μ L 的 takara 公司 2 $\times$ 预混型 Taq 酶, 1 μ L 浓度为 10 mmol/L 的引物, 模板 DNA 含量 40~60 ng, 补水至 25 μ L。引物最佳退火温度设 52 °C。PCR 扩增程序为: 94 °C、5 min; 94 °C、30 s, 52 °C、30 s, 72 °C、2 min, 共计 35 个循环。72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。取反应产物 5 μ L, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 5 $\times$ TBE 缓冲液, 150 V 跑胶 40 min, 紫外凝胶成像系统观测、保存。

2.4 数据统计与分析

选取清晰可辨的电泳条带, 在相同迁移位点有条带的记“1”, 缺失记“0”, 分别统计 ISSR、SRAP 和二者混合数据(ISSR+SRAP)的 0/1 矩阵。采用 PopGen 32.0 软件计算多态位点百分率 (PPB)、等位基因数 (number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、Nei's 基因多样性指数 (gene diversity, H)、Shannon's 多态性信息指数 (Shannon's information index, I)、Nei's 基因分化系数 (coefficient of gene differentiation, G_{st})、居群总基因多样性 (total gene diversity, H_t)、居群内基因多样性 (gene diversity with provenances, H_s)、基因流 (estimate of gene flow from G_{st} , N_m) 和 Mantel 检验地理距离和遗传

距离相关性, 采用 Ntsys 2.1 软件进行 UPGMA 聚类分析。

3 结果与分析

3.1 ISSR、SRAP 多态性分析

ISSR 多态性研究结果如表 2 所示, 共扩增出 186 条条带, 其中多态性条带 185 条, 14 条引物扩增出 9~20 条数目不等的条带, 平均每条引物扩增 13.29 条, 各引物检测到的 PPB 为 92.86%~100%,

平均为 99.46%。13 条引物多态性比例达 100%, 中 UBC835 扩增多态性比例最低, 为 92.86%。在 SRAP 多态性研究中 (表 2), 11 对引物扩增结果显示, 各引物检测到的 PPB 为 87.50%~100%, 共检测得到 142 条特异性条带, 其中多态性条带 140 个, 平均 PPB 为 98.59%, 且以 ME6+EM9 组合的多态性位点最少, 仅 6 个。

基于 14 条 ISSR 引物和 11 对 SRAP 引物建立

表 2 ISSR 引物和 SRAP 引物组合的扩增结果

Table 2 Amplification results of ISSR primers and combined SRAP primers

ISSR 引物	序列 (5'-3')	扩增条带数	多态性条带数	PPB/%
UBC807	(AG) ₈ T	19	19	100.00
UBC808	(AG) ₈ C	15	15	100.00
UBC812	(GA) ₈ A	20	20	100.00
UBC815	(CT) ₈ G	11	11	100.00
UBC817	(CA) ₈ A	10	10	100.00
UBC818	(CA) ₈ G	14	14	100.00
UBC822	(TC) ₈ A	13	13	100.00
UBC830	(TG) ₈ G	11	11	100.00
UBC835	(AG) ₈ YC	14	13	92.86
UBC840	(GA) ₈ YT	12	12	100.00
UBC844	(CT) ₈ RC	13	13	100.00
UBC856	(AC) ₈ YA	11	11	100.00
UBC868	(GAA) ₆	9	9	100.00
UBC873	(GACA) ₄	14	14	100.00
平均值		13.29	13.21	
总计		186	185	99.46
SRAP 引物	序列 (5'-3')	扩增条带数	多态性条带数	PPB/%
ME2+EM3	BAGC	16	16	100.00
ME2+EM6	BAGC	13	13	100.00
ME2+EM8	BAGC	10	10	100.00
ME2+EM9	BAGC	13	13	100.00
ME4+EM3	BACC	16	16	100.00
ME4+EM11	BACC	10	10	100.00
ME5+EM9	BAAG	16	14	87.50
ME6+EM4	BTAG	12	12	100.00
ME6+EM9	BTGT	6	6	100.00
ME8+EM4	BTGC	14	14	100.00
ME8+EM9	BTDC	16	16	100.00
平均值		12.91	12.73	
总计		142	140	98.59

R=(A, G); Y=(C, T); B=TGAGTCCAACCGG; D=GACTGCGTACGAATT

了相应的黄精药材 DNA 指纹图谱, 以 ISSR 中的引物 UBC840 和 SRAP 中引物 ME2+EM3 为例, 扩增条带清晰, DNA 片段相对分子质量大多为 100~2000 bp, 多态性信息丰富 (图 1)。

3.2 ISSR、SRAP 遗传多样性分析

基于分子标记的“0/1”赋值矩阵统计黄精居群遗传多样性, 结果如表 3、4 所示。在 ISSR 研究中, 总体物种水平的 N_a 为 1.994 6, N_e 为 1.343 1, H 为 0.224 2,

I 为 0.363 4。4 个居群的 N_a 变化幅度 1.397 8~1.908 6, 平均 1.592 7; N_e 变化幅度 1.246 6~1.310 1, 平均 1.280 8; H 变化幅度 0.145 5~0.200 2, 平均 0.172 7; I 变化幅度 0.217 9~0.326 6, 平均 0.267 4; PPB 变化幅度 39.78%~90.86%, 以华东居群多态位点比率最高, 22 个种源平均 PPB 为 59.27%, 小于物种多态性比率 99.46%。4 个居群之间的 H_t 为 0.239 8, H_s 为 0.172 7, G_{st} 为 0.279 9, 即居群间遗传变异

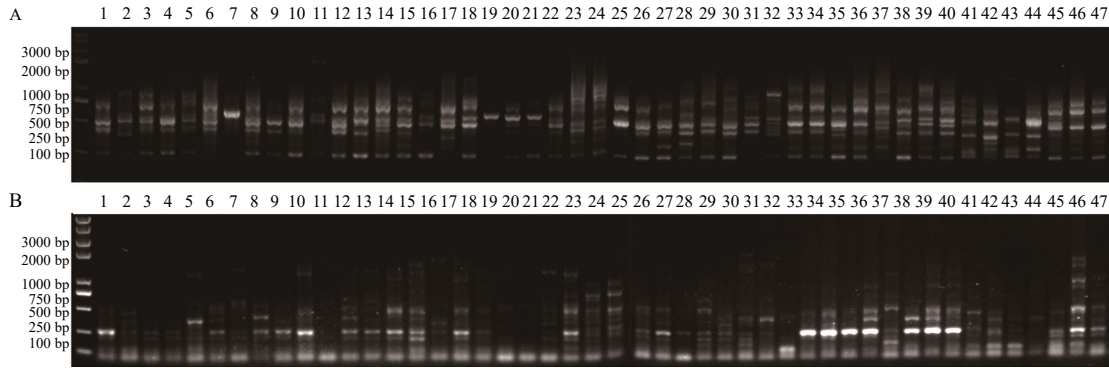


图 1 ISSR 引物 UBC840 (A) 和 SRAP 引物 ME2+EM3 (B) 对 47 份黄精 DNA 的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of total DNA based on ISSR Primer (A) and SRAP Primer (B) from 47 types of *Polygonati Rhizoma*

表 3 黄精居群遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *Polygonati Rhizoma*

居群	N_a	N_e	H	I	PPB/%
ISSR					
华东 (HD)	1.908 6±0.289 0	1.302 9±0.282 4	0.200 2±0.152 0	0.326 6±0.208 3	90.86
北方 (BF)	1.397 8±0.490 8	1.263 4±0.364 5	0.152 6±0.197 4	0.225 9±0.286 0	39.78
华中 (HZ)	1.403 2±0.491 9	1.246 6±0.348 2	0.145 5±0.190 8	0.217 9±0.277 3	40.32
西南 (XN)	1.661 3±0.474 5	1.310 1±0.329 2	0.192 4±0.179 8	0.299 0±0.257 6	66.13
居群水平	1.592 7	1.280 8	0.172 7	0.267 4	59.27
物种水平	1.994 6±0.073 3	1.343 1±0.287 4	0.224 2±0.148 9	0.363 4±0.195 0	99.46
SRAP					
华东 (HD)	1.887 3±0.317 3	1.266 2±0.287 3	0.176 4±0.152 8	0.292 4±0.209 8	88.73
北方 (BF)	1.408 5±0.493 3	1.289 5±0.387 9	0.163 5±0.206 5	0.239 3±0.296 4	40.85
华中 (HZ)	1.507 0±0.501 7	1.286 8±0.348 3	0.172 9±0.189 2	0.262 5±0.275 3	50.70
西南 (XN)	1.676 1±0.469 6	1.316 9±0.332 2	0.196 1±0.180 3	0.304 7±0.257 3	67.61
居群水平	1.619 7	1.289 9	0.177 2	0.274 7	61.97
物种水平	1.985 9±0.118 3	1.311 0±0.287 4	0.205 4±0.148 5	0.337 5±0.196 7	98.59
ISSR+SRAP					
华东 (HD)	1.899 4±0.301 3	1.287 0±0.284 7	0.189 9±0.152 6	0.311 8±0.209 3	89.94
北方 (BF)	1.402 4±0.491 1	1.274 7±0.374 5	0.157 4±0.201 1	0.231 7±0.290 2	40.24
华中 (HZ)	1.448 2±0.498 1	1.264 0±0.348 3	0.157 4±0.190 3	0.237 2±0.276 9	44.82
西南 (XN)	1.667 7±0.471 8	1.313 0±0.330 0	0.194 0±0.179 8	0.301 5±0.257 1	66.77
居群水平	1.604 4	1.284 7	0.174 7	0.270 6	
物种水平	1.990 9±0.095 3	1.329 2±0.287 4	0.216 1±0.148 8	0.352 2±0.195 8	99.09

表 4 黄精居群基因多样性

Table 4 Gene diversity of *Polygonati Rhizoma*

分子标记	H_t	H_s	G_{st}	N_m
ISSR	0.239 8	0.172 7	0.279 9	1.286 4
SRAP	0.230 6	0.177 2	0.231 6	1.659 3
ISSR+SRAP	0.235 8	0.174 6	0.259 4	1.427 3

占居群遗传变异的 27.99%，72.01%的遗传变异在种内进行；种群间的 N_m 为 1.286 4，表明黄精居群间存在一定的基因流动。

在 SRAP 研究中，4 个居群多态位点比率 PPB 变化幅度 40.85%~88.73%，平均 61.97%，小于物

种多态性位点比率 98.59%。与 ISSR 结果一致，PPB 由高到低顺序为华东>西南>华中>北方；总的基因多样性 H_t 为 0.230 6，种源内基因多样性 H_s 为 0.177 2，基因分化系数 G_{st} 为 0.231 6，即 76.84% 的遗传变异发生在种内。

为揭示更精细的黄精种质基因遗传多样性，本研究继续采用 ISSR+SRAP 的“0/1”矩阵数据相结合分析基因变异。结果显示，物种水平的 N_a 为 1.990 9， N_e 为 1.329 2， H 为 0.216 1， I 为 0.352 2，PPB 为 99.09%；各居群的 N_a 变化幅度 1.402 4~1.899 4，平均 1.604 4； N_e 变化幅度 1.264 0~1.313 0，平均 1.284 7； H 变化幅度 0.157 4~0.194 0，平均

0.174 7; I 变化幅度 0.231 7~0.311 8, 平均 0.270 6; 居群之间的 H_t 为 0.235 8, 高于种间遗传多样性 H_s 为 0.174 6, G_{st} 为 0.259 4, 即居群间遗传变异占居群遗传变异的 25.94%, 74.08% 的遗传变异在种内进行,

居群间的 N_m 为 1.427 3 ($N_m > 1$)。

3.3 遗传距离及聚类分析

Nei's 遗传相似系数及遗传距离和 UPGMA 聚类图结果分别如图 2 和表 5 所示。ISSR 数据中居

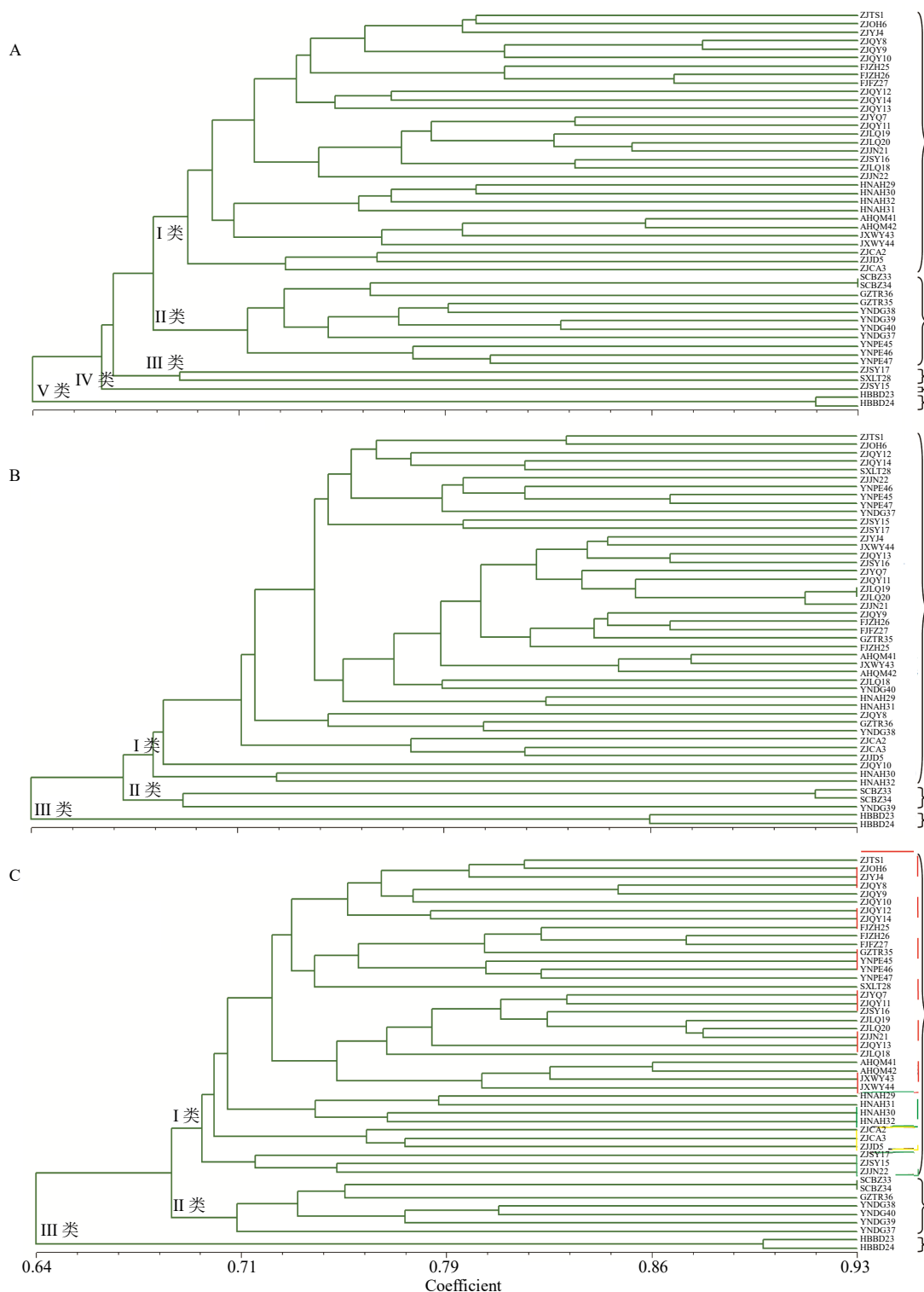


图 2 42 份栀子种质居群的 UPGMA 分析 (ISSR, A; SRAP, B; ISSR+SRAP, C)

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 42 types of *G. jasminoides* based on ISSR (A), SRAP (B), and combination of ISSR + SRAP (C)

表 5 基于 ISSR 和 SRAP 分子标记黄精 4 个居群的 Nei's 遗传相似系数 (右上角) 和遗传距离 (左下角)

Table 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of four *Polygonati Rhizoma* populations based on ISSR and SRAP molecular markers

居群	华东 (HD)	北方 (BF)	华中 (HZ)	西南 (XN)
ISSR				
华东 (HD)	****	0.870 8	0.948 1	0.946 4
北方 (BF)	0.138 3	****	0.823 3	0.855 8
华中 (HZ)	0.053 3	0.194 5	****	0.911 5
西南 (XN)	0.055 1	0.155 7	0.092 7	****
SRAP				
华东 (HD)	****	0.894 1	0.945 6	0.967 7
北方 (BF)	0.111 9	****	0.847 7	0.910 0
华中 (HZ)	0.055 9	0.165 2	****	0.917 5
西南 (XN)	0.032 8	0.094 4	0.086 1	****
ISSR+SRAP				
华东 (HD)	****	0.880 9	0.946 9	0.955 7
北方 (BF)	0.126 8	****	0.833 7	0.879 1
华中 (HZ)	0.054 6	0.181 9	****	0.914 0
西南 (XN)	0.045 3	0.128 8	0.089 9	****

群之间的遗传距离变化范围为 0.053 3~0.194 5, 遗传相似系数 0.823 3~0.948 1, 华东居群和西南居群相似系数最大, 表明这 2 个居群的亲缘关系较近, 遗传相似程度最高, 而北方居群和华中居群相似系数最小。利用 ISSR 矩阵数据得到的 UPGMA 聚类图 (图 2-A) 显示, 47 份种质被分成 5 类。分类结果有较显著的地域特征, 来自浙江、福建、安徽和江西的华东居群紧紧聚成一类, 来自云南、贵州、四川的西南居群聚成一类, 来自河北的北方居群单独成一类, 而来自浙江松阳居群 ZJSY15 单独为一类。

基于 SRAP 数据的遗传距离结果与 ISSR 数据类似, 遗传距离变化范围为 0.032 8~0.165 2, 遗传相似系数 0.847 7~0.967 7, 相似系数以华东居群和西南居群最高, 北方居群和华中居群遗传距离最大。UPGMA 聚类图 (图 2-B) 显示, 47 份种质被分成 3 类, 分类结果基本按黄精药材基原植物聚类。来自华东、华中、西南居群的多花黄精聚在一起, 且四川巴中 (SCBZ33~34) 和云南大关 (YNDG39) 的亲缘性更紧密, 北方居群河北保定 (HBBD23~24) 的黄精聚在一起。

基于 ISSR+SRAP 数据, 居群间的遗传相似系数和遗传距离结果与 ISSR 和 SRAP 的结果一致, 但 UPGMA 聚类图则有更精细科学的分类 (图 2-C)。47 份种质被分成 3 大类, 第 I 大类是以华东、华中居群的多花黄精种质为主, 云南普

洱 (YNPE45~47) 的滇黄精种质则紧密聚合在一起, 嵌在第 I 大类中; 第 II 类为西南居群 (SCBZ33~34、GZTR36、YNDG37~40) 多花黄精种质, 第 III 大类是北方居群河北保定 (HBBD23~24)。遗传相似系数值为 0.696 时, 第 I 大类的种质有较明显的地域特征, 可分为 4 小类。以皖、赣、浙的黄精种质为分析对象, 浙北地区淳安 (ZJCA2~3) 和建德 (ZJJD5) 聚在一起, 属于千里岗山脉种质; 分别来自皖南和赣北的安徽祁门 (AHQM41~42) 和江西婺源 (JXWY43~44) 居群聚在一起, 属于皖赣交界处的五龙山脉种质; 来自浙江松阳 (ZJSY17) 和景宁 (ZJJN22) 居群聚在一起, 属于洞宫山脉种质; 雁荡山脉的浙南 (温州乐清、永嘉、泰顺、瓯海, 丽水庆元、景宁、龙泉) 和武夷山脉种质的闽北 (福建政和) 多花黄精聚成一小类, 种质亲缘性近。

4 讨论

本研究对来自华东、华中、西南和北方 4 个居群 22 个种源 47 份黄精种质进行分子标记分析, 选用 14 条 ISSR 和 11 对 SRAP 分别扩增出 185 和 140 条多态性条带, PPB 分别达到 99.46% 和 98.59%, 表明黄精种群间有丰富的遗传多样性。从扩增的多态性位点上看, ISSR 标记更优于 SRAP 标记。华东居群的多花黄精种质遗传多样性变异水平最高, 北方居群变异性最低。一方面这可能与采样数

量有关, 另一方面是北方居群的黄精药材基原植物主要是黄精, 而华东居群的黄精居群, 以浙江为例, 基原植物以多花黄精为主外, 还有引种的滇黄精和未入药典黄精药材目录的长梗黄精, 且浙西南和皖、赣交界处山脉众多, 丰富的气候、土壤和环境形成了华东居群丰富的遗传多样性, 也预示该产区的黄精种质抗逆性和抗风险能力强。

遗传分化系数 G_{st} 可用于判断种群间的遗传分化程度, 且在 $G_{st} > 0.25$ 时, 居群间分化程度则较高。基于 ISSR+SRAP 数据, 4 个居群 $G_{st} = 0.2594$, 说明 25.94% 的遗传分化存在于居群内, 各居群之间有较高分化的分化。基因流 $N_m = 1.4273$, 表明基因流防止了遗传漂流引起的种群之间的遗传分化。一方面地理隔离, 另一方面可能和黄精的授粉方式相关, 黄精药材尤其是多花黄精, 属于自花授粉, 花丝比花柱稍长, 花冠较长使得花柱不伸出^[22]。因此, 自然迁移和自然杂交率程度都较低。

从聚类结果看, ISSR 标记的聚类结果更符合实际地域分布, SRAR 标记的聚类结果则将北方居群黄精与其他黄精药材区分开。基于两标记混合数据 (ISSR+SRAP) 的聚类结果不仅能较好的区分不同基原植物, 而且呈现一定地域性分布规律: 华东多花黄精居群和华中多花黄精居群聚成一类, 西南居群和北方黄精居群则分别聚成一类。聚类结果显示华东居群和华中居群亲缘性近, 这一研究结果和近年来 2 个产区大力发展林药种植有关。黄精产业是践行“两山”理念, 助力乡村振兴的重要载体, 华东产区和华中产区交流较为密切, 可能存在较多的种源引种交流。另一方面, 华东产区的黄精种质聚类结果显示存在较明显的地域分布特征, 主要被分成千里岗山脉系 (浙西北)、五龙山脉系 (皖南赣北)、洞宫山脉系 (浙西南)、雁荡山脉系 (浙东南)、武夷山脉系 (浙西南+闽北)。其中浙西南的黄精种质具有丰富的遗传多样性, 松阳、龙泉、庆元、景宁虽同属丽水产区, 但由于山脉众多可能产生一定地理隔离, 导致一定程度遗传分化。

黄精为我国药食两用药材, 来源 3 种基原植物, 产区分布广泛, 近年来全国范围内大力发展林下经济, 林下黄精的栽培面积逐渐扩大, 相互引种也逐渐频繁, 因此黄精的种质资源遗传多样性高。本研究首次基于 2 种分子标记方法研究主要黄精产区各居群的遗传多样性, 揭示了黄精重点产区华东

居群的种质地域分布特征, 明确了浙西南地区黄精种质和武夷山脉系的闽北居群亲缘关系近, 且遗传多样性丰富, 本研究结果可为浙产黄精资源保护和选育开发提供一定的理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 姜程曦, 洪涛, 熊伟. 黄精产业发展存在的问题及对策研究 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1247-1250.
- [2] 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): 2831-2835.
- [3] 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.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 23.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 126.
- [6] 姜武, 叶传盛, 吴志刚, 等. 黄精的本草考证 [J]. 中药材, 2017, 40(11): 2713-2716.
- [7] Chen D H, Han Z G, Si J P. Huangjing (*Polygonatum rhizoma*) is an emerging crop with great potential to fight chronic and hidden hunger [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(9): 1564-1566.
- [8] 陈怡, 杨赋祺, 陈松树, 等. 多花黄精种子萌发过程的内源激素含量变化研究 [J]. 中药材, 2020, 43(3): 523-527.
- [9] 姜武, 翁国杭, 陈家栋, 等. 基于 LC-MS 代谢组学的红杆与绿杆型多花黄精化学成分比较研究 [J]. 中国农学通报, 2021, 37(17): 32-38.
- [10] Li L, Thakur K, Liao B Y, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 114: 317-323.
- [11] Wang S, Wang B, Hua W, et al. De novo assembly and analysis of *Polygonatum sibiricum* transcriptome and identification of genes involved in polysaccharide biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): E1950.
- [12] Shen W D, Li X Y, Deng Y Y, et al. *Polygonatum cyrtoneuma* Hua polysaccharide exhibits anti-fatigue activity via regulating osteocalcin signaling [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175: 235-241.
- [13] Wang C K, Peng D Y, Zhu J H, et al. Transcriptome analysis of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua: Identification of genes involved in polysaccharide biosynthesis [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 65.
- [14] 王刚, 曹佩, 韦学敏, 等. 分子标记技术在药用植物种质资源研究中的应用 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(11): 1435-1444.

- [15] 姜武, 吴志刚, 陶正明, 等. 基于 ISSR 和 SRAP 标记的
 梔子种质遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(2):
 510-516.
- [16] 岑晓霞, 孙健, 沈晓霞, 等. 基于 SRAP 和 ISSR 标记的
 栽培麦冬起源和遗传多样性研究 [J]. 中药材, 2021,
 44(3): 555-561.
- [17] 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.
- [18] 王世强, 王立儒, 刘帅, 等. 基于 SSR 标记的黄精品种
 (系) DNA 指纹图谱库构建 [J]. 分子植物育种, 2018,
 16(6): 1878-1887.
- [19] 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.
- [20] 刘跃钧, 张媛, 蒋燕锋, 等. 黄精种质资源遗传多样性
 研究 [J]. 浙江农林大学学报, 2016, 33(6): 1085-1091.
- [21] 刘新, 斯金平, 段承俐, 等. 多花黄精遗传多样性和
 遗传变异规律研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10):
 2835-2841.
- [22] 刘佳, 王文祥, 朱翔, 等. 多花黄精开花动态及传粉方
 式研究 [J]. 种子, 2017, 36(4): 41-45.

[责任编辑 时圣明]