

• 药材与资源 •

基于 SSR-HRM 技术的 4 种药用天麻变型遗传多样性及遗传结构分析

张俊¹, 于涵¹, 李召辉¹, 邓佳乐¹, 强萌¹, 郑钰宁¹, 张兴国², 陈蓉^{3*}, 吕光华^{1,3*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 西南交通大学 中药研究所, 四川 成都 610031

3. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 比较乌天麻 *Gastrodia elata* f. *glauca*、绿天麻 *G. elata* f. *viridis*、红天麻 *G. elata* f. *elata* 和黄天麻 *G. elata* f. *flavida* 4 种药用天麻变型的遗传多样性、遗传结构和遗传信息差异, 为天麻新品种选育提供依据。方法 从不同产地收集了 40 份不同天麻变型的花茎。应用简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 分子标记与高分辨率熔解曲线 (high-resolution melting, HRM) 相结合技术, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 从 80 对引物中筛选出 15 对多态性高的 SSR 引物。对这些天麻花茎样品进行实时荧光定量 PCR 扩增, 统计遗传多样性参数, 分析群体遗传结构, 结合 40 份天麻的 HRM 数据进行聚类分析。结果 从 15 对 SSR 引物检测到 114 个等位基因, 平均每对引物 7.6 个。天麻样品的观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、和 Nei's 多样性指数 (Nei's diversity index, N_d) 的平均值分别为 0.981 3、0.801 9 和 0.812 1, 表明天麻的遗传多样性丰富。这 4 种天麻变型的遗传多样性不同, 从高到低依次为乌天麻、绿天麻、红天麻和黄天麻。SSR-HRM 分析将这 40 份天麻样品分为 4 个基因型, 各天麻变型的大多数样品分布在不同的基因型中。这 4 种天麻变型之间的遗传距离不同, 乌天麻与绿天麻遗传距离最近, 与黄天麻遗传距离最远。结论 SSR-HRM 技术对天麻基因分型更准确。这 4 种天麻变型的遗传信息不同, 但存在基因交流现象。乌天麻与绿天麻亲缘关系最近, 与红天麻次之, 与黄天麻亲缘关系最远。可利用不同天麻变型遗传信息差异进行新品种选育。

关键词: 天麻; 乌天麻; 绿天麻; 红天麻; 黄天麻; 变型; SSR; HRM; 遗传多样性; 遗传结构; 亲缘关系

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2898-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.022

Study on genetic diversity and genetic structure among four forms of medicinal *Gastrodiae Rhizoma* by SSR-HRM techniques

ZHANG Jun¹, YU Han¹, LI Zhao-hui¹, DENG Jia-le¹, QIANG Meng¹, ZHENG Yu-ning¹, ZHANG Xing-guo², CHEN Rong³, LYU Guang-hua^{1,3}

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

3. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To provide a basis for the selection of new varieties of Tianma (*Gastrodiae Rhizoma*) by comparing the genetic diversity, genetic structure and genetic information among the four forms of medicinal *G. elata*, i.e. Wutianma (*G. elata* Bl. f. *glauca* S. Chow), Lvtianma (*G. elata* Bl. f. *viridis* Makino), Hongtianma (*G. elata* Bl. f. *elata* S. Chow); Huangtianma (*G. elata* Bl. f. *flavida* S. Chow). **Methods** A total of 40 flowering stems of different *G. elata* forms were collected from different cultivating areas. 15 pairs of SSR primers with high polymorphism were selected from 80 pairs of primers by polyacrylamide gel electrophoresis and combined simple sequence repeat (SSR) molecular markers with HRM (high-resolution melting) technique. Real-time fluorescence quantitative PCR amplification, counting genetic diversity parameters and analyzing population genetic structure of these flowering stems samples

收稿日期: 2022-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82274056); 四川省科技计划项目 (2021YFYZ0012)

作者简介: 张俊 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: 931187463@qq.com

*通信作者: 吕光华, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药/民族药鉴定及资源利用。E-mail: lughcd@aliyun.com

陈蓉, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药/民族药分子生物学。E-mail: chenrong@cudtcu.edu.cn

were performed. The cluster analysis was further conducted in combination with HRM data from the 40 Tianma samples. **Results** A total of 114 alleles were detected in the 15 pairs of SSR primers with an average of 7.6 alleles per pair. The mean of observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and Nei's diversity index (N_{ei}) were 0.9813, 0.8019 and 0.8121 ($n = 15$), respectively. It indicated that the genetic diversity of Tianma was rich. The genetic diversity of the four forms of medicinal Tianma was different with the descending order of Wutianma, Lvtianma, Hongtianma and Huangtianma. These 40 Tianma samples were classified into four genotypes based on SSR-HRM data. Most Tianma samples for specific form were distributed in same genotype. The genetic distances between the four Tianma forms were different. Wutianma was the closest genetic distance to Lvtianma and the farthest genetic distance to Huangtianma. **Conclusion** The accuracy of SSR-HRM technique for Tianma genotyping is better than that of SSR technique. The genetic information in the four Tianma forms is different, but gene exchange phenomenon exists among them. The relationship between Wutianma and Lvtianma is closest, next to Hongtianma, and farthest to Huangtianma. These differences of genetic information among four forms of Tianma should be used for the selecting of new varieties.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; *G. elata* Bl. f. *glauca* S. Chow; *G. elata* Bl. f. *viridis* Makino; *G. elata* Bl. f. *elata* S. Chow; *G. elata* Bl. f. *flavida* S. Chow; variant; simple sequence repeat; high-resolution melting; genetic diversity; genetic structure; relationship

天麻来源于兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 为我国常用大宗中药, 具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功效^[1]。现代研究表明, 天麻具有抗癫痫、改善睡眠、改善记忆、抗抑郁等多种医疗及保健作用^[2]。天麻及其中成药在临床上用于治疗头痛、癫痫、失眠等疾病^[3-5]; 其保健功能则用于改善人们失眠、抑郁、记忆减退等亚健康问题。天麻作为药食两用中药, 具有良好的开发应用前景。根据天麻植物的形态特征, 将天麻分为乌天麻 *G. elata* Bl. f. *glauca* S. Chow、绿天麻 *G. elata* Bl. f. *viridis* Makino、红天麻(原变型) *G. elata* Bl. f. *elata* S. Chow 黄天麻 *G. elata* Bl. f. *flavida* S. Chow 和松天麻 *G. elata* Bl. f. *alba* S. Chow。由于松天麻的含水量高(90%以上), 折干率低, 未引种栽培^[6]。目前人工种植的药用天麻为乌天麻、绿天麻、红天麻和黄天麻及其杂交品种。近年来, 天麻的需求量越来越大, 野生天麻早已无法满足人们的需求, 人工种植成为天麻的主要来源。由于人工种植天麻数代后, 天麻的质量与产量都显著下降, 种质退化^[7], 因此需要不断地选育优良新品种。

杂交育种和分子育种(包括分子标记辅助育种和遗传修饰育种)已成为新品种选育的主要途径。亲本的遗传信息差异越大, 杂交优势越明显, 从后代中选育优良新品种的概率越大。因此, 阐明乌天麻、绿天麻、红天麻和黄天麻的遗传信息差异及其亲缘关系, 有利于选育天麻新品种。而目前未见这4种药用天麻变型遗传信息的对比研究报道。

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记具有共显性、多态性丰富、稳定、操作简单等优点^[8], 已广泛应用于当归^[9]、黄精^[10]、砂仁^[11]等

中药遗传多样性的研究。SSR分子标记扩增产物的检测方法通常采用聚丙烯酰胺-银染法。虽然该方法的灵敏度和分辨率高, 操作简单, 但是难以读取扩增片段大小; 并且在分析的材料较多、位点较多、片段差异较小时, 数据的准确性降低^[12]。高分辨率熔解曲线(high-resolution melting, HRM)技术依靠核酸分子片段大小、GC碱基含量等物理性质, 能够更准确、有效地区分SSR位点与不同基因型, 识别产物片段中极小的碱基差异, 是一种分辨率高并且成本相对较低的DNA检测技术^[13]。

为此, 本研究从不同天麻产地收集了40份乌天麻、绿天麻、红天麻和黄天麻的花茎样品。将SSR分子标记和HRM技术相结合, 从80对SSR引物标记中筛选出多态性高的引物标记, 根据SSR标记分析这些天麻的遗传多样性; 分别应用SSR技术和SSR-HRM技术识别这些天麻的群体遗传结构。并使用邻接法(neighbor-joining method, NJ)对SSR-HRM数据进行聚类分析, 研究这4种药用天麻变型之间的亲缘关系, 以期为天麻杂交育种和分子育种等新品种选育提供依据。

1 仪器、试剂与样品

1.1 仪器

Archimed X4型实时荧光定量PCR仪(鲲鹏基因北京科技有限责任公司), TC-96型基因扩增仪(杭州博日科技股份有限公司), Universal Hood II型凝胶成像分析仪(伯乐生命医学产品有限公司), MB-102型恒温混匀仪(杭州博日科技股份有限公司), 琼脂糖凝胶电泳仪(Universal power supply, 伯乐生命医学产品有限公司), Sub-cell GT型电泳槽(伯乐生命医学产品有限公司), H1650K型高

速离心机（长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司），N60 Touch 型超微量紫外可见分光光度计（北京百泰克生物技术有限公司）等。

1.2 试剂

植物基因组 DNA 纯化试剂盒、DNA 聚合酶预混试剂（2×EasyTaq® PCR SuperMix for PAGE）和高分辨率熔解曲线分析试剂盒均为北京全式金生物技术有限公司生产；DNA 非变性 PAGE 制胶及电泳试剂盒、快速核酸银染试剂盒为北京酷来搏科技有限公司生产。核酸染料（天根生化科技有限公司），高纯度低电渗琼脂糖（北京擎科新业生物技术有限公司），过硫酸铵（分析纯，成都市科隆化学有限公司，批号 2022042701）。

1.3 样品

从四川、云南、湖北、安徽等不同产地收集了 40 份不同天麻变型的新鲜花茎，经西南交通大学张兴国教授分别鉴定为乌天麻 *G. elata* Bl. f. *glauca* S. Chow、绿天麻 *G. elata* Bl. f. *viridis* Makino、红天麻 *G. elata* Bl. f. *elata*、黄天麻 *G. elata* Bl. f. *flavida* S. Chow。将新鲜花茎放入冻存管中，置于液氮中保存，备用。样品名称、采集产地及时间等见表 1。

2 方法

2.1 DNA 提取

取 100 mg 新鲜花茎组织于预冷的研钵中，加入液氮充分研磨；用植物基因组 DNA 纯化试剂盒按照说明书提取天麻样品中的 DNA；经琼脂糖凝胶电泳检测后，用超微量紫外分光光度计检测所提取 DNA 的纯度和浓度；将原液置于 -20 °C 冰箱保存。调整工作液中 DNA 的浓度为 50 ng/μL，作为模板 DNA，用于后续实验。

2.2 引物筛选

根据文献中引物的多态性和扩增情况^[14-22]，结合位点的 DNA 序列，设计了 80 对候选 SSR 引物，由北京擎科生物科技有限公司合成。根据材料的特性和来源，随机抽取 4 份天麻 DNA 材料（样品号 TM06、TM23、TM34、TM40）进行引物筛选。PCR 反应体系为 20 μL，包含 DNA 聚合酶预混试剂 10 μL，模板 DNA 溶液 1 μL，上、下游引物各 0.5 μL，灭菌水 8 μL。反应程序为 94 °C 预变性 3 min，94 °C 变性 30 s，在退火温度下退火 45 s（引物退火温度见表 2），72 °C 延伸 45 s，循环 35 次，最后于 72 °C 延伸 7 min。扩增完成后于 4 °C 保存。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，在凝胶成像仪中观察结

表 1 天麻花茎样品信息

Table 1 Samples information of *Gastrodiae Rhizoma* flowering stems

样品号	变型名称	栽培/野生	采集产地	采集时间
TM01	乌天麻	栽培	四川省广元市青川县	2021-05
TM02	乌天麻	栽培	四川省巴中市南江县	2021-07
TM03	乌天麻	栽培	四川省巴中市通江县	2021-05
TM04	乌天麻	栽培	四川省巴中市通江县	2021-06
TM05	乌天麻	栽培	四川省巴中市通江县	2022-05
TM06	乌天麻	栽培	四川省巴中市通江县	2022-05
TM07	乌天麻	栽培	四川省巴中市通江县	2022-05
TM08	乌天麻	栽培	四川省巴中市通江县	2022-06
TM09	乌天麻	栽培	四川省乐山市峨边县	2021-05
TM10	乌天麻	栽培	四川省乐山市金口河	2022-06
TM11	乌天麻	栽培	四川省凉山州雷波县	2022-05
TM12	乌天麻	栽培	云南省昭通市彝良县	2021-06
TM13	乌天麻	栽培	湖北省宜昌市五峰土族自治县	2022-06
TM14	乌天麻	栽培	安徽省安庆市岳西县	2022-05
TM15	乌天麻	野生	四川省广元市青川县	2021-06
TM16	乌天麻	野生	四川省巴中市南江县	2021-05
TM17	乌天麻	野生	四川省巴中市通江县	2021-06
TM18	乌天麻	野生	四川省达州市万源市	2022-06
TM19	乌天麻	野生	四川省达州市万源市	2021-06
TM20	乌天麻	野生	四川省达州市万源市	2022-06
TM21	乌天麻	野生	四川省达州市宣汉县	2021-06
TM22	绿天麻	栽培	四川省巴中市通江县	2022-06
TM23	绿天麻	栽培	四川省达州市万源市	2021-05
TM24	绿天麻	栽培	四川省达州市万源市	2022-05
TM25	绿天麻	栽培	四川省达州市宣汉县	2022-06
TM26	绿天麻	栽培	四川省乐山市峨边县	2021-05
TM27	绿天麻	栽培	四川省乐山市金口河	2021-04
TM28	绿天麻	栽培	四川省乐山市金口河	2022-05
TM29	绿天麻	栽培	四川省乐山市金口河	2021-05
TM30	绿天麻	栽培	四川省凉山州雷波县	2021-06
TM31	绿天麻	栽培	湖北省十堰市神农架林区	2021-06
TM32	绿天麻	野生	四川省达州市万源市	2021-07
TM33	红天麻	栽培	四川省广元市青川县	2021-05
TM34	红天麻	栽培	四川省广元市青川县	2022-05
TM35	红天麻	栽培	四川省达州市万源市	2021-06
TM36	红天麻	栽培	四川省达州市万源市	2022-07
TM37	红天麻	栽培	四川省达州市万源市	2022-06
TM38	黄天麻	栽培	四川省达州市宣汉县	2022-05
TM39	黄天麻	栽培	四川省达州市宣汉县	2022-06
TM40	黄天麻	栽培	云南省昭通市永善县	2021-05

果, 选取条带清晰明亮、无拖尾现象的引物用于后续实验。将扩增产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 设置电压为 120 V, 电流为 100 mA, 电泳时间为 1 h; 经快速银染显影后, 读取条带。选取条带清晰、多态性稳定的引物进行 HRM 分析。

2.3 SSR-HRM 的反应体系和程序

以提取的 40 份天麻 DNA 作为模板, 利用筛选出的 15 对 SSR 标记引物, 在实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增和高分辨率熔解曲线分析。PCR 反应用高分辨率熔解曲线分析预混试剂[2×HRM Analysis PreMix (EvaGreen)], 体系为 20 μL, 包含 2×HRM Analysis PreMix 10 μL, 模板 DNA 1 μL, 上、下游引物各 0.6 μL, 灭菌水 7.8 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 10 s, 在退火温度下退火 20 s (引物退火温度见表 2), 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次。HRM 程序: 94 °C 变性 60 s, 快速冷却至 40 °C, 保持 60 s, 接着以 0.025 °C/s 的速度升至 97 °C。

2.4 数据统计与分析

采用人工读胶的方法, 按照带型自下而上记录, 忽略弱杂带, 统计各位点条带的片段大小。用 GenALEX 6.502 软件统计所有样本的基因型组成。用 Powermarker 3.25 软件计算引物的多态性信息

(polymorphism information content, PIC)、等位基因数 (number of alleles, N_a)、有效等位基因数目 (number of valid alleles, N_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、Shannon's 多样性指数 (Nei's genetic identity, I)、Nei's 多样性指数 (Nei's diversity index, N_{ei}) 等。用 Structure 2.3.4 软件分析群体遗传结构, 将结果上传到 Structure Harvester 在线工具 (<https://taylor0. Biology.Ucla. Edu/structure Harvester/>), 估计最佳群体数。用 Archimed Analyzer V1.0 软件分析 HRM 数据, 对这 40 份天麻的基因型进行分组, 并进行聚类分析。

3 结果与分析

3.1 引物的筛选

为了选出多态性较高的引物, 本研究用 PCR 扩增与琼脂糖凝胶电泳方法, 从 80 对引物中选出了 27 对清晰整齐、多态性较高的引物; 再从这 27 对引物中选出 15 对条带清晰、多态性稳定的引物, 分别为 YW01、YW02、YW03、YW06、YW11、YW30、YW31、YW40、YW41、YW43、YW47、YW54、YW69、YW72、YW76。这 15 条引物用于后续 40 份天麻样品的 SSR-HRM 分析 (表 2)。

表 2 筛选出的 15 对引物信息

Table 2 Information of selected 15 pairs of primers

序号	引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度/°C
1	YW01	F: TCCACTGTCAACAACACTCAAGATGTT R: GCTTATGCGCAATATGTATGCAGGT	55.0
2	YW02	F: TTCACTGTCAACAACACTCAAGATGTT R: GCTTATGCGCAATATGTATGCAGGT	55.0
3	YW03	F: CTACCTAGTCAAGGTGATCCACATG R: GGATTTGGGTGATTATTGGGGAAAA	54.0
4	YW06	F: TGTGCATAAATCAATTTATC R: CAATGACAACAACAAAAGGA	47.0
5	YW11	F: TCTGTTTGTGCTGTTGTGC R: CACCCATACATACACTCATTACACC	63.0
6	YW30	F: AGTGGAGAAGGTTCTACAAT R: CATGTGTAAGCATTCTGCTG	55.0
7	YW31	F: TCATTTGACCTCTCCATTTATT R: CTAACCCTAGTTTATAGTTTGG	55.0
8	YW40	F: CAACCAAGACAAGACTCATG R: ACATTCTTCCCTGGATGTTT	52.0
9	YW41	F: GGCATTATCCTGTATACTC R: GGGCTTTCATTTGATCATGC	51.0
10	YW43	F: GTCATGCACATTCTCCCTG R: AGACTCATGTTGTTGATCCC	53.0
11	YW47	F: TCTTCCCGCACCTCTTCAAC R: TTCAGAAGCATGGCACTGGG	58.0
12	YW54	F: AGTCCTGCCTTCAAGCCTTG R: GAAGGATTCAAGCATGGGAG	54.0
13	YW69	F: CCCACTCATTTGCTTAGGTATCC R: TGCATCTAGAGTGTGTGCAATC	57.5
14	YW72	F: TGCCATTTCTTTCGAGCAGG R: GTGAGGCGATCTTCACAGC	57.5
15	YW76	F: GTGATCTGCTAGCCTCAACC R: GCTGAAGCTCTTGGTGTGC	57.0

3.2 天麻总体样本的遗传多样性分析

为了分析这 40 份天麻总体样本的遗传多样性,本研究用筛选出的 15 对引物对这些天麻样品进行了 PCR 扩增,读取聚丙烯酰胺凝胶电泳条带的大小,分析这 40 份天麻样本的遗传多样性(表 3)。结果显示,15 对天麻 SSR 引物在 40 份天麻样品中检测出了 114 个等位基因变异,平均每对引物的 N_a 为 7.60 个,变化范围为 4~15 个。其中,引物 YW06 等位基因数最多(15 个),扩增片段大小为 248~346 bp。15 对 SSR 引物的多态性信息含量的多态信息含量(polymorphism information content, PIC) 值为

0.678 4~0.881 9,平均值为 0.7723,最高的 PIC 值为 YW03 引物标记(0.881 9)。所有引物标记的多态性信息含量的 PIC 值均大于 0.6,其中有 13 对 SSR 引物标记的 PIC 值大于 0.7,属于高多态性位点,说明所选引物多态性较高。 N_e 为 3.665 1~9.248 6,平均值为 5.349 1; H_o 为 0.820 5~1.000 0,平均值为 0.9813; H_e 为 0.727 2~0.891 9,平均值为 0.8019; N_{ei} 为 0.736 6~0.903 2,平均值为 0.812 1。与周天华等^[21]天麻遗传多样性的研究结果(N_a 为 6.4286, H_e 为 0.789 0, I 为 1.682 9)比较,本研究收集的 40 份天麻样本的遗传多样性更丰富。

表 3 天麻样品 15 个 SSR 位点的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of *Gastrodiae Rhizoma* samples by 15 SSR markers

引物名称	N_a	N_e	I	H_o	H_e	N_{ei}	PIC
YW01	8	4.637 7	1.695 0	1.000 0	0.784 4	0.794 3	0.752 6
YW02	6	4.301 1	1.538 3	1.000 0	0.767 5	0.777 2	0.728 1
YW03	14	9.248 6	2.366 5	1.000 0	0.891 9	0.903 2	0.881 9
YW06	15	6.859 9	2.227 5	0.973 7	0.854 2	0.865 6	0.840 0
YW11	7	5.633 8	1.816 0	1.000 0	0.822 5	0.832 9	0.798 3
YW30	9	6.425 7	1.962 1	1.000 0	0.844 4	0.855 1	0.825 3
YW31	7	4.783 3	1.649 8	1.000 0	0.790 9	0.800 9	0.758 3
YW40	6	4.123 7	1.516 9	1.000 0	0.757 5	0.767 1	0.716 8
YW41	4	3.665 1	1.342 5	0.820 5	0.727 2	0.736 6	0.678 4
YW43	4	3.805 0	1.361 5	0.925 0	0.737 2	0.746 5	0.689 0
YW47	8	5.095 5	1.785 3	1.000 0	0.803 8	0.813 9	0.776 1
YW54	6	4.244 0	1.559 2	1.000 0	0.764 4	0.774 1	0.726 5
YW69	6	5.838 8	1.777 4	1.000 0	0.828 7	0.839 5	0.804 7
YW72	8	5.714 3	1.893 6	1.000 0	0.825 0	0.835 4	0.803 3
YW76	6	5.860 8	1.780 0	1.000 0	0.829 4	0.839 9	0.805 6
平均值	7.6	5.349 1	1.751 4	0.981 3	0.801 9	0.812 1	0.772 3

3.3 不同天麻变型的遗传多样性分析

为了比较这 4 种药用天麻变型各自的遗传多样性,本研究分别计算了这 4 种天麻变型各自的遗传多样性参数(表 4)。结果显示,这 4 种天麻变型各自的遗传多样性不同,从高到低依次为乌天麻、绿天麻、红天麻和黄天麻。其中,乌天麻群体的每个位点平均 $N_a=6.866 7$ 、平均 $N_e=5.357 2$ 、 $I=1.733 4$ 和 $H_e=0.803 0$ 都是最大,表明乌天麻具有较高的遗传多样性。

3.4 不同天麻变型群体遗传结构分析

群体遗传结构分析可对种群进行溯源,获得个体之间杂交等信息。为了阐明这 4 种天麻变型的群

表 4 不同天麻变型的遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters of different *Gastrodiae Rhizoma* variants

天麻变型	N_a	N_e	I	H_e
乌天麻	6.866 7	5.357 2	1.733 4	0.803 0
绿天麻	5.533 3	4.644 2	1.580 7	0.775 4
红天麻	5.533 3	4.389 3	1.551 9	0.756 0
黄天麻	2.600 0	2.464 8	0.884 1	0.566 7

体遗传结构和基因交流情况,本研究分别对这 4 种天麻变型的 SSR 分子标记结果和 SSR-HRM 分析结果进行了群体遗传结构分析。

3.4.1 基于 SSR 分子标记的天麻群体遗传结构分析

参考王琰琰等^[23]的方法,根据 ΔK 确定了最佳 K 值,绘制 ΔK 随 K 增大的变化曲线(图 1)。当 $K=3$ 时,似然值最大,将 40 份天麻样本分为 3 组(图 2)。其中, A 组包含 5 份乌天麻, 4 份绿天麻, 3 份红天麻和 2 份黄天麻;这组的少量个体基因交流较明显。B 组包含 11 份乌天麻, 4 份绿天麻, 1 份红天麻;这组的个体基因交流不明显。C 组包含 5 份乌天麻, 3 份绿天麻, 1 份红天麻, 1 份黄天麻;这组的少量个体基因交流较明显。可见,基于 SSR 分子标记进行的群体遗传结构分析,将这 4 种天麻变型分成了 3 组,每组均包含了 3 种或 4 种天麻变型,与这 4 种天麻变型的表型特征不符。

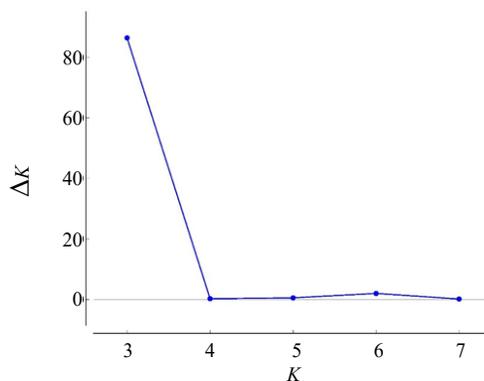
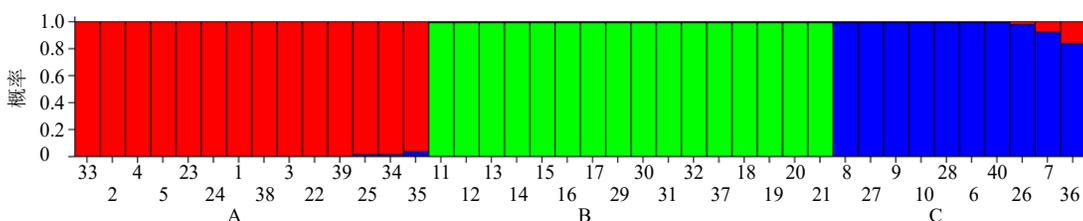


图 1 K 值曲线图

Fig.1 K value curve



1—40-TM1~40 A-少数个体基因交流较明显 B-个体基因交流不明显 C-少数个体基因交流明显

1—40-TM1~40 A-small number of sample with less gene exchange B-sample not found gene exchange C-small number of samples with gene exchange.

图 2 基于 SSR 标记的 40 份天麻样品的群体遗传结构 ($K=3$)

Fig.2 Population genetic structure of 40 Tianma samples based on SSR markers ($K=3$)

3.4.2 基于 SSR-HRM 的天麻群体遗传结构分析 进一步将 SSR 分子标记与 HRM 技术相结合,通过实时荧光定量 PCR 对这 40 份天麻样品的高分辨率熔解曲线进行了分析。结果表明,引物 YW06、YW40、YW43、YW72、YW76 的多态性较好。以引物 YW76 的 SSR-HRM 分析结果为例,40 份天麻的高分辨率熔解曲线均有差异。根据熔点等的不同,这些天麻样品分为 4 个基因型组。第 1 组主要为乌天麻(包含 17 份乌天麻和 1 份绿天麻),第 2 组主要为绿天麻(包含 10 份绿天麻和 1 份乌天麻);第 3 组主要为红天麻(包含 4 份红天麻和 2 份乌天麻),第 4 组主要为黄天麻(包含 3 份黄天麻,1 份乌天麻和 1 份红天麻)。每组的高分辨率熔解曲线的形状明显不同(图 3-C);结合差异图(图 3-A)得到 40 份天麻样品的基因型结果(表 5)。这 4 组的代表性天麻样品分别为 TM10(乌天麻)、TM25(绿天麻)、TM36(红天麻)、TM40(黄天麻)。将他们的熔解曲线和差异图单独列出,更加清晰地显示了各基因型组之间的差异(图 3-B、D)。其余引物的分析结果与引物 YW76 类似,均可将这 40 份天麻分为 4 组。由此可见,这 4 种天麻变型的基因

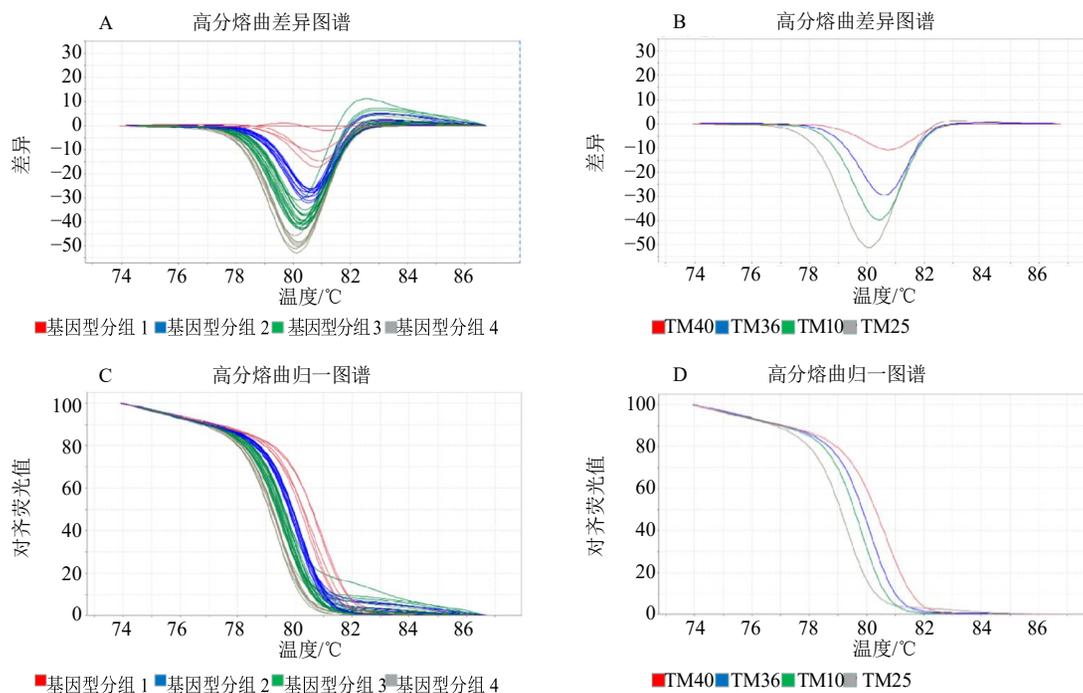
型不同,但存在个别基因交流现象。SSR-HRM 技术分型结果与不同天麻变型的表型特征一致。

3.5 不同天麻变型之间的亲缘关系分析

为了分析这 4 种药用天麻变型之间的亲缘关系,通过 Powermarker 软件,用 Nei 1983 算法计算了不同天麻变型之间的遗传距离(表 6)。结果表明,乌天麻与绿天麻的遗传距离最近(0.080 5),与黄天麻的遗传距离最远(0.431 4)。以遗传距离为基础,利用 Mega 软件,用 NJ 法构建了这 4 种天麻变型的聚类图(图 4)。结果表明,乌天麻与绿天麻之间的亲缘关系最近,与黄天麻之间的亲缘关系最远。

3.6 基于 SSR-HRM 的聚类分析

为了进一步分析这 40 份不同天麻变型样品之间的聚类情况,本研究根据 15 对引物的 SSR-HRM 分析结果,采用 Goldstein 算法计算各样品间的遗传距离,并且用 NJ 法进行了聚类分析(图 5)。结果表明,除乌天麻较分散外,其他 3 种天麻变型各自聚集成束。乌天麻样品与绿天麻样品亲缘关系最近,与红天麻之间的关系次之,与黄天麻亲缘关系最远。



A-40 份天麻样本的差异图，颜色相同的线为同一基因型组 B-4 个基因型组中各代表样品的差异图 C-40 份天麻样本的高分辨率熔解曲线归一化图 D-4 个基因型组中各代表样品的高分辨率熔解曲线归一化图

A-difference plots of 40 Tianma samples. The same line color indicates the same genotype calculated by HRM analysis B-difference plots of the 4 representative Tianma samples C-normalized HRM curve of 40 Tianma samples D-normalized HRM curve of the 4 representative Tianma samples

图 3 引物 YW76 对 40 份天麻样品的 SSR-HRM 分析

Fig. 3 SSR-HRM analysis of 40 Tianma samples with SSR markers YW76

表 5 引物 YW76 对 40 份天麻样品的基因分型结果

Table 5 Genotype group of 40 *Gastrodiae Rhizoma* samples with SSR marker YW76

组别	天麻样品号	包含的天麻变型
1	TM01、TM02、TM03、TM04、TM05、TM06、TM07、TM08、TM09、 TM10、TM12、TM13、TM17、TM18、TM19、TM20、TM21、TM31	17 份乌天麻和 1 份绿天麻
2	TM11、TM22、TM23、TM24、TM25、TM26、TM27、TM28、TM29、 TM30、TM32	10 份绿天麻和 1 份乌天麻
3	TM15、TM16、TM33、TM34、TM35、TM36	4 份红天麻和 2 份乌天麻
4	TM14、TM37、TM38、TM39、TM40	3 份黄天麻，1 份乌天麻，1 份红天麻

表 6 不同天麻变型之间的遗传距离

Table 6 Genetic distance among different Tianma forms

变型名称	乌天麻	绿天麻	红天麻	黄天麻
乌天麻	0.000 0			
绿天麻	0.080 5	0.000 0		
红天麻	0.303 3	0.200 8	0.000 0	
黄天麻	0.431 4	0.195 1	0.267 3	0.000 0

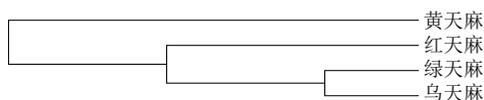
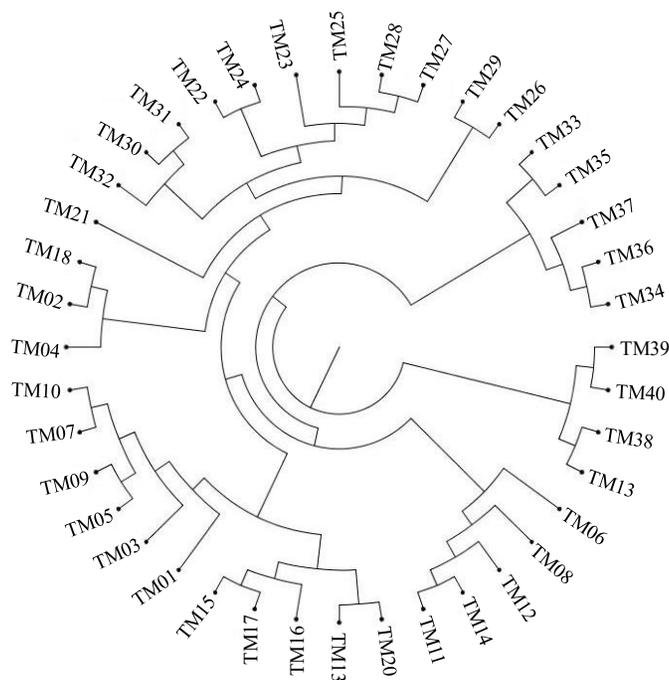


图 4 不同天麻变型之间的聚类图

Fig. 4 Cluster diagram of different *Gastrodiae Rhizoma* forms

这一结果与文献报道的不同天麻变型之间的亲缘关系一致。王德信^[25]根据 ITS 序列位点和单核苷酸变异信息位点分析，认为乌天麻是较古老的类型，绿天麻和黄天麻是由乌天麻进化而来。王齐等^[14]基于

SSR 分子标记对乌天麻、绿天麻和红天麻进行了遗传多样性分析，认为乌天麻与绿天麻亲缘关系较近，与红天麻亲缘关系较远。同时，从这 40 份天麻的聚类图上看，乌天麻较分散，TM13 与黄天麻聚集较近，TM21 与绿天麻更近，栽培乌天麻 (TM01~



TM01~TM14-栽培乌天麻 TM15~TM21-野生乌天麻 TM22~TM32-绿天麻 TM33~TM37-红天麻 TM38~TM40-黄天麻
 TM01—TM14-cultivated Taupe Tianma TM15—TM21-wild Taupe Tianma TM22—TM32-*G. elata* f. *viridis* TM33—TM37-*G. elata* f. *elata*
 TM38—TM40-*G. elata* f. *flavida*

图5 不同天麻样本的聚类图

Fig. 5 Dendrogram of 40 *Gastrodiae Rhizoma* samples

TM14)与野生乌天麻(TM15~TM21)之间也具有一定的差异。陈琦等^[17]SSR分析的结果表明,栽培乌天麻比野生乌天麻的变异更大。

4 讨论

天麻为常用的药食两用中药,用途广,需求量大,野生天麻不能满足人们的需求,人工种植天麻已成为商品天麻的主要来源。由于天麻种植几代后,种质退化,天麻的质量和产量均显著降低,需要不断地选育优良新品种。亲本的遗传多样性越丰富、遗传信息差异越大、亲缘关系较远,则更容易选育出优良新品种。为此,本研究对4种典型药用天麻变型乌天麻、绿天麻、红天麻和黄天麻的遗传多样性、遗传信息差异及其亲缘关系进行了研究。

虽然SSR分子标记技术是研究品种遗传多样性及亲缘关系的首选技术,但是存在读取扩增片段大小不够准确等局限。本研究将SSR分子标记技术和HRM技术相结合,通过实时荧光定量PCR对40份不同天麻变型样品的高分辨率熔解曲线进行分析,将这些天麻分成4个基因型,用NJ法聚类的结果与天麻变型的表型特征、亲缘关系基本一致。而单用SSR分子标记技术,在分析群体遗传结构

时,只能分为3个组,与这4种天麻变型的表型特征不符。说明SSR-HRM技术更适用天麻的遗传结构分析,比较其遗传信息。

通过对这4种药用天麻变型群体样品的 N_a 、 N_e 、 I 和 H_e 比较,发现这4种天麻变型的遗传多样性不同,乌天麻的遗传多样性最丰富,绿天麻和红天麻次之,而黄天麻的遗传多样性最低。说明乌天麻的遗传变异更大,与广泛栽培有关。同时,根据用NJ法对SSR-HRM分型的聚类分析,栽培乌天麻与野生乌天麻的遗传信息有一定差异,需要保护天麻的野生种质资源。

根据SSR分子标记与HRM相结合技术对40份天麻实时荧光定量PCR高分辨率熔解曲线的分析,将这40份天麻分为4个基因型;大多数乌天麻、绿天麻、红天麻、黄天麻在各自的基因型分组内,说明这4种天麻变型的遗传信息不同,但存在少量其他天麻变型样品与该组的主要天麻变型样品之间的差异较小的情况。根据用Nei 1983算法计算的遗传距离和用NJ法构建的聚类图,都表明这4种天麻变型的亲缘关系不同,乌天麻与绿天麻之间的亲缘关系最近,与红天麻之间的关系次之,而与黄天

麻之间的亲缘关系最远。

由此可见,天麻不同变型的遗传多样性不同,遗传信息不同,亲缘关系不同,外在表型特征也不同。在进行天麻新品种选育时,无论开展杂交育种,还是分子辅助育种,选择遗传信息差异大的亲本,更容易产生变异丰富的后代,从中选育出优良或具有特异性的天麻新品种,满足人们的医疗、保健等多样化需求。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 60-61, 85-86.
- [2] 黄红, 刘新民, 吕光华. 天麻防治神经精神疾病的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2188-2194.
- [3] 于涵, 张俊, 陈碧清, 等. 天麻化学成分分类及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5553-5564.
- [4] Heese K. *Gastrodia elata* blume (Tianma): Hope for brain aging and dementia [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 8870148.
- [5] Chen L M, Liu X N, Wang H, *et al.* Gastrodin attenuates pentylentetrazole-induced seizures by modulating the mitogen-activated protein kinase-associated inflammatory responses in mice [J]. *Neurosci Bull*, 2017, 33(3): 264-272.
- [6] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第6卷, 第一分册, 蕨类植物门) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 18.
- [7] 张照宇, 孙建华, 陈士林, 等. 天麻种质资源及其与双菌共生分子机制研究 [J]. 世界中医药, 2022, 17(13): 1819-1826.
- [8] Ma S N, Han C Y, Zhou J, *et al.* Fingerprint identification of white clover cultivars based on SSR molecular markers [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(11): 8513-8521.
- [9] 朱田田, 张明惠, 王富胜, 等. 基于 SSR 荧光标记的不同品种(系)当归遗传关系分析及分子身份证构建 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3774-3783.
- [10] Yang Q W, Jiang Y J, Wang Y P, *et al.* SSR loci analysis in transcriptome and molecular marker development in *Polygonatum sibiricum* [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 4237913.
- [11] 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.
- [12] 刘美娟, 郑司浩, 赵莎, 等. 不同产区黄芩 SSR 分子标记鉴别研究 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(11): 1876-1882.
- [13] Wittwer C T. High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations [J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(6): 857-859.
- [14] 王齐, 周天华, 王佳, 等. 镇巴天麻的遗传多样性与 SSR 指纹图谱分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(13): 4425-4433.
- [15] Ogaki K, Suetsugu K, Kishikawa K, *et al.* New microsatellite markers recognize differences in tandem repeats among four related *Gastrodia* species (Orchidaceae) [J]. *Genes Genet Syst*, 2019, 94(5): 225-229.
- [16] 陈祖云, 王晓丽, 宋聚先. 贵州天麻野生与栽培品种的简单序列重复标记鉴定 [J]. 贵阳医学院学报, 2007, 32(1): 12-14.
- [17] 陈琦, 刘巍, 程纪伦. 贵州野生与栽培天麻种质资源的 SSR 分析 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(2): 26-28.
- [18] 王晓丽, 常楚瑞, 宋聚先, 等. 天麻不同种质的 AFLP 和 SSR 分析 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(3): 555-558.
- [19] 周天华, 丁家玺, 田伟, 等. 天麻基因组微卫星特征分析与分子标记开发 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(9): 1728-1735.
- [20] Kishikawa K, Suetsugu K, Kyogoku D, *et al.* Development of microsatellite markers for the completely cleistogamous species *Gastrodia takeshimensis* (Orchidaceae) that are transferable to its chasmogamous sister *G. nipponica* [J]. *Genes Genet Syst*, 2019, 94(2): 95-98.
- [21] 周天华, 丁家玺, 徐皓, 等. 天麻种质资源的 SSR 指纹图谱研究 [J]. 西北植物学报, 2018, 38(5): 830-838.
- [22] Tsai C C, Wu P Y, Kuo C C, *et al.* Analysis of microsatellites in the vulnerable orchid *Gastrodia flavilabella*: The development of microsatellite markers, and cross-species amplification in *Gastrodia* [J]. *Bot Stud*, 2014, 55(1): 72.
- [23] 王琰琰, 王俊, 刘国祥, 等. 基于 SSR 标记的雪茄烟种质资源指纹图谱库的构建及遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2021, 47(7): 1259-1274.
- [24] 杨飞, 王信, 马传江, 等. 天麻加工炮制、成分分析与体内代谢研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2207-2215.
- [25] 王德信. 天麻 ITS-1 测序及单核苷酸多态性变异位点分析 [J]. 生物技术, 2012, 22(5): 48-51.

[责任编辑 时圣明]