

基于形态学及分子标记方法对黄精属种质遗传多样性研究

杨旭, 梁丹妮[#], 张文武, 刘林, 常艳, 金青^{*}

安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

摘要: **目的** 对不同产地黄精属种质的遗传多样性和亲缘关系进行评价, 为后续开展黄精育种和种质资源研究工作提供理论依据和技术基础。**方法** 搜集了来自全国各地 8 个省的 23 份黄精属资源, 利用形态性状、保守 DNA 衍生多态性 (conserved DNA-derived polymorphism, CDDP)、相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP)、目标起始密码子多态性 (start codon targeted polymorphism, SCoT) 分子标记对 23 份黄精属种质进行遗传多样性和聚类分析。**结果** 对收集的黄精属种质材料的形态性状进行差异性分析, 发现 8 个形态性状指标变异程度较大, 变异系数为 24.10%~76.46%, 均大于 10%, 依据黄精属种质叶的着生位置, 23 份黄精属种质被划分为轮生和互生叶系 2 大类群。利用正交试验优化后的 CDDP、SRAP、SCoT 分子标记 PCR 反应程序, 对黄精属进行遗传多样性和聚类分析, 发现 CDDP 标记的聚类结果更符合地理分布情况; SRAP 能较好地区分基原植物; SCoT 与地理分布呈现一定程度的吻合; 而 CDDP+SRAP+SCoT 的结合, 不但能较好地区分不同基原植物, 而且呈现一定地理分布规律。**结论** 利用形态学及分子标记对不同产地黄精属种质的遗传多样性和亲缘关系进行评价, 为开展黄精育种和种质资源研究工作提供理论依据和技术基础。

关键词: 黄精属; 形态学; CDDP; SRAP; SCoT; 遗传多样性

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8552-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.022

Genetic diversity analysis of *Polygonatum* genus based on morphological and molecular markers

YANG Xu, LIANG Danni, ZHANG Wenwu, LIU Lin, CHANG Yan, JIN Qing

College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: **Objective** To evaluate the genetic diversity and phylogenetic relationships of germplasm in the genus *Polygonatum* from different regions, providing theoretical and technical basis for subsequent research on *Polygonatum* breeding and germplasm resources. **Methods** A total of 23 *Polygonatum* germplasm resources from eight provinces were collected. Genetic diversity and cluster analysis were conducted on 23 *Polygonatum* germplasm using morphological traits, CDDP, SRAP, and SCoT molecular markers. **Results** A differential analysis was conducted on the morphological traits of collected *Polygonatum* germplasm materials, and it was found that the eight morphological traits had a significant degree of variation, with coefficients of variation ranging from 24.10% to 76.46%, all exceeding 10%. Morphological data clustering showed that 23 germplasm of *Polygonatum* genus are divided into two major groups: rotifer and alternate leaf systems based on their leaf positions. Using the optimized CDDP, SRAP, and SCoT molecular marker PCR reaction programs through orthogonal experiments, genetic diversity and cluster analysis were conducted on the genus *Polygonatum*. It was found that the clustering results of CDDP markers were more in line with the actual geographical distribution situation; SRAP can better distinguish primitive plants; SCoT showed a certain degree of consistency with geographical distribution; And CDDP + SRAP + SCoT not only can distinguish different primitive plants well, but also exhibit certain geographical distribution patterns. **Conclusion** Evaluating the genetic diversity and genetic relationships of *Polygonatum* germplasm from different regions using morphological and molecular markers can provide theoretical and technical basis for subsequent *Polygonatum* breeding and germplasm resource research.

Keywords: *Polygonatum* L.; morphology; CDDP; SRAP; SCoT; genetic diversity

收稿日期: 2024-06-02

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究项目 (YJS20210201)

作者简介: 杨旭 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物种质资源。E-mail: 13044078575@163.com

[#]共同第一作者: 梁丹妮 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物种质资源。E-mail: liangdannide@163.com

^{*}通信作者: 金青 (1969—), 女, 博士生导师, 研究方向为药用植物生物技术育种。Tel: (055177)65786907 E-mail: qingjin@ahau.edu.cn

根据《中国药典》2020 年版记载, 药用黄精为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *P. sibiricum* Red. 或多花黄精 *P. cyrtonema* Hua 的干燥根茎^[1]。分子系统学的研究表明黄精属很可能原产于东亚, 东亚区域物种丰富度较高, 之后逐步分化出南北 2 个分支, 黄精属约 50% 的种类分布于中国东南部至喜马拉雅东部, 其余多数来源于中日东北部^[2]。该属具有较强的遗传多样性和较大的变异范围, 属级划分清晰, 种级划分比较模糊, 但其具体分类问题仍有较大的争议^[3]。而通过叶绿体基因组数据构建黄精属的系统发育框架后发现, 黄精属起源于横断山-喜马拉雅地区, 后因地理及气候原因向其他地区扩散^[4]。黄精属植物因其形态上过渡性与地理分布上多样性, 广泛性与重叠性等特点, 使得种间差异趋于复杂且难以进行种间划分, 给种质资源的研究带来困难。

形态多样性不但是物种遗传多样性的重要研究内容, 也是种质资源研究内容的重中之重。形态学标记是指用肉眼或用简单仪器测量植物的形态特征, 是基因型的外在表现。其优点是快速, 简便, 易于观察, 但缺点是形态特征易受人为、环境等因素的影响而发生变化, 多态性差。植物形态受到内部基因与外部环境双重调控, 单靠形态性状研究不够, 因此还需要结合对比验证或者开展更深一步的研究。

保守 DNA 衍生多态性 (conserved DNA-derived polymorphism, CDDP) 技术是 Collard 和 Mackill 开发的一种利用植物基因组中功能基因的保守序列发展起来的分子标记技术^[5]。CDDP 分子标记技术基于功能基因内保守区设计结合功能基因保守区的引物。这些引物和序列具有许多结合位点, 可实现单引物 PCR 扩增, 因为 DNA 保守序列在不同物种之间具有高度保守性^[6]。因此, 对于此序列区域设计得到的引物, 在不同物种间通用性较高, 同时也具有一定的特异性^[7]。CDDP 分子标记已经在许多植物中得到了应用, 如: 牡丹、山茶、泰山柳和重楼属等的遗传多样性的研究中^[8-11]。目前 CDDP 标记技术尚未应用到黄精属种质。

相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 标记通过一对引物对开放读码框 (open reading frame, ORFs) 进行扩增, 即的正向引物 (F-primer) 和反向引物 (R-primer) 进行 PCR 扩增, 揭示 DNA 序列的多态性^[12]。该技术具有操作简便、效率高、重复性好、易于测序和共显性高等特点,

非常适用于基因定位、克隆和其它分子研究。近年来, 它已广泛用于育种工作中遗传变异, 亲缘关系的分析及指纹图谱的建立。目前, SRAP 在黄精属种质多样性分析中的相关报道偏少。姜武等^[13]利用 ISSR 和 SRAP 2 种分子标记在华东产区的分布特征, 明确了黄精种质的亲缘关系。

目标起始密码子多态性 (start codon targeted polymorphism, SCoT) 技术利用 DNA 序列 ATG 翻译起始部位侧翼保守性进行单引物设计, 操作方便, 重复性及稳定性好, 该引物设计简便, 通用性强, 可生成与性状连锁的标记等优势^[14]。SCoT 是近年来发展起来的一项新的分子标记技术, 在黄精种质资源中的应用尚不多见。

本研究利用形态性状、CDDP、SRAP 和 SCoT 分子标记对收集来自我国 8 个省的 23 份黄精属种质的遗传多样性进行分析, 为黄精的遗传多样性和优良品种发掘和选育提供依据, 以便更好的保护和开发黄精。

1 材料与仪器

1.1 材料

从 2020 年 7 月开始, 通过实地采集、资源共享等多种方式对黄精属种质资源进行收集, 并经安徽农业大学何金铃教授进行鉴定为黄精 *P. sibiricum* Red.、多花黄精 *P. cyrtonema* Hua、滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl.、湖北黄精 *P. zanlanscianense* Pam.、玉竹 *P. odoratum* (Mill.) Druce.、小玉竹 *P. humile* Fisch. ex Maxim.、狭叶黄精 *P. stenophyllum* Maxim.。然后种植于安徽省合肥市庐阳区安徽农业大学教学示范基地黄精资源圃中。共收集到来自中国 8 个省的 23 份黄精属种质材料, 供试材料来源见表 1。

1.2 主要仪器

叶面积仪 PCR 仪 (青岛聚创环保集团有限公司); 电泳仪 DYY-10C (北京六一仪器厂); 凝胶成像系统 (勤翔科学仪器有限公司); Elix 纯水机 (美国 millipore 公司); 高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 主要试剂

CTAB (批号 I704BA0006, 上海生工生物工程有限公司); 2×PCR Master Mix (H7325050, YEASEN 公司); DL2000DNA Marker (YEASEN 公司); 核酸染料 (批号 20201228, YEASEN 公司); 琼脂糖 (批号 A6304180, YEASEN 公司); 氯仿 (分

表 1 供试材料

Table 1 Tested materials in this study

| 编号 | 来源 | 物种 | 编号 | 来源 | 物种 |
|----|----------|------|----|----------|------|
| 1 | 山东省泰安市泰山 | 黄精 | 13 | 吉林省扶余市 | 小玉竹 |
| 2 | 山东省日照市 | 黄精 | 14 | 安徽省青阳县 | 湖北黄精 |
| 3 | 山东省蓬莱市 | 玉竹 | 15 | 安徽省青阳县 | 多花黄精 |
| 4 | 福建省南平市 | 多花黄精 | 16 | 安徽省青阳县 | 多花黄精 |
| 5 | 福建省南平市 | 多花黄精 | 17 | 安徽省青阳县 | 多花黄精 |
| 6 | 广西省桂林市 | 多花黄精 | 18 | 安徽省泾县 | 多花黄精 |
| 7 | 湖南省益阳市 | 湖北黄精 | 19 | 安徽省金寨县 | 湖北黄精 |
| 8 | 湖南省益阳市 | 多花黄精 | 20 | 安徽省金寨县 | 多花黄精 |
| 9 | 江西省九江市 | 多花黄精 | 21 | 安徽省岳西县 | 多花黄精 |
| 10 | 重庆市南水区 | 多花黄精 | 22 | 安徽省安庆市 | 多花黄精 |
| 11 | 云南省红河市 | 滇黄精 | 23 | 安徽省黄山市黄山 | 多花黄精 |
| 12 | 吉林省扶余市 | 狭叶黄精 | | | |

析纯)、异丙醇(分析纯)、异戊醇(分析纯)、无水乙醇(分析纯)等均购自无锡市展望化工试剂有限公司;引物由上海生工公司合成。

2 方法

2.1 形态学观察及测定

2021年6月初,在23个黄精属植物小区内,每个小区选择生长良好、长势一致的植株进行插排标记,每个地区分别选择3个重复,每个重复10株,各植株形态特征测定均采用定株定叶的测量方法。

2.2 DNA提取

采集新鲜材料的叶片,在液氮中研磨成粉末,然后通过使用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)^[15],从干燥的叶片中提取基因组DNA。NanoDrop-1000型核酸测定仪检测模板DNA的质量,调节质量浓度为50 mg/L, -20℃储藏备用。

2.3 PCR扩增

2.3.1 CDDP-PCR 扩增反应体系 经过比较和优化确定,每个20 μL PCR混合物含有2×Taq Master Mix(含染料)10 μL,50 ng/μL DNA模板1.5 μL,10 pmol/μL引物1.0 μL,7.5 μL ddH₂O。CDDP-PCR扩增变性60 s、复性60 s、延伸120 s,后35个循环复性温度60℃。

2.3.2 SRAP-PCR 扩增反应体系 经过比较和优化确定,每个10 μL PCR混合物含有2×Taq Master Mix(含染料)5 μL,50 ng/μL DNA模板1.0 μL,10 pmol/μL正反引物各0.5 μL,3 μL ddH₂O。SRAP-PCR扩增变性30 s、复性60 s、延伸120 s,后35个循环复性温度55℃。

2.3.3 SCoT-PCR 反应体系 为每个10 μL PCR混合物含有2×Taq Master Mix(含染料)5.0 μL,50 ng/μL DNA模板1 μL,10 pmol/μL正反引物各0.5 μL,3 μL ddH₂O。SCoT-PCR扩增变性60 s、复性45 s、延伸120 s,后35个循环复性温度55℃。

2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增的产物,Marker以DM 2000作为相对分子质量参考。电泳40 min后,用凝胶成像系统观察和拍摄。

2.4 数据分析

形态性状试验数据经Excel整理后,利用SPSS软件进行差异性分析、相关性分析、聚类分析,聚类方法采用组间联接法,遗传距离为平方欧式距离。

DNA分子标记结果根据电泳图中显示的条带,用1表示有条带;用0表示没有条带。然后将数据转换为1/0的二进制字符矩阵,将数据整理到Excel 2003中生成原始数据矩阵。利用POPGENE 32软件计算多个遗传多样性参数来评估黄精属种质遗传多样性。使用GenAlEx V6插件进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA),NTSYS-pc 2.10e软件进行遗传相似性系数分析,按非加权组平均法(UPGMA)构建黄精属种质聚类树状图。使用Structure 2.3.4对黄精属种质结构进行分析,将K值设定为1~10,进行10次循环,设定Burn-in时间为10 000,并进行50 000次的重复,在Structure Harvester网站上进行计算,根据分析结果中的LnP(K)值来确定最优分组数K,构建群体结构图。用SPSSAU中的Pearson相关性检验形态学标记和不同DNA分子标记之间的相关度。

3 结果与分析

3.1 基于形态学的遗传多样性分析

3.1.1 形态学数据主成分分析 通过对 23 份黄精属种质材料的 8 个数量性状进行主成分分析, 前 3 个成分的特征值都大于 1, 解释 85.541% 的形态变异 (表 2), 说明这 3 个主成分所包括的形态性状信息量涵盖了 8 个性状总信息量的 85.541%, 前 3 个成分是导致黄精种质变异的主要因素。

表 2 23 份黄精属种质资源主要形态性状的主成分分析

Table 2 Principal component analysis of 23 germplasm resources of *Polygonatum*

| 项目 | 成分 1 | 成分 2 | 成分 3 |
|---------------------|--------|--------|--------|
| 叶长/cm | 0.890 | -0.123 | -0.295 |
| 叶宽/cm | 0.863 | 0.202 | -0.438 |
| 叶面积/cm ² | 0.818 | 0.149 | 0.368 |
| 株高/cm | 0.767 | 0.106 | 0.562 |
| 茎粗/cm | -0.392 | 0.863 | -0.036 |
| 叶片数/片 | 0.418 | 0.732 | -0.454 |
| 根茎直径/mm | -0.596 | 0.695 | 0.131 |
| 结节直径/mm | 0.370 | 0.482 | 0.437 |
| 特征值 | 3.613 | 2.084 | 1.146 |
| 贡献率/% | 45.168 | 26.049 | 14.323 |
| 累计贡献率/% | 45.168 | 71.218 | 85.541 |

第 1 主成分的特征值为 3.613, 贡献率为 45.168%, 叶宽、叶面积、根茎直径和结节直径是主要指标, 株高和叶数为负向系数, 说明叶宽和叶面积越大, 光合作用越强, 积累的物质越多, 其根茎直径和结节直径越粗。第 2 主成分的特征值为 2.084, 贡献率为 26.049%, 株高、叶长和叶数为主要指标, 叶宽为负向系数, 既株高增加, 其叶长和叶数增加。第 3 主成分的特征值 1.146, 贡献率为 14.323%, 根茎直径、结节直径和茎粗为主要指标, 叶宽、叶面积、叶长为负向系数, 说明茎粗数值增加, 其运输能力增强, 根茎直径和结节直径增加。

3.1.2 基于形态性状的聚类分析 基于 23 份供试材料的形态性状数据, 计算各样本间的欧式距离并进行聚类分析 (图 1)。当欧氏距离为 25 时, 23 份供试材料被分为 2 大类群, A 类群的 7 份黄精属种质主要为轮生叶类, B 类群的 16 份黄精属种质主要为互生叶类。当欧氏距离为 10 时, 23 份黄精属种质可分为 5 个亚类, 亚类 I 包括主要叶序为轮生叶且叶型为条状披针形的种质, 该类群的主要形态特征表现为叶面积、叶宽较小, 叶片数相较于其他类群较多。

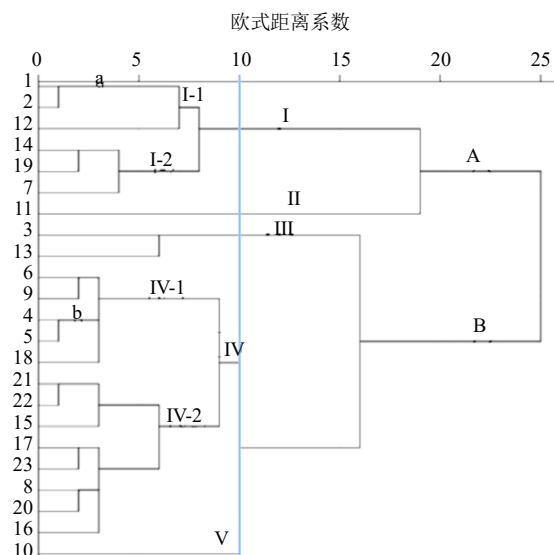


图 1 23 份黄精属种质形态性状聚类图

Fig. 1 Cluster diagram of phenotypic traits of 23 *Polygonatum* germplasm materials

亚类 II 仅包括来自云南的滇黄精, 该类群的主要形态特征为轮生叶序且块茎形状为姜形。亚类 III 聚集黄精属中的玉竹, 欧式距离系数为 9.279, 分别来自山东烟台的玉竹和吉林的小玉竹, 该类群的主要形态特征为根茎为圆柱形, 且根茎直径和结节直径较小。亚类 IV 将多花黄精聚集在一起, 该类群都为互生叶序且以连珠状根茎为主。亚类 V 只包含来自重庆的 10 号种质, 该种质的形态特征表现为叶面积、叶长、叶宽较大, 其中叶长在 23 份种质中数值最大。

3.2 基于分子标记的遗传多样性分析

3.2.1 基于 CDDP 的遗传多样性分析 根据遗传相似系数和遗传距离数据, 在遗传相似系数为 0.39 时, 23 份种质划分为 A 和 B 2 个类群 (图 2)。A 类群中, 包含 5 个亚群, 种质较为丰富, 其中来自山东的黄精和来自安徽青阳的多花黄精与其他成员相距甚远, 形成一个紧凑的群组 (I 亚群), 其中 I-1 分支将来自山东泰安的黄精 (1 号种质) 和山东日照的黄精 (2 号种质) 聚集在一起。II-1 中的 b 分支则是原产地为安徽青阳、安徽金寨、安徽泾县、安徽安庆以及安徽黄山的多花黄精聚集在一起, 其中 16 号种质和 17 号种质遗传关系最近, 遗传相似系数数值为 0.649。IV 亚群则是将同源于吉林省的 12 号和 13 号种质聚集在一起, 而 13 号属于小玉竹种质, 形成一个单独的分支, 2 号和 11 号因同属轮生叶系聚集在一起。B 类群是由来自安徽青阳的 14 号湖

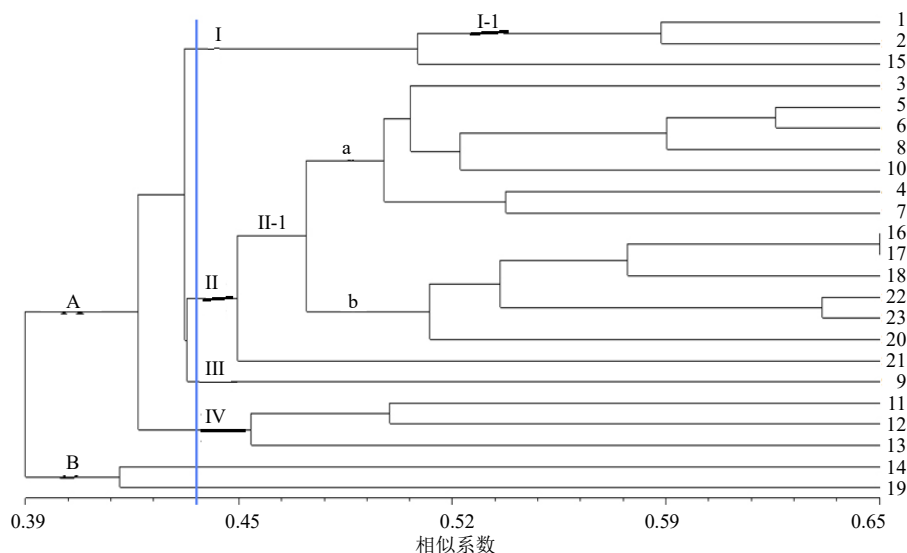


图 2 基于 CDDP 数据的 23 份黄精属种质聚类图

Fig. 2 Cluster diagram of 23 *Polygonatum* germplasm materials based on CDDP data

北黄精种质和来自安徽金寨的 19 号湖北黄精种质组成，因均来自安徽且同属湖北黄精被聚集在一起。并且观察到同一来源地的种质大多形成一个集群，该聚类结果与种质地理分布具有一定程度的吻合。

STRUCTURE 软件常被用来分析遗传多样性中物种内亚群的真实数量，基于 CDDP-PCR 的结果，利用 Structure 绘制 23 份黄精的遗传结构图(图 3)。3 个亚群分别用红色、绿色和蓝色表示，单一颜色的类群表明种质的基因纯正，基于模型的遗传结构结果分析，I、II 和 III 是混合亚群，部分种质有基因交流，I 类群包含 12 份种质，其中将同源于福建省南平市的 4 号和 5 号种质和同源于湖南省益阳市的 7 号和 8 号聚集成群；II 类群单一绿色明显，包含 6 份种质，均来自安徽省，且同属多花黄精种质；III 类群包含 5 份种质，都同属轮生叶系，且 1 号和 2 号种质同源于山东省，14 号和 19 号种质来

源于安徽省。这与聚类结果相符合，表现为地理分布相同或具有相同特征的种质倾向聚在一起。

使用 GenALEX v6.1 程序进行 PCoA 主坐标分析，得到种群之间的遗传关系，种质之间距离越近则亲缘关系越近。可视化 23 份种质之间的关联主坐标分析结果表明(图 4)，23 个种群解释了总变异的 24.99% (轴 1-13.73%，轴 2-11.26%)，大多数种质都在上象限观测到。地理位置较近的种质大多聚集在一起。PCoA 主坐标分析的结果与聚类分析和遗传结构图显示的结果相似，即地理位置相近的种质距离越近，亲缘关系越近。

3.2.2 基于 SRAP 的遗传多样性分析 根据遗传相似系数和遗传距离数据，当遗传相似系数为 0.432 时，23 份黄精属种质被划分为 4 个簇(图 5)。I 簇将来自山东省的种质聚集成簇，包含来自山东泰安的 1 号种质、山东日照的 2 号种质和山东烟台的 3 号种质，其中同属黄精种质的 1 号和 2 号种质被

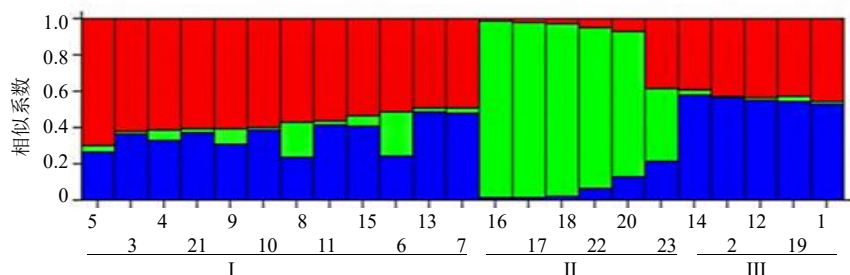


图 3 23 份黄精种质的 CDDP-PCR 群体遗传结构图

Fig. 3 Genetic structure of populations of 23 *Polygonatum* germplasm materials

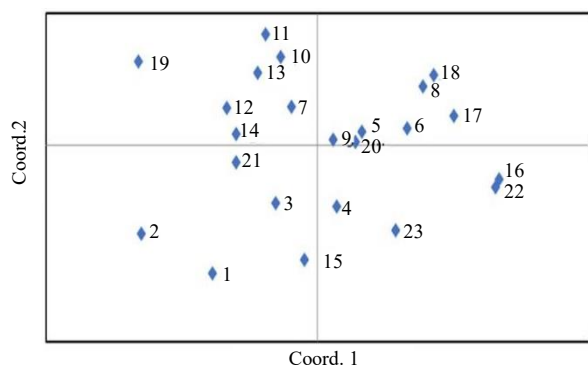


图 4 基于 CDDP 数据对 23 份黄精属 PCoA 图
Fig. 4 PCoA based on CDDP molecular marker

聚集在一起形成一个分支 (I-1); II 簇包含绝大多数来自安徽省的黄精属种质, 其中 a 分支中 6 号和 16 号种质亲缘关系相对最近, 遗传相似系数值为 0.667; 同属湖北黄精的 7 号、14 号和 19 号种质被划分到 III 簇中的 III-2 分支; IV 簇中仅包含 13 号的小玉竹种质, 此种质与其他种质遗传关系相对较远, 可能具有特殊的遗传背景或在发育过程中产生遗传变异。从以上聚类结果中可以看出, 该聚类结果能较好地地区分基原植物, 与种的分类较为一致。

基于 SRAP-PCR 的结果, 利用 Structure 绘制 23 份黄精的遗传结构图, 发现 3 份黄精种质分为 8 个类群最优。8 个亚群分别以蓝色、橙色、棕色、

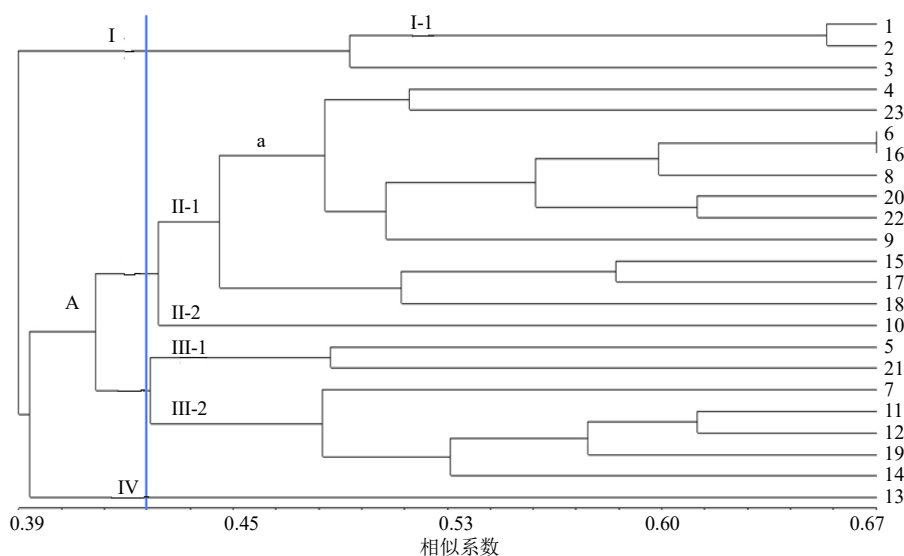


图 5 基于 SRAP 数据的 23 份黄精属种质聚类图
Fig. 5 Cluster diagram of 23 *Polygonatum* germplasm materials based on SRAP data

黄色、红色、紫色、绿色和蓝绿色表示 (图 6)。单一颜色的类群表明种质的基因纯正, 8 个亚群都是混合亚群, 说明种质间存在不同程度的基因交流或迁移。23 号和 13 号种质都单独形成一个亚群, 前者属于多花黄精种质, 后者属于小玉竹种质, 说明这 2 份种质与其他种质遗传关系相对较远; 亚群 IV 包含 12、19、11、14、7 号种质, 它们都是轮生叶系; 亚群 VII 中所有种质均属于多花黄精种质; 亚群 VIII 中的 1、2、3 号种质都来源山东。群体遗传结构与聚类结果所划分的类群结果较一致, 同源同种或特征相同的种质倾向聚在一起。

基于 SRAP-PCR 结果, 对 23 份种质进行 PCoA 主坐标分析 (图 7)。23 个种群解释了总变异的 27.70% (轴 1-16.07%, 轴 2-11.63%), 大多数种质

都在左象限观测到。来自山东的 1、2 号聚集在右下象限, 左下象限聚集绝大多数来自安徽省的多花黄精种质。结果表明地理位置较近的种质大多聚集在一起。同属轮生叶系的 7、19、12、11、14、1 和 2 号种质聚集在右象限。PCoA 主坐标分析阐明的结果发现形态学特征相似的种质距离越近, 与聚类结果和遗传结构图获得的结果近似。

3.2.3 基于 SCoT 的遗传多样性分析 根据遗传相似系数和遗传距离数据, 当遗传相似系数为 0.452 时, 23 份黄精属种质被划分为 4 个簇 (图 8)。I 簇中 I-1 分支把来自山东泰安 (1 号种质) 和山东日照 (2 号种质) 的黄精聚集在一起, 另外一个分支包含来自福建的多花黄精 (5 号种质) 和来自安徽的湖北黄精 (14 号种质); II 簇中, II-1 分支包含山东

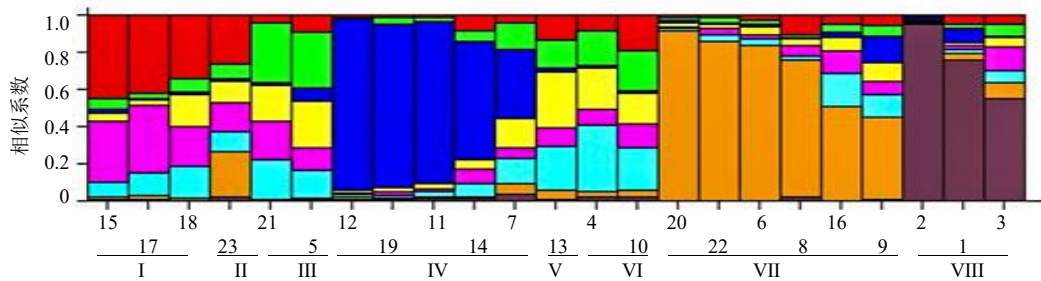


图 6 23 份黄精种质的 SRAP-PCR 群体遗传结构图

Fig. 6 Genetic structure of populations of 23 *Polygonatum* germplasm materials

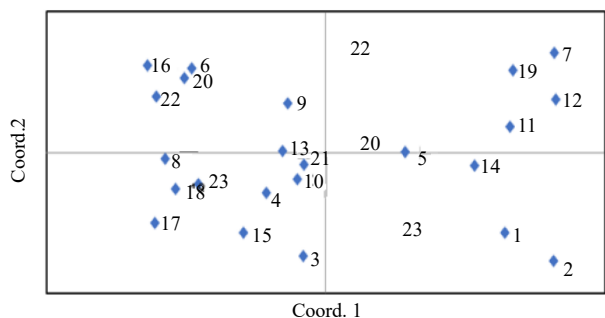


图 7 基于 SRAP 数据对 23 份黄精属 PCoA 图

Fig. 7 PCoA based on SRAP molecular marker

烟台的玉竹 (3 号种质)、福建的多花黄精 (4 号种质)、广西的多花黄精 (6 号种质); 而 4 号种质和 6 号种质与 3 号种质形成一个群组 a。来自湖南的 2 份种质 7 号和 8 号聚集在一起, 形成一个紧凑的群组。b 分支包含同属吉林省的 12 号种质和 13 号种质, 2 份种质亲缘关系相对较近; III 簇中, 来自云南省的滇黄精 (11 号种质) 与其他种质遗传关系较远, 单独形成一支, 可能因其具有特殊的遗传背景, 形成种间差异。而 III 簇中剩余种质均来自安徽省; IV 簇中包含 2 份同属安徽省的多花黄精 17 号和 18

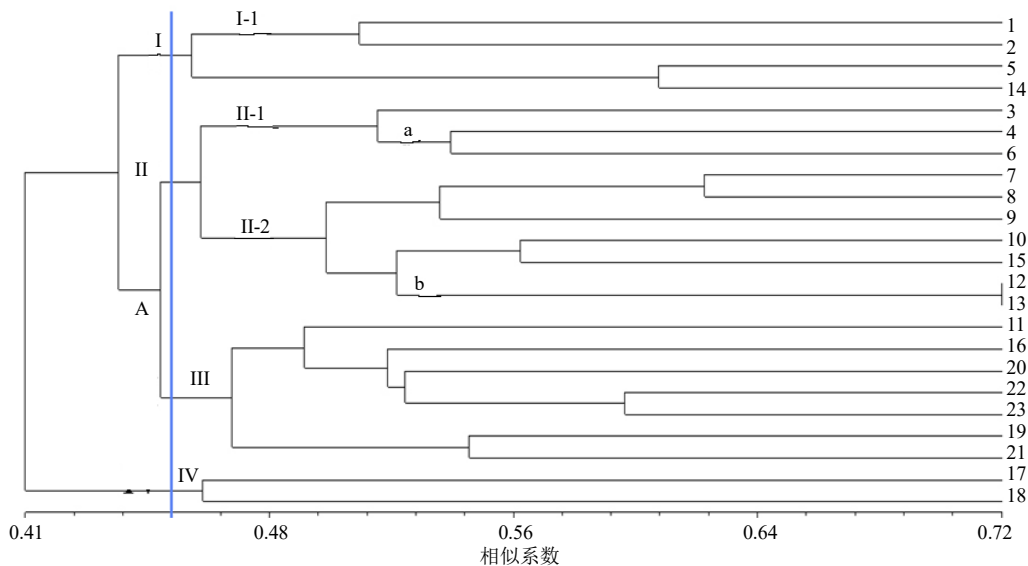


图 8 基于 SCoT 数据的 23 份黄精属种质聚类图

Fig. 8 Cluster diagram of 23 *Polygonatum* germplasm materials based on SCoT data

号种质。从以上聚类分析中可以看出, 该聚类结果与种质的地理分布呈现出一定程度吻合。通过 SCoT 分子, 标记利用 Structure 绘制 23 份黄精的遗传结构图 (图 9), 产生 8 个可能的亚群 (红、绿、蓝、棕黄、紫、蓝绿、棕色、黄颜色)。这与 SRAP 分子标记得到的亚群数量一致。单一颜色的

类群表明种质的基因纯正, 8 个亚群都是混合亚群, 说明黄精种质间遗传多样性较高, 存在不同程度的基因交流。亚群 I 仅包含来自安徽省的多花黄精种质, 含有 8 份种质; 亚群 II 将来自湖南省的种质聚集在一起; 亚群 IV 将来自山东省的 1、2、3 号种质聚集成群; 亚群 V 中的 12 和 13 号种质都来源于吉林省,

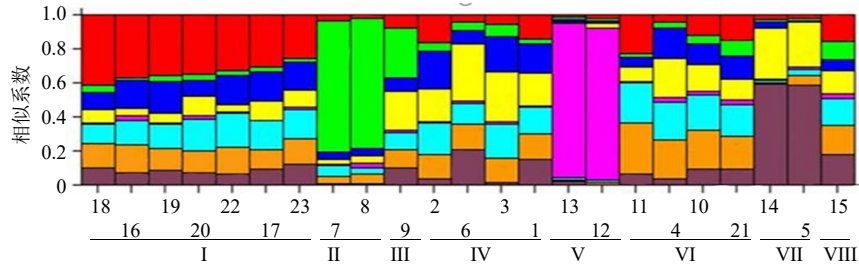


图 9 23 份黄精种质的 SCoT-PCR 群体遗传结构图

Fig. 9 Genetic structure of populations of 23 *Polygonatum* germplasm materials

与聚类结果高度一致。

通过 SCoT-PCR 结果对 23 份黄精属种质进行 PCoA 主坐标分析 (图 10)。23 个种群解释了总变异的 24.73% (轴 1-12.88%, 轴 2-11.85%) 推断不同的地理区域可能存在遗传背景差异。在右上象限同属吉林省的 12 号和 13 号种质距离较近; 左上象

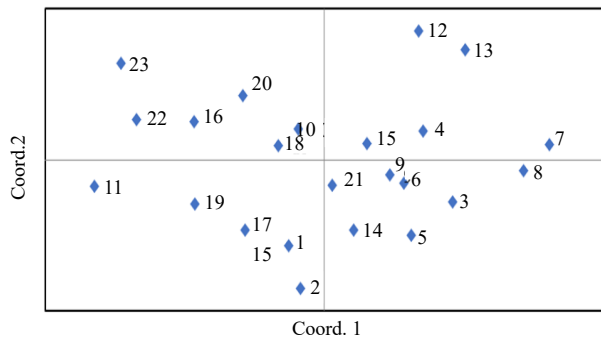


图 10 基于 SCoT 数据对 23 份黄精属 PCoA 图

Fig. 10 PCoA of 23 *Polygonatum* germplasm materials

based on SCoT molecular marker

限则聚集据大部分来自安徽省的多花黄精聚集在左上象限; 绝大多数轮生叶系则是聚集在左下象限, 且同属山东省的 1 号和 2 号黄精种质距离较近。PCoA 主坐标分析阐明的结果表明, 部分地理分布相近的种质距离相近, 与上述聚类分析和遗传结构图结果呈现呼应。

3.2.4 基于 CDDP+SRAP+SCoT 的遗传多样性分析 根据 CDDP+SRAP+SCoT 标记技术对 23 份黄精属种质遗传相似系数和遗传距离的混合数据分析, 当遗传相似系数为 0.448 时, 23 份黄精属种质被划分为 5 个簇 (图 11)。I 簇中包含山东省和安徽省的种质, 其中 I-1 分支将同属黄精的种质聚集在一起, 且 2 份种质都来自山东省; II 簇中仅包含来自安徽省的多花黄精种质 (15 号), III 簇中包含绝大多数的多花黄精种质, 其中 III-1 分支聚集福建省 (4 号和 5 号) 和广西省 (6 号) 和湖南省 (8 号)

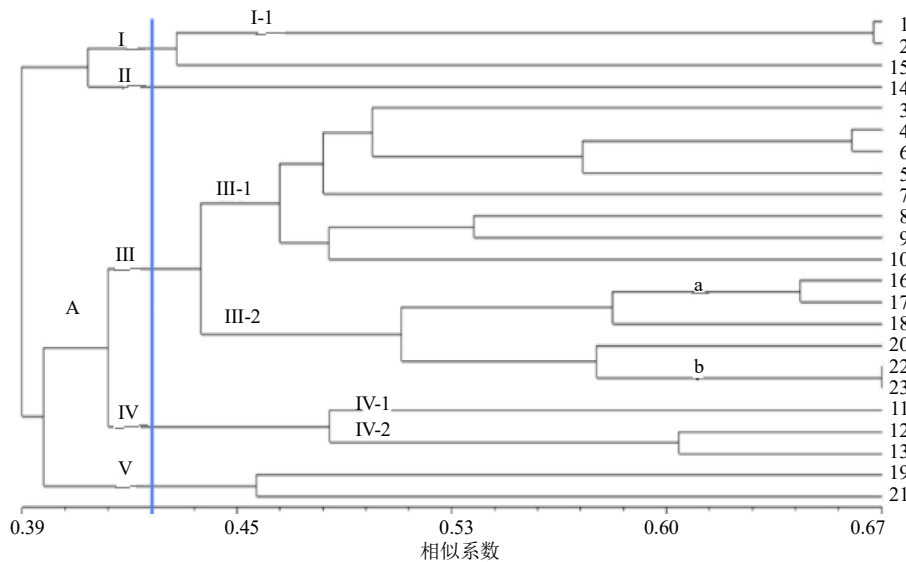


图 11 基于 CDDP+SRAP+SCoT 数据的 23 份黄精属种质聚类图

Fig. 11 Cluster diagram of 23 *Polygonatum* germplasm materials based on CDDP + SRAP + SCoT data

和江西省（9 号）和重庆市（10 号）的多花黄精种质，III-2 分支将大多数安徽省的多花黄精种质聚集在一起。其中 a 分支的 16 号和 17 号 2 份来自安徽省青阳县的多花黄精种质聚在一起。b 分支的 22 号和 23 号种质，其遗传相似系数最大，遗传相似系数值是 0.5793，遗传关系紧密；IV 簇中 IV-1 分支仅包含滇黄精种质，可能具备特殊的遗传背景或在发育过程中产生遗传变异，导致与其它种质产生较大遗传差异。IV-2 分支将同属吉林省的种质聚集在一起；V 簇包含来自安徽省的 19 号和 21 号种质。从以上聚类结果中可以看出，该聚类结果能较好地地区分不同基原植物，而且呈现一定地理分布规律。

通过 CDDP+SRAP+SCoT 分子标记产生 5 个可能的亚群（红、绿、蓝、黄和紫颜色）（图 12）。亚群 I 包含的 12、11、19、14 号种质同属轮生叶系，其中 12 号和 13 号种质同源于吉林省；亚群 II 包含的种质包括 16、17、18、20、22、23 号，它们都属于多花黄精，且同源于安徽省，该类群颜色单一，表明种质的基因纯正，其中 16 号和 17 号种质都同源于安徽省池州市青阳县；亚群 III 将来自湖南省的 7 号和 8 号种质聚集在一起；亚群 IV 将来自山东省的 1 号和 2 号种质聚集成群，它们都同属黄精种质；亚群 V 中的 4 号和 10 号种质都同属多花黄精，分别来自福建和重庆。该种群结构结果与聚类分析结果高度一致。

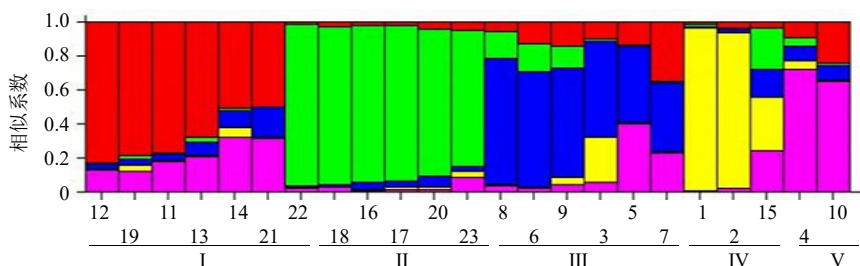


图 12 23 份黄精种质的 CDDP+SRAP+SCoT-PCR 群体遗传结构图

Fig. 12 Genetic structure of populations of 23 *Polygonatum* germplasm base on CDDP + SRAP + SCoT

基于 CDDP + SRAP + SCoT 分子标记进行 PCoA 主坐标分析（图 13），可视化 23 份种质之间的关联主坐标分析。而对 23 份种质解释了总变异的 20.81%（轴 1-11.9%，轴 2-8.91%），表明不同的地理区域存在一定程度遗传差异。右上象限将绝大多数轮生叶系种质聚集在一起；左上象限则是将大部分源于安徽省的多花黄精聚集在一起；右下象限则是将源于山东省的种聚集在一起。PCoA 主坐标分析阐明的结果表明，相同基源的种质距离较近，

且地理分布相似的种质距离也越近，这与聚类分析和遗传结构图结果呈现出的能区分不同基原植物，而且呈现一定地理分布规律结论一致。

3.3 不同标记的比较

3.3.1 CDDP、SRAP 和 SCoT 标记的比较分析 对 23 份黄精属种质 CDDP、SRAP 和 SCoT 的标记效率进行分析（表 3），11 条 CDDP 引物总共扩增出 244 条条带，多态性条带 240 条，平均每条引物扩增出 22.18 条条带，多态性比率（PPB）99.36%。在 10 组 SRAP 标记引物组合中，总共扩增出 151 条条带，多态性条带 150 条，平均每组引物可扩增出 15.1

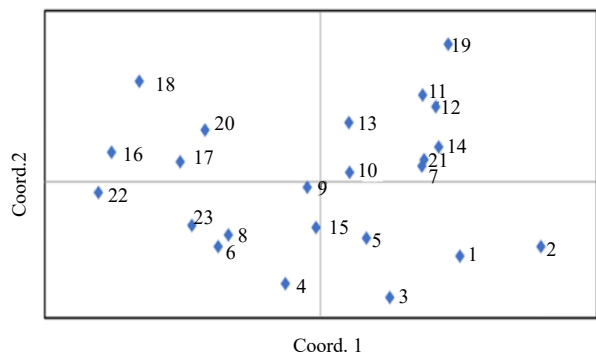


图 13 基于 CDDP+SRAP+SCoT 数据对 23 份黄精属主坐标分析图

Fig. 13 PCoA of 23 *Polygonatum* germplasm based on CDDP + SRAP + SCoT molecular marker

表 3 23 份黄精属种质 CDDP、SRAP 和 SCoT 标记效率分析

Table 3 Efficiency analysis of CDDP, SRAP, and SCoT markers in 23 *Polygonatum* germplasm materials

| 项目 | CDDP | SRAP | SCoT |
|-------|-------|-------|-------|
| 引物数 | 11 | 10 | 10 |
| 总位点数 | 244 | 151 | 171 |
| 多态位点数 | 240 | 150 | 169 |
| 平均位点数 | 22.18 | 15.10 | 17.10 |
| PPB/% | 98.36 | 99.34 | 98.25 |

条条带,多态性比率为 99.34%。10 条 SCoT 引物总共扩增出 171 条条带,多态性条带 169 条,平均每条引物扩增出 17.1 条条带,多态性比率为 98.25%。对 23 份黄精属种质的不同分子标记遗传相似系数进行比较(表 4)。CDDP 的遗传相似系数值在 0.269~0.649,

SRAP 的遗传相似系数值在 0.238~0.667, SCoT 的遗传相似系数值在 0.308~0.719, CDDP+SRAP+SCoT 的遗传相似系数值在 0.319~0.579。可见这几种分子标记能检测到的遗传变异差别不大,但 SCoT 分子标记能检测到较多的遗传变异。

表 4 不同分子标记对 23 份黄精属种质遗传相似系数比较

Table 4 Comparison of genetic similarity coefficient of 23 *Polygonatum* germplasm materials with different

| 分子标记方法 | 相似系数 | | | 变异系数/% |
|----------------|-------------|-------|-------|--------|
| | 范围 | 总平均数 | 标准差 | |
| CDDP | 0.269~0.649 | 0.452 | 0.066 | 14.60 |
| SRAP | 0.238~0.667 | 0.432 | 0.074 | 17.13 |
| SCoT | 0.308~0.719 | 0.453 | 0.060 | 13.25 |
| CDDP+SRAP+SCoT | 0.319~0.579 | 0.449 | 0.044 | 9.80 |

不同分子标记方式对黄精属植物遗传多样性分析结果显示(表 5), SRAP 较其他分子标记方式检测到的等位基因 (N_a) 数值较高,达到 1.993 4; CDDP 分子标记检测到有效等位基因 (N_e) 数值最大,达到 1.697 7; Nei's 遗传多样性指数 (H) 最大的是 CDDP 分子标记,为 0.394 2; Shann 信息指数 (I) 最大的是 CDDP 分子标记方式,为 0.575 6。不同分子标记方式检测到黄精属种质遗传多样性排名为 CDDP>

CDDP+SRAP+SCoT>SCoT>SRAP。

3.3.2 形态学标记和分子标记的相关性分析 基于形态学数据产生的平方欧式距离矩阵和分子遗传距离矩阵的相关系数的 Pearson 检验的结果见表 6。结果表明在 CDDP 分子标记与 SRAP、SCoT、CDDP+SRAP+SCoT 之间均存在极显著相关,但与形态学之间无显著相关,这与上述聚类结果一致,即 CDDP 主要反映地理分布差异,而无法反映形态学差异。SRAP 分子标记与 CDDP、SCoT、CDDP+SRAP+SCoT 以及形态学之间均为极显著正相关,说明 SRAP 能反映形态学差异,这与上述聚类结果一致。而 SCoT 与 CDDP、SRAP、CDDP+SRAP+SCoT 具有极显著正相关,与形态学存在显著相关性,说明 SCoT 能一定程度反映形态学差异;即除了 CDDP 分子标记,其他分子标记都在一定程度上反映了形态学差异。

表 5 23 份黄精属分子标记的多样性比较

Table 5 Comparison of molecular marker diversity among 23 *Polygonatum* germplasm materials

| 分子标记 | N_a | N_e | H | I |
|----------------|---------|---------|---------|---------|
| CDDP | 1.983 6 | 1.697 7 | 0.394 2 | 0.575 6 |
| SRAP | 1.993 4 | 1.543 7 | 0.329 6 | 0.501 9 |
| SCoT | 1.982 5 | 1.631 5 | 0.366 5 | 0.543 4 |
| CDDP+SRAP+SCoT | 1.987 6 | 1.647 8 | 0.373 0 | 0.551 2 |

表 6 形态学和分子标记相关系数

Table 6 Correlation coefficient of molecular markers and morphological markers

| 方法 | 相关系数 | | | | |
|----------------|---------|---------|---------|---------------|-------|
| | CDDP | SRAP | SCoT | CDD+SRAP+SCoT | 形态学 |
| CDDP | 1.000 | | | | |
| SRAP | 0.875** | 1.000 | | | |
| SCoT | 0.922** | 0.836** | 1.000 | | |
| CDDP+SRAP+SCoT | 0.962** | 0.940** | 0.940** | 1.000 | |
| 形态学 | 0.356 | 0.605** | 0.431* | 0.443* | 1.000 |

*表示在 0.05 水平相关性显著; **表示在 0.01 水平相关性极显著。

* indicates significant correlation at 0.05; ** indicates significant correlation at 0.01.

4 讨论

本研究首次采用形态学标记和 3 种分子标记的方法对黄精属种质进行了遗传多样性的研究。利用形态学标记对 23 份供试材料进行聚类分析,发现黄精属种质因叶片着生点位置被分为 2 个类群, A 类群为轮生叶系,其叶片为线状披针形,轮生,叶先端拳卷,叶片数较多; B 类群为互生叶系,其叶片为披针形或椭圆形,互生,叶先端渐尖。不同区间黄精属种质的形态性状存在较大的差异,且同一种源的不同居群间也存在差异,黄精属种质互生叶系与轮生叶系之间的某些形态性状有差异减少的倾向。而不同分子标记系统(CDDP、SRAP、SCoT、CDDP+SRAP+SCoT)产生的聚类结果中可以看出,一部分具有亲缘关系的同种及形态学、生物学特征相近的黄精属种质资源聚在一起,表明分子聚类分析结果与其生物学特征相符,如所有分子标记都能较好的将同属黄精种质的 1 号和 2 号与其它种质区分开。但聚类结果与实际情况仍存在一定偏差,是由于黄精属下种的界限相对模糊,互生叶系与轮生叶系的某些植物存在差异减小的现象。

基于形态学数据产生的平方欧式距离矩阵和分子遗传距离矩阵的相关系数的 Pearson 检验可知,形态学标记和 SRAP 分子标记存在极显著相关,与 SCoT、CDDP+SRAP+SCoT 分子标记之间存在显著相关,而与 CDDP 分子标记无显著相关。从形态学标记和分子标记所获得的聚类结果来看,存在一定的相似性,也有一定差异存在。分子数据和形态学数据之间的差异已经被一些研究学者所报道,这在大豆^[16]、玉米^[17]、大麦^[18]、棉花^[19]等植物上也曾出现过类似情况。形态性状虽是基因表达的结果,但基因的表达受到了众多因素的综合调控,导致基因与其表达产物之间并不完全是线性关系^[20]。故而分子数据与形态学数据间存在一定程度的差异。

黄精属种质变异幅度大,常有种间杂交现象,除了出现种间的交叉现象外,还可以看出黄精属种质在地理分布上的交叉,可见黄精属种质的过渡种多种多样。因此采用多种不同分子标记技术进行结合分析黄精属种质更能较全面反映其遗传多样性,这对该属植物种质资源保护、遗传多样性分析和分子标记辅助育种等研究提供理论依据具有重要意义。

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: 23.
- [2] Wang J J, Yang Y P, Sun H, *et al.* The biogeographic south-north divide of *Polygonatum* (asparagaceae tribe polygonateae) within eastern Asia and its recent dispersals in the Northern Hemisphere [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166134.
- [3] 籍蓉蓉. 安徽省多花黄精的遗传多样性及分布格局研究 [D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2020.
- [4] Xia M Q, Liu Y, Liu J J, *et al.* Out of the Himalaya-Hengduan Mountains: Phylogenomics, biogeography and diversification of *Polygonatum* Mill. (Asparagaceae) in the Northern Hemisphere [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2022, 169: 107431.
- [5] Collard B C Y, MacKill D J. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2009, 27(4): 558-562.
- [6] 陈星, 高子厚. DNA 分子标记技术的研究与应用 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(6): 1970-1977.
- [7] Haffar S, Baraket G, Usai G, *et al.* Conserved DNA-derived polymorphism as a useful molecular marker to explore genetic diversity and relationships of wild and cultivated Tunisian figs (*Ficus carica* L.) [J]. *Trees*, 2022, 36(2): 723-735.
- [8] 罗莎, 李冰洁, 付雅琪, 等. 基于表型聚类 and CDDP 标记的牡丹花瓣色斑遗传多样性分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2024, 52(5): 110-123.
- [9] 潘若, 魏云华, 赖恭梯, 等. 基于表型与 CDDP 分子标记的山茶花遗传多样性及关联分析 [J]. *分子植物育种*, 2023, 11: 1-25.
- [10] Liu H Y, Zang F Q, Wu Q C, *et al.* Genetic diversity and population structure of the endangered plant *Salix taishanensis* based on CDDP markers [J]. *Glob Ecol Conserv*, 2020, 24: e01242.
- [11] 周武先, 段媛媛, 卢超, 等. 基于 CDDP 标记的重楼属种质资源鉴定及遗传多样性分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(20): 5033-5039.
- [12] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2): 455-461.
- [13] 姜武, 吴志刚, 陶正明, 等. 基于 ISSR 和 SRAP 标记的栀子种质遗传多样性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(2): 510-516.

- [14] Collard B C Y, MacKill D J. Start *Codon* targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2009, 27(1): 86-93.
- [15] Doyle J. Isolation of Plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1990, 12(1): 56.
- [16] Niharika S, Nath R S, Nacy A A, *et al.* Characterization of soybean genotypes based on morphological and molecular markers [J]. *Electronic J Plant Breeding*, 2022, 13(1): 182-192.
- [17] Thakur N, Prakash J, Thakur K, *et al.* Genetic diversity and structure of maize accessions of north western Himalayas based on morphological and molecular markers [J]. *Proc Natl Acad Sci Ind Sect B Biol Sci*, 2017, 87(4): 1385-1398.
- [18] Ahmad A A, Attya A M, Harb A H, *et al.* Genetic variation of barley genotypes using morphological, yield components and molecular markers [J]. *J Glob Agric Ecol*, 2021, 34: 29-39.
- [19] 王业举, 张虎, 张博, 等. 235 份陆地棉表型性状遗传多样性分析 [J]. *江苏农业学报*, 2023, 39(3): 636-644.
- [20] 马道承, 王凌晖, 梁机. 形态标记在植物中的应用研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(8): 55-62.

[责任编辑 时圣明]