

• 药材与资源 •

基于 SCoT 分子标记的黄精属不同种质遗传多样性研究

朱 珏¹, 石雨荷¹, 侯超文¹, 李晓玲¹, 刘泽湘¹, 龚秀娟¹, 刘湘丹^{1,2}, 童巧珍^{1,2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中药材产业技术体系质量安全岗, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 探讨黄精属 *Polygonatum* Mill. 6 个产区 3 个种质的遗传多样性及亲缘关系。方法 以 34 份黄精属种质资源为供试材料, 采用正交设计方法, 优化黄精属目标起始密码子多态性-PCR (start codon targeted polymorphism-PCR, SCoT-PCR) 反应体系并筛选引物; 并基于筛选出的引物对其进行遗传多样性分析、遗传结构以及遗传分化研究。结果 得到黄精属 SCoT-PCR 最佳反应体系, 筛选出 15 条多态性较好的引物, 多态性条带比率为 94.45%; 在物种水平上, 3 个种质的平均观测等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、平均有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、平均 Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity index, H)、平均香农指数 (Shannon information index, I) 分别为 1.678 3、1.268 6、0.174 0、0.278 6, 揭示群体间存在丰富的遗传多样性; 聚类分析结果显示, 多花黄精与长梗黄精聚成一类, 表明亲缘关系较近; 卷叶黄精作为单独分支, 其与另外 2 个种质的亲缘关系也较远; 基因多样性 (total genetic diversity, H_t)、基因分化系数 (gene diversity within population, H_s)、遗传分化系数 (coefficient of gene differentiation, G_{st})、基因流 (gene flow, N_m) 分别为 0.210 4、0.174 0、0.173 3、2.386 0, 表明群体间存在较高水平的基因交流, AMOVA 结果显示 84% 遗传差异来自于群体内, 16% 遗传差异来自于群体间; 群体结构分析表明, 当分析群体数 (true number of clusters, K) 为 3 时, 34 份材料可分为 3 个类群, 且与聚类分析结果基本一致。结论 SCoT 分子标记可有效用于黄精属不同种质之间的亲缘关系及遗传多样性分析, 为黄精属植物种质资源的鉴定保护、开发利用提供科学依据。

关键词: 黄精属; SCoT 标记; 遗传多样性; 亲缘关系; 群体结构

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)03-0966-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.021

Genetic diversity of three germplasms of *Polygonatum* based on SCoT molecular markersZHU Yue¹, SHI Yuhe¹, HOU Chaowen¹, LI Xiaoling¹, LIU Zexiang¹, GONG Xiujuan¹, LIU Xiangdan^{1,2}, TONG Qiaozhen^{1,2}

1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Quality and safety posts of Hunan Traditional Chinese medicine industry technology system, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To explore the genetic diversity and phylogenetic relationship of three germplasms of *Polygonatum* from six regions in Hunan Province. **Methods** The SCoT-PCR reaction system was optimized and primers were screened by orthogonal design using 34 germplasm resources of *Polygonatum*. The genetic diversity, genetic structure and genetic differentiation were analyzed based on the selected primers. **Results** The optimal SCoT-PCR reaction system was obtained, and 15 primers with good polymorphism were selected, and the polymorphism band ratio was 94.45%. At the species level, the average observed allele number (N_a), average effective allele number (N_e), average Nei's gene diversity index (H) and average Shannon index (I) of the three germplasms were 1.678 3, 1.268 6, 0.174 0 and 0.278 6, respectively; The results of cluster analysis showed that polyflorin and polyflorin were clustered into one class, indicating that they were closely related. As a single branch, it is far related to the other two germplasm. total genetic diversity (H_t), gene diversity within population (H_s), coefficient of gene differentiation (G_{st}) and gene flow (N_m) were 0.210 4, 0.174 0, 0.173 3 and 2.386 0, respectively, indicating a high level of gene exchange among populations. The results of AMOVA showed that 84% of the genetic

收稿日期: 2024-09-05

基金项目: 国家中药材产业技术体系食用百合龙山综合试验站 (CARS-21); 湖南省科技厅创新平台与人才计划 (2023NK4141); 湖南中医药大学重点学科中药学科项目 (校行发规字[2023]2 号); 湖南省科技创新计划资助 (2024RC8303)**作者简介:** 朱 珏 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与品质评价。E-mail: 1217965441@qq.com***通信作者:** 童巧珍, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源与品质评价。E-mail: 410849649@qq.com

differences were within the population and 16% were between the populations. The analysis of population structure showed that 34 materials could be divided into three groups when the true number of clusters (K) was 3, which was basically consistent with the result of cluster analysis. **Conclusion** SCoT molecular markers can be used to analyze the genetic diversity and genetic relationships among different germplasms, and provide a scientific basis for the identification, protection, development and utilization of germplasms.

Key words: *Polygonatum* Mill.; SCoT marker; genetic polymorphism; genetic relationship; group structure

黄精为百合科 (Liliaceae) 黄精属 *Polygonatum* Mill. 多年生草本植物, 可补肾填精、补气调和、强健骨骼、齿落更生、延缓衰老, 因其延年益寿之功效而备受古人推崇, 被誉为“仙人余粮”“太阳草”^[1-3]。黄精除了作为临床配方, 在食品领域中也有广泛应用, 比如富含黄精多糖的酸豆奶、茶饮等, 且在天然化妆品市场也有潜在应用前景^[4-5]。基于传统分类法下的黄精属种间特征差异较小, 导致种间杂交现象较为普遍, 而黄精种质资源的准确鉴定是确定药用基原、保障临床用药、探寻药用替代品等研究工作的基础^[6-7]。分子标记是继形态鉴定、显微鉴定和理化鉴定之后较为可靠的分类与鉴定手段。2009 年 Collard 和 Mickill 首次提出目标起始密码子多态性-PCR (start codon targeted polymorphism-PCR, SCoT-PCR) 目标起始密码子多态性分子标记, 它是一种简单、新颖、快速且具有成本效益、高度多态性和可重复性的分子标记物, 不需要事先的序列信息^[8]。近年来, SCoT 标记被广泛用于鹅观草^[9]、丹参^[10]、地黄^[11]、射干^[12]等植物资源的遗传多样性分析、遗传距离及遗传分化研究。因黄精属植物喜阴、耐寒、怕干旱等特性, 更适合生长于湿润荫蔽的环境, 湖南省地处云贵高原

向江南丘陵和南岭山脉向江汉平原过渡的地带, 属于亚热带季风湿润气候, 优越的自然条件造就了丰富黄精属植物资源, 主要包含多花黄精、长梗黄精、卷叶黄精等^[13-14]。

近年来国内外学者对黄精属植物的研究多集中于系统分类、化学成分以及药用价值等方面, 缺乏遗传学方面的深入研究, 因此将 SCoT 分子标记技术应用于黄精种质资源遗传多样性分析及品种的鉴定具有重要意义。本研究基于正交设计优化后的黄精 SCoT-PCR 扩增体系来筛选多态性较好的 SCoT 引物, 对湖南省不同分布区域内多花黄精、卷叶黄精、长梗黄精 3 个种群 34 份黄精属种质资源的遗传多样性及亲缘关系进行探讨, 为黄精属植物的分子鉴定、种质资源保护与开发利用提供参考。

1 材料与试剂、仪器

1.1 材料

本研究采集的 34 份黄精属样本信息见表 1。每份采集 4~5 片嫩叶, 将叶片放入取样袋, 统一置于 -80 °C 冰箱保存备用。材料由湖南中医药大学王智副教授鉴定为多花黄精 *P. cyrtoneuma* Hua、卷叶黄精 *P. cirrhifolium* (Wall.) Royle 或长梗黄精 *P. filipes* Merr. ex C. Jeffrey & McEwan。

表 1 供试黄精属材料及其来源

Table 1 Materials and sources of *Polygonatum* for testing

编号	种群	种名	来源	采样时间	编号	种群	种名	来源	采样时间
1	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22	18	DH	多花黄精	安化樟楠湾	2022-06-07
2	JY	卷叶黄精	岳阳平江县	2022-06-04	19	DH	多花黄精	浏阳大围山	2022-06-19
3	JY	卷叶黄精	永州宁远县	2022-06-22	20	CG	长梗黄精	永州宁远县	2022-06-22
4	CG	长梗黄精	安化樟楠湾	2022-06-07	21	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22
5	JY	卷叶黄精	安化樟楠湾	2022-06-27	22	JY	卷叶黄精	永州宁远县	2022-06-22
6	CG	长梗黄精	永州宁远县	2022-06-22	23	JY	卷叶黄精	安化樟楠湾	2022-06-07
7	JY	卷叶黄精	安化樟楠湾	2022-06-27	24	CG	长梗黄精	永州宁远县	2022-06-22
8	CG	长梗黄精	永州宁远县	2022-06-22	25	DH	多花黄精	安化樟楠湾	2022-06-07
9	CG	长梗黄精	永州宁远县	2022-06-22	26	DH	多花黄精	浏阳大围山	2022-06-19
10	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22	27	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22
11	DH	多花黄精	岳阳平江县	2022-06-22	28	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22
12	DH	多花黄精	常德鼎城区	2022-06-10	29	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22
13	DH	多花黄精	岳阳平江县	2022-06-04	30	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22
14	JY	卷叶黄精	安化樟楠湾	2022-06-27	31	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22
15	DH	多花黄精	岳阳平江县	2022-06-22	32	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22
16	DH	多花黄精	常德市鼎城区	2022-06-10	33	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22
17	DH	多花黄精	长沙市芙蓉区	2022-06-19	34	DH	多花黄精	永州宁远县	2022-06-22

1.2 试剂与仪器

高效植物基因组 DNA 提取试剂盒、 $6\times$ DNA 上样缓冲液、Taq DNA 聚合酶、 $10\times$ Taq Buffer、dNTPs、RNase、Loading Buffer (天根生化科技有限公司); 高纯度琼脂糖 (莫纳生物科技有限公司); TS-GelRed 核酸凝胶染料 (北京擎科生物科技有限公司); DM2000 DNA Marker (康为世纪生物科技有限公司); 乙二胺四乙酸、三羟甲基氨基甲烷 (赛国生物科技有限公司); 其余为国产分析纯试剂; 参考 Collard 等^[8]提供的 92 条 SCoT 引物 (SCOT1~SCOT92), 序列由上海生工生物工程有限公司合成。Sorvall ST8R 型高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司); JY04S-3C 型凝胶成像系统、JY-SPCT 型电泳槽、JY600 型电泳仪、JY-96G 型基因扩增仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); Nano-200 型微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司); QL-866 型旋涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 DNA 提取与检测

采用北京天根生物科技有限公司的全能型高效植物 DNA 提取试剂盒提取黄精叶片基因组 DNA, 具体步骤见说明书, 提取 DNA 完毕后用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并用微量分光光度计检测 DNA 的纯度与浓度, 检测合格后均稀释至 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$, 储藏在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱里备用。

2.2 SCoT-PCR 反应体系的正交试验设计

按照正交设计分别对反应体系中 $10\times$ Taq buffer ($2.5\text{ U}/\mu\text{L}$)、dNTPs (2.5 mmol/L)、Taq 聚合酶 ($2.5\text{ U}/\mu\text{L}$)、引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 和 DNA 用量 ($10\text{ ng}/\mu\text{L}$) 进行优化, ddH₂O 补足至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。每个因素设计 4 个水平, 共计 25 个处理, 通过初步筛选后选用 16 个处理进行打分, 每个处理重复 3 次。正交试验设计见表 2。

2.3 SCoT 引物筛选与 PCR 扩增

基于优化获得反应体系, 以黄精属 3 个种质为 DNA 模板对退火优化后的 92 条引物进行多态性筛选, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 从中筛选出适用于黄精的 SCoT 引物。PCR 扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $55.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min ; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取 $6\text{ }\mu\text{L}$ PCR 扩增产物以 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果用凝胶成像系统

检测和拍照保存。

2.4 数据分析

对于 SCoT 分子标记, 采用人工读带的方法统计筛选所得 15 条引物的 SCoT-PCR 产物, 将电泳图谱中可重复的、清晰的条带 (包括弱带) 记为 “1”, 同一位置无带或不易分辨的弱带记为 “0”, 建立 SCoT 标记的 0/1 矩阵。利用 POPGENE 32.0 软件分析计算各居群的多态性位点数目 (A)、多态性位点百分比 (percentage of polymorphic band, PPB), 观测等位基因数 (observed 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 (Nei's gene diversity index, H) 和香农指数 (Shannon information index, I); 居群间的遗传分化系数 (coefficient of gene differentiation, G_{st}) 和基因流 (gene flow, N_m) 来估算; 利用 NTSYSpc-2.10 软件中的 UPGMA 方法对各种群及个体进行聚类分析; 采用 GenAlEx 6.5^[15] 进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA); 通过 Structure 2.2 数据处理软件进行群体遗传结构分析, 设置分析群体数 (true number of clusters, K) 为 2~6, 采用马尔可夫链的蒙特卡洛模拟算法 (markovchain monte carlo, MCMC), 开始时的不作数迭代 (length of burn-in period) 设为 1 万次, 再将不作数迭代后的 MCMC 设为 10 万次, 迭代次数 (number of iterations) 为 6。使用在线工具 Structure Harvester^[16] 对结果进行分析, 获取最佳 K 值。

3 结果与分析

3.1 黄精 SCoT-PCR 扩增体系的建立

通过分析正交设计试验结果可知, 扩增结果因 DNA 模板、dNTPs、引物、 $10\times$ Taq buffer 和 Taq 聚合酶等用量搭配组合的不同而存在明显差异。极差 (R) 大小反映了该因素对反应体系的影响程度, 均值 K_n 大小反映了每个因素各个水平间的差异。由表 2 可知, 5 个因素对 PCR 反应体系的影响由大到小依次为模板 DNA 用量 $> 10\times$ Taq buffer $>$ Taq 聚合酶 $>$ 引物 $>$ dNTPs。根据均值结果显示, DNA 用量列中最大值为 K_4 , 引物列中最大值为 K_3 , $10\times$ Taq buffer 列中最大值为 K_4 , Taq 聚合酶列中最大值为 K_2 , dNTPs 列中最大值为 K_1 , 故得出最佳反应体系为 $3\text{ }\mu\text{L}$ 模板 DNA ($10\text{ ng}/\mu\text{L}$), $1\text{ }\mu\text{L}$ 引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$), $2.6\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ Taq buffer ($2.5\text{ U}/\mu\text{L}$), $0.3\text{ }\mu\text{L}$ Taq DNA 聚合酶 (含 Mg^{2+}) ($2.5\text{ U}/\mu\text{L}$), $1.4\text{ }\mu\text{L}$ dNTPs (2.5 mmol/L)。

表 2 黄精属 SCoT-PCR 反应体系正交设计
Table 2 Orthogonal design in SCoT-PCR reaction system of *Polygonatum*

序号	DNA 用量/ μL	引物/ μL	$10\times$ Taq buffer/ μL	Taq 聚合酶/ μL	dNTPs/ μL	打分
1	1	1	1	1	1	8.35
2	1	2	2	2	2	9.59
3	1	3	3	3	3	10.25
4	1	4	4	4	4	11.56
5	2	1	2	3	4	9.25
6	2	2	1	4	3	10.37
7	2	3	4	1	2	12.24
8	2	4	3	2	1	12.52
9	3	1	3	4	2	11.75
10	3	2	4	3	1	12.75
11	3	3	1	2	4	12.25
12	3	4	2	1	3	11.25
13	4	1	4	2	3	13.14
14	4	2	3	1	4	12.25
15	4	3	2	4	1	11.98
16	4	4	1	3	2	10.75
K_1	9.938	10.623	10.430	11.023	11.400	
K_2	11.095	11.240	10.518	11.875	11.082	
K_3	12.000	11.680	11.692	10.750	11.252	
K_4	12.030	11.520	12.422	11.415	11.328	
R	2.092	1.057	1.992	1.125	0.318	

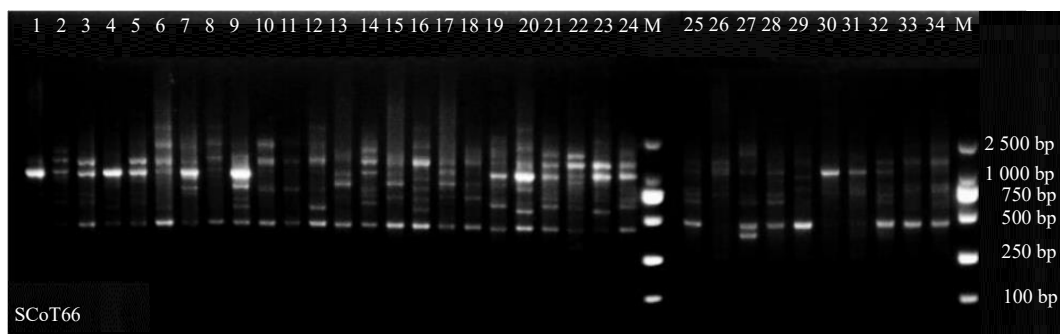
3.2 SCoT 扩增的多态性分析

从表 1 中随机选取 10 份材料对 92 条 SCoT 引物进行 2 次筛选, 最终获得 15 条扩增产物清晰、重复性好且多态性条带相对较高的引物(表 3), 共扩增出 201 个条带(位点), 平均每条引物扩增出 13.4 个位点, 其中多态性位点 13.3 个, 平均多态性位点比率为

94.45%。多态性比率较高, 表明 SCoT 分子标记适用于检测黄精种质的多态性位点, 便于分析黄精种质的遗传多样性。利用筛选出的 15 条引物对 34 份黄精种质 DNA 进行扩增, 扩增的 DNA 片段主要集中在 100~2 000 bp, 其中引物 SCoT-32、引物 SCoT66 对 34 份材料 SCoT-PCR 扩增电泳图见图 1、2。

表 3 SCoT 引物扩增结果
Table 3 Amplification results of SCoT primers

引物	序列 (5'→3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	扩增条带	多态性条带	多态性比率/%
SCoT4	ACGACATGGCGACCATCG	58.6	22	22	100.0
SCoT6	ACCATGGCTACCACCGGC	61.7	15	15	100.0
SCoT9	ACGACATGGCGACACGT	60.4	15	15	100.0
SCoT32	CCATGGCTACCACCGCAG	59.9	13	13	100.0
SCoT57	ACAATGGCTACCACCATC	51.9	11	11	100.0
SCoT58	ACAATGGCTACCACCGAC	55.1	19	19	100.0
SCoT59	ACAATGGCTACCACTACC	51.2	12	12	100.0
SCoT61	ACAATGGCTACCACTAGC	51.5	17	17	100.0
SCoT63	ACAATGGCTACCACTGAG	51.5	8	8	100.0
SCoT65	ACAATGGCTACCACTGGC	55.5	9	9	100.0
SCoT66	ACAATGGCTACCACTGGG	54.9	9	9	100.0
SCoT70	ACCATGGCTACCACGGCA	60.2	18	18	100.0
SCoT72	ACCATGGCTACCACGGTC	57.9	12	12	100.0
SCoT81	CAATGGCTACCACTGACA	51.8	9	8	88.9
SCoT92	GCCAGCCACCATGGCACA	62.8	12	12	100.0
总计			201	200	
平均值			13.4	13.3	94.45



M-Marker: 1~34-34 份黄精种质编号, 下图同

M-Marker; 1~34-34 germplasm numbers of Polygonatum, same as below figures.

图 1 引物 SCoT66 扩增图谱

Fig. 1 PCR results by primer SCoT66



图 2 引物 SCoT32 扩增图谱

Fig. 2 PCR results by primer SCoT32

3.3 遗传多样性分析

采用 Popgene1.32 计算 34 份黄精属种质资源在物种水平上的遗传多样性参数(表 4)。黄精属 3 个种质的 PPB、 N_a 、 N_e 、 H 、 I 分别为 67.83%、1.678 3、1.268 6、0.174 0、0.278 6。所有样本的 N_a 为 1.990 0, N_e 为 1.291 9, H 为 0.204 0, I 为 0.342 5, 表明这 3

种黄精属植物具有较高的遗传多样性。黄精属样本总体的 N_a 、 N_e 、 H 、 I 、PPB 均高于单一种的相应数值。就单个种质而言, DH 的遗传多样性最高(PPB=90.05%, N_a =1.900 5, N_e =1.252 1, H =0.180 1, I =0.305 8), CG 的遗传多样性最低(N_a =1.522 4, N_e =1.250 0, H =0.155 6, I =0.242 3)。

表 4 黄精属 3 个种质的遗传多样性的 SCoT 分析

Table 4 SCoT analysis of genetic diversity in three germplasm of *Polygonatum*

种名	PPB/%	N_a	N_e	H	I
DH	90.05	1.900 5	1.252 1	0.180 1	0.305 8
JY	61.19	1.611 9	1.303 8	0.186 3	0.287 8
CG	52.24	1.522 4	1.250 0	0.155 6	0.242 3
平均值	67.83	1.678 3	1.268 6	0.174 0	0.278 6
总体		1.990 0	1.291 9	0.204 0	0.342 5

3.4 遗传距离及聚类分析

Nei's 遗传相似系数及遗传距离、个体及种群的 UPGMA 聚类图结果分别如图 3、4 和表 5 所示。

SCoT 分子标记对黄精属 3 种植物的平均遗传距离为 0.068 5, 平均遗传相似度为 0.933 9。其 3 个种质的遗传距离范围是 0.057 1~0.090 7。DH 和 JY、

DH 和 CG、JY 和 CG 的遗传相似度分别为 0.943 9、0.944 5 和 0.913 3。结果显示 DH 和 CG 的遗传距离最小，为 0.057 1；JY 和 CG 的遗传距离最远，为 0.090 7。采用 UPGMA 聚类法对 34 份黄精材料进行系统聚类（图 3），遗传系数为 0.27~0.88。全部材料明显分为 2 大类群，第 I 类群包含 8 份种质，来源均为 DH 种群，其中 6 份产于永州宁远县，1 份

产于浏阳，1 份产于安化漳浦湾；第 II 类群包含 26 份种质，来源包含 DH、JY、CG 3 个种群。基于物种水平的遗传距离进行聚类（图 4），黄精群体中存在着明显的聚类现象，群体间具有一定程度的基因交流。DH 与 CG 聚成一类，2 个种质的遗传距离较近；JY 作为单独分枝，它与另外 2 个种质的遗传距离也较远。

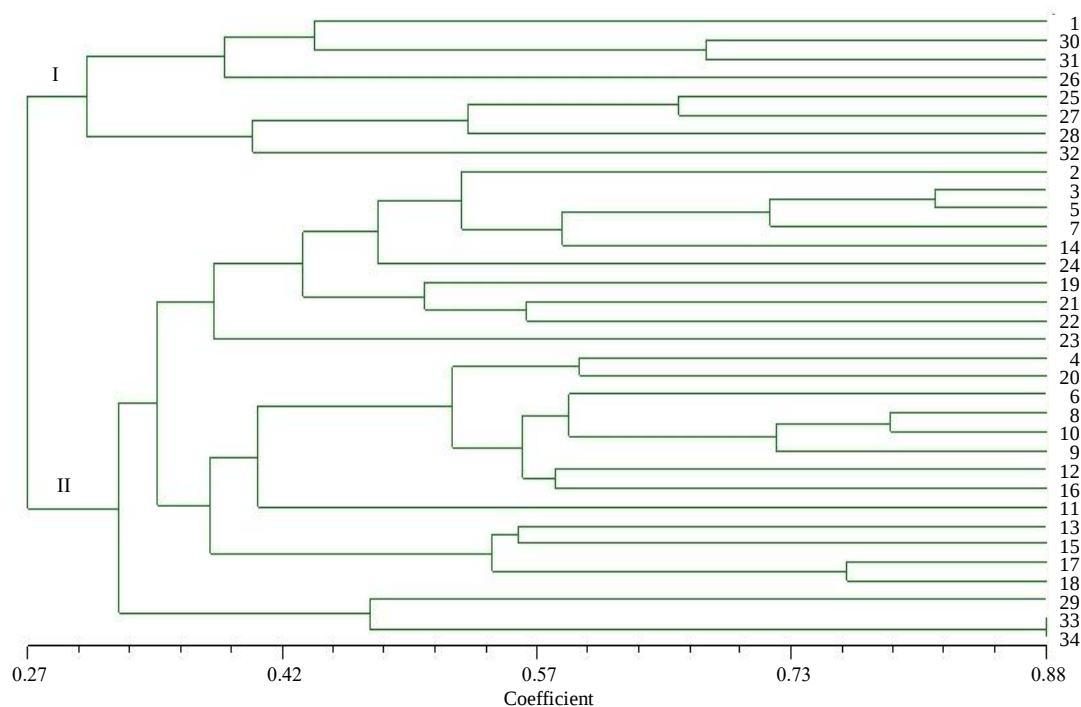


图 3 34 份黄精属种质资源聚类结果

Fig. 3 Clustering results of 34 germplasm resources of *Polygonatum*

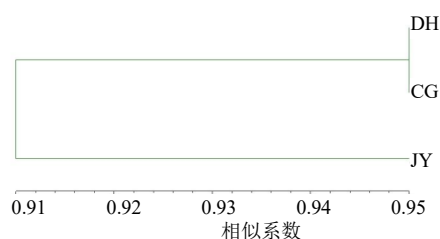


图 4 黄精属 3 个种质的 UPGMA 聚类分析结果

Fig. 4 UPGMA cluster analysis results of three germplasms of *Polygonatum*

表 5 黄精属 3 个种质的遗传相似度和遗传距离

Table 5 Genetic similarity and genetic distance of three germplasms of *Polygonatum*

种群	DH	JY	CG
DH	****	0.943 9	0.944 5
JY	0.057 7	****	0.913 3
CG	0.057 1	0.090 7	****

对角线上方为遗传相似度，对角线下方为遗传距离

Above the diagonal is genetic similarity, below the diagonal is genetic distance

3.5 遗传分化状况分析

基于 Nei 指数对黄精属 3 个种质的 H 、 G_{st} 和 N_m 进行了计算。结果显示，总的基因多样性（total genetic diversity, H_t ）为 0.210 4，种源内基因分化系数（gene diversity within population, H_s ）为 0.174 0； G_{st} 可用于判断群体间的遗传分化程度，且在 $G_{st} > 0.25$ 时，群体间分化程度则较高^[17]。 G_{st} 为 0.173 3（ $G_{st} < 0.25$ ）； N_m 是衡量群体间基因交流水平的重要指标，群体间 N_m 值为 2.386 0（ $4 > N_m > 1$ ），表明基因流防止了遗传漂流引起的群体之间的遗传分化；因此黄精属 3 个种质间存在一定频率的基因交流，且遗传差异较小。AMOVA 结果表明（表 6），3 个种质的遗传分化程度不高，84%遗传差异来自于群体内，16%遗传差异来自于群体间。

3.6 遗传结构分析

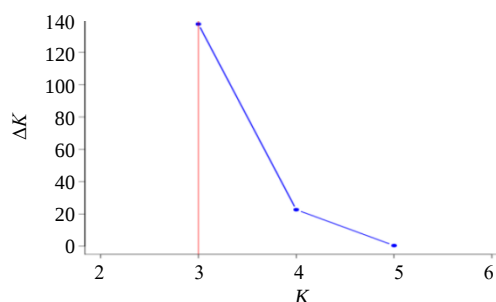
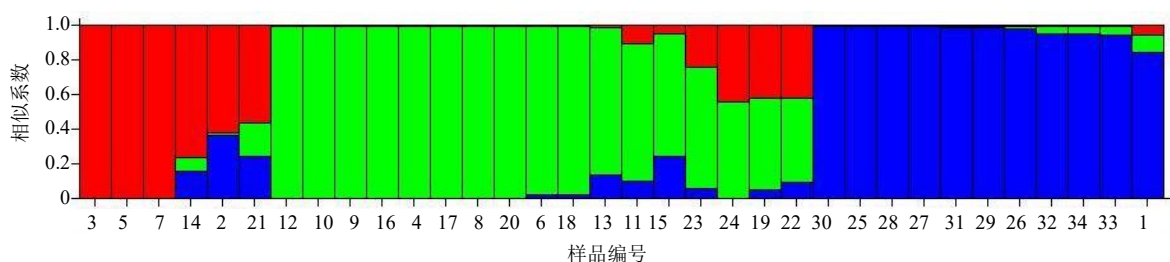
为了揭示黄精属 3 种植物间的遗传结构，参考

表 6 分子方差分析 (AMOVA)

Table 6 Molecular analysis of variance (AMOVA)

差异来源	df	SS	MS	Est Var	差值百分比/%	P 值
种群间	2	148.797	74.398	5.058	16	<0.001
种群内	31	853.762	27.541	27.541	84	
总体	33	1 002.559		32.598	100	

Evanno 等^[18]的方法当 ΔK 值变化出现明显的峰值时 K 值作为最优群体数的方法, 对 34 份黄精种质进行类群划分 (图 5)。当某一种质在某类群中的 $Q \geq 0.6$ 时, 则认为该种质血缘关系相对比较简单, 否则认为该种质血缘关系来源复杂^[19]。将 K 设置为 2~6, 绘制 K 与 ΔK 的关系图, 当 $K=3$ 时, ΔK 出现最大峰值, 因此群体结构分析结果将 34 份黄精种质划分为 3 个类群 (图 6)。群体 1 包含 5 份卷叶黄精种质和 1 份多花黄精种质, 其地理来源有永州宁远县、安化漳南湾、岳阳平江县; 群体 2 包含 2 份

图 5 K 值曲线图Fig. 5 K value curve图 6 34 份黄精属种质遗传结构 ($K=3$)Fig. 6 Genetic structures of 34 germplasm resources of *Polygonatum* ($K=3$)

卷叶黄精种质、6 份长梗黄精种质以及 9 份多花黄精种质, 其地理来源有常德市鼎城区、永州宁远县、安化漳南湾、长沙芙蓉区、岳阳平江县、浏阳大围山。群体 3 包含 11 份多花黄精种质, 其地理来源有永州宁远县、安化漳南湾、浏阳大围山、岳阳平江县。结果显示类群的划分结果主要与物种的划分有联系, 而与地理来源没有必然联系。

4 讨论

由于黄精属植物市场价值显著且应用广泛, 人们对其市场需求量不断增加, 造成黄精属植物野生资源的掠夺式开发, 因此需加强黄精属资源的遗传多样性研究, 筛选优质种质资源, 选育新品种, 从而进一步减少对野生黄精资源的采挖, 以保护黄精属种质资源的遗传多样性。遗传多样性能够揭示一个物种的起源和进化史, 对生物种群的存续和进化具有深远影响, 是生物多样性的重要组成部分^[20]。

分子标记是近年来常用于表征、鉴定和评估物种内和物种间遗传多样性的有效工具, 遍及整个基因组, 弥补了形态学鉴定的诸多困难^[21]。近年来已有 SCoT、ISSR、RAPD、SSR 分子标记研究黄精属种质资源鉴定的相关报道^[22-23]。

SCoT 标记作为一种新型的基因分子标记, 对反应体系要求较高, 若想要准确、有效地将 SCoT 分子标记技术应用于黄精属种质资源遗传多样性研究, 一个稳定可靠的 SCoT-PCR 反应体系是其研究的基础与关键。正交优化分析法可将反应体系内不同因素间的相互影响考虑入内, 降低只针对某一因素确定最佳浓度或用量的片面性^[24]。本研究通过正交设计实验确定黄精属 SCoT 最优体系, 并基于最优反应体系筛选出的 15 条多态性较好的引物对湖南省黄精属 3 个种质 34 份种质资源进行 SCoT 分析, 结果表明湖南省的多花黄精、卷叶黄精、长梗黄精 3 种植物间存在较高的遗传多样性,

且以多花黄精的遗传多样性最为丰富,一般来说物种遗传多样性越丰富,其对环境适应力越强,推测湖南省内多花黄精种质抗逆性和抗风险能力强,可作为湖南省的优势黄精种质。此外,研究结果也进一步揭示了黄精资源锐减的原因与遗传多样性无关,主要是人为过度采挖导致^[25]。

本研究中 PPB 可以一定程度的反映出黄精属种质的遗传多样性程度,在研究植物遗传多样性程度中影响重大。而从遗传学角度来看, I 更具有生物学意义, H 是一种表型参数,但它避免了对 ISSR 的显隐性的探讨,其结果与多态位点百分率的排序基本一致,因此应用 H 和 I 估算湖南省黄精属植物的遗传多样性也是可行的,同样等位基因也是衡量种群遗传多样性的一个重要参数。本研究中黄精属 3 个种质间遗传多样性从大到小依次为多花黄精>卷叶黄精>长梗黄精。群体间的遗传变异较小,大部分的遗传变异发生在群体内部。 N_m 是衡量群体间基因交流水平的重要参数,是影响群体遗传结构的主要因素。前人研究表明当 $N_m>1$, 群体间基因交流频率较高,基因流发生均质化作用,可有效防止遗传漂变带来的遗传分化现象^[26]。研究发现黄精 3 个种质间 N_m 值为 2.386 0, 大于 1, 种群间基因间交流较频繁。分子方差分析是一种通过进化距离来度量并计算单倍型(或基因型)间基因分化和遗传变异的群体遗传学分析方法。从方差分析结果发现,黄精属 3 个种质群体间变异百分率为 16%, 群体内变异百分率为 84%。

为了分析黄精群体间的遗传分化程度,计算了 SCoT 分子标记对 3 个种质的遗传相似度和遗传距离,结果揭示多花黄精和长梗黄精的遗传距离最小,卷叶黄精和长梗黄精的遗传距离最远。34 份湖南省黄精种质资源聚类结果显示遗传系数范围为 0.27~0.88。基于物种水平对 34 份黄精属样本进行系统聚类,结果揭示群体间存在着明显的聚类现象,且群体间具有一定程度的基因交流。多花黄精与长梗黄精的遗传距离最近,遗传差异最小;卷叶黄精作为单独分枝,它与另外两种植物的遗传距离也较远,遗传差异较大。研究中群体结构分析与聚类分析及遗传相似系数及遗传距离的分析有一定相似性,分类结果与植物的种类有关,与地理来源没有必然的联系;黄精属植物存在种间杂交现象,处于比较活跃的分化期,变异幅度大,这结论与朱巧等^[27]关于黄精属 SSR 遗传分析结果基本一致。本

研究揭示了湖南省黄精属 3 个种质的遗传多样性水平及亲缘关系远近,为黄精属种质资源的鉴定及开发利用提供参考。

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: 319.
- [2] 宋·苏颂编撰. 尚志钧辑校. 本草图经 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994: 56.
- [3] 宋·唐慎微撰. 尚志钧等校点. 证类本草: 重修政和经史证类备急本草 [M]. 北京: 华夏出版社, 1993: 78.
- [4] Xiaowei C, Wei W, Hong G, *et al.* Review of *Polygonatum sibiricum*: A new natural cosmetic ingredient [J]. *Pharmazie*, 2019, 74(9): 513-519.
- [5] 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.
- [6] Chase M W, Reveal J L, Fay M F. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae [J]. *Bot J Linn Soc*, 2009, 161(2): 132-136.
- [7] 石乃星, 文国松, 赵明富. 黄精属植物 DNA 分子鉴定技术应用研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2021, 22(5): 1209-1218.
- [8] 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.
- [9] Zeng B, Yan H D, Huang L K, *et al.* Orthogonal design in the optimization of a start codon targeted (SCoT) PCR system in *Roegneria kamoji* Ohwi [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(4): 15048968.
- [10] 钟明志, 毛莉, 姜媛媛, 等. 基于 ISSR 和 SCoT 分子标记的丹参遗传多样性评价及生境因子对丹酚酸和丹参酮的影响 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4171-4184.
- [11] 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.
- [12] 郑茜, 杨倩, 陈永钧, 等. 基于 ISSR 及 SCoT 分子标记对射干、川射干药材的分子鉴别 [J]. 中国药杂志, 2018, 53(13): 1063-1069.
- [13] 梁忠厚, 李有清, 邹青, 等. 湖南省黄精产业发展现状与对策 [J]. 湖南生态科学学报, 2020, 7(3): 35-42.
- [14] 宋荣, 严蓓, 易自力, 等. 湖南多花黄精栽培技术[J]. 湖南农业科学, 2018(8): 21-23.
- [15] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and

- research: An update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [16] Earl D A, VonHoldt B M. Structure Harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method [J]. *Conserv Genet Resour*, 2012, 4(2): 359-361.
- [17] 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.
- [18] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [19] 张晨, 云岚, 李珍, 等. 新麦草种质的 SSR 遗传多样性及群体结构分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(1): 48-59.
- [20] Jiang L Y, Zang D K. Analysis of genetic relationships in *Rosa rugosa* using conserved DNA-derived polymorphism markers [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2018, 32(1): 88-94.
- [21] Jalilian H, Zarei A, Erfani-Moghadam J. Phylogeny relationship among commercial and wild pear species based on morphological characteristics and SCoT molecular markers [J]. *Sci Hortic*, 2018, 235: 323-333.
- [22] 刘贺贺, 石洪峰. 黄精属植物种质资源遗传多样性研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2023(17): 83-89.
- [23] 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.
- [24] 李进, 陈仕勇. 燕麦 SCoT 分子标记体系的优化及引物筛选 [J]. *西南农业学报*, 2021, 34(5): 940-944.
- [25] Pauls S U, Nowak C, Bálint M, *et al*. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species [J]. *Mol Ecol*, 2013, 22(4): 925-946.
- [26] Wright S. Evolution in Mendelian populations [J]. *Genetics*, 1931, 16(2): 97-159.
- [27] 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.

[责任编辑 时圣明]