



天麻种质资源的 SSR 指纹图谱研究

周天华¹, 丁家玺¹, 徐 皓¹, 陈 琛^{1,2}

(1 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001; 2 陕西省天麻山茱萸工程技术研究中心, 陕西汉中 723000)

摘 要: 天麻(*Gastrodia elata* Bl.) 为中国珍稀濒危传统药用植物, 其不同种质之间形态特征差异微小, 而药用成分差异较大, 种质资源混乱。为了构建天麻种质资源的 DNA 指纹图谱, 该研究应用 SSR 分子标记技术对天麻的 3 种变型(乌天麻、红天麻和绿天麻)、12 个种群, 共计 120 个样本进行了群体遗传分析。研究结果表明: (1) 7 对 SSR 引物均能对天麻样本成功进行 PCR 扩增且多态性丰富, 每对引物的等位基因数(N_a) 在 5~7 之间, 平均为 6.43; 引物多态信息含量(PIC) 范围为 0.626 2~0.823 5, 平均为 0.759 5。 (2) 群体遗传分析结果表明, 天麻在物种水平上和变型水平上均有较高的遗传多样性(物种水平: $A=6.428 6$, $H=0.789 0$, $I=1.682 9$; 变型水平: $A=2.666 6$, $H=0.523 9$, $I=0.812 3$)。 (3) 分子方差分析结果显示, 种群间和变型间均存在强烈的遗传分化($F_{st}=0.558 6$, $F_{ct}=0.381 8$)。 (4) 种群聚类分析结果显示, 相同变型的天麻种群首先聚在一起, 3 种变型能被完全分开, SSR 指纹图谱在变型水平上鉴定效率良好; 从 120 个样本中共检测出有 112 种基因型, Simpson 指数(D) 为 0.99 8, 说明 SSR 指纹图谱对天麻样本在个体水平上也有着良好的鉴定效率。该研究结果揭示了天麻的遗传背景, 并建立了天麻的 SSR 指纹鉴定图谱, 为其种质资源的保护、选育及药材鉴定奠定了科学依据与技术支撑。

关键词: 天麻; SSR 指纹图谱; 种质资源

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

SSR Fingerprinting on *Gastrodia elata* Bl. Germplasms

ZHOU Tianhua¹, DING Jiayi¹, XU Hao¹, CHEN Chen^{1,2}

(1 College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China; 2 Shaanxi Engineering Research Center of Tall *Gastrodia* Tuber and Medical Dogwood, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

Abstract: *Gastrodia elata* Bl. is a rare and endangered traditional medicinal plant in China. The difference among germplasms is tiny in morphological characteristics, while is prominent in medical components, which results in its germplasm confusion in both cultivation and pharmacy. With the aim to construct DNA fingerprinting for *G. elata* germplasm, we used simple sequence repeat (SSR) molecular markers in this study to analyze the population genetic structure for *G. elata* with its 120 samples collected from 12 populations of its 3 forms (*G. elata* Bl. f. *glauca* S. Chow, *G. elata* Bl. f. *elata*, *G. elata* Bl. f. *viridis* Maki-no). As the results shows: (1) seven pairs of SSR primer were successfully used in the PCR amplification, and performed abundant polymorphism, the number of allele per primer pair (N_a) ranged from 5 to 7 with the average of 6.43, while the polymorphism information content (PIC) ranged from 0.626 2 to 0.823 5 with the average of 0.759 5. (2) Genetic diversity analysis of all samples of *G. elata* showed that the genetic diversity was high (species level: $A=6.428 6$, $H=0.789 0$, $I=1.682 9$; form level: $A=2.666 6$, $H=0.523 9$, $I=0.812 3$). (3) Analysis of molecular variance (AMOVA) analysis revealed strong genetic differentiation was happened among both populations and the forms ($F_{st}=0.558 6$, $F_{ct}=0.381 8$). (4)

收稿日期: 2018-01-05; 修改稿收到日期: 2018-04-03

基金项目: 陕西省科技厅项目(2015KTTSSF01-02)

作者简介: 周天华, (1976—), 男, 博士, 讲师, 主要从事植物资源学研究。E-mail: zhou3687@126.com

Cluster analysis showed that the populations of the same form clustered together firstly, 3 forms were separated completely. SSR fingerprinting had a good identification effect at the form level; 106 genotypes were detected from the 120 samples in total. The Simpson index (D) was 0.998, indicating the SSR fingerprinting has good ability of identification on the individual level. The study revealed the genetic background of *G. elata*, which provided scientific and technical basement for its conversation, germplasm selection and identification.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; SSR fingerprinting; germplasm

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)属兰科天麻亚族天麻属(*Gastrodia* R. Br.)多年生草本植物,又名赤箭、独摇芝、离母、定风草、白龙皮等。分布于吉林、辽宁、内蒙古、河北、山西、陕西、甘肃、江苏、安徽、浙江、江西、台湾、河南、湖北、湖南、四川、贵州、云南和西藏。生于海拔 400~3 200 m 的疏林下、林中空地、林缘及灌丛边缘,生长过程中必须先后与小菇属和蜜环菌属 2 类真菌建立共生关系。植株高 30~200 cm。茎直立,无绿叶,下部被数枚膜质鞘。根状茎肥厚,块茎状,椭圆形至近哑铃形,具较密的节^[1]。天麻块茎入药为中药天麻(GASTRODIAE RHIZOMA),是中国名贵中药材,性甘、平,归肝经,主治功能有息风止痉,平抑肝阳,祛风通络,可用于小儿惊风,头痛眩晕,肢体麻木等症状^[2]。

天麻属下共有 13 个种,而药用植物天麻(*G. elata*)种下又可分为 5 个变型(form),分别是红天麻(*G. elata* Bl. f. *elata*)、绿天麻(*G. elata* Bl. f. *viridis* Makino)、乌天麻(*G. elata* Bl. f. *glauca* S. Chow)、黄天麻(*G. elata* Bl. f. *flavida* S. Chow)与松天麻(*G. elata* Bl. f. *alba* S. Chow)^[1]。这 5 个变型分布于全国各地,均有驯化栽培。研究表明,天麻的块茎中存在着多种化学成分,如酚类、有机酸类、多糖类和甾体类等,其中天麻素(对-羟甲基苯- β -D-吡喃葡萄糖)是公认的主要药用活性成分^[3],天麻素的含量也成为了评定天麻质量的重要指标。然而,现有研究发现天麻不同产地、不同变型间的天麻素含量存在着较大差异^[4-5]。

天麻的市场需求量日益上涨,野生天麻已经不能满足市场的需求,虽然大范围的人工栽培在一定程度上解决了野生天麻稀缺的问题,但也导致了市场上的天麻的种质混乱。不同变型间的天麻块茎在形态上几乎没有区别,而天麻素的量却有着较大的差异,导致药材品质良莠不齐,且混伪品泛滥,给天麻的种植栽培和临床用药安全带来了极大的困难。因此,亟需利用 DNA 分子鉴定的方法,为该药材良种选用及用药安全提供重要技术支撑。

微卫星 DNA(microsatellite DNA)也称为简单

重复序列(simple sequence repeats, SSRs),是由 1~6 bp 的重复单元串联而成一段 DNA,并且广泛分布于核基因组与叶绿体基因中^[6]。随着分子生物学的快速发展,SSR 技术已经普遍运用于植物遗传学的研究中,用来揭示植物样本间或居群间的遗传变异或评估种间的遗传关系。与其他分子标记技术相比,由于微卫星位点上碱基数目是可变的并且呈高度的多态性,以及可以做共显性的等位基因分析,因此被广泛应用于药用植物的遗传背景分析、种质资源鉴定和混伪品鉴定^[7-9]。尽管药材在干燥过程中 DNA 有所降解,但干品仍然带有足够多的 DNA 信息特别是稳定的小分子带,可供鉴别药材使用。因此,不论新鲜药材还是干品饮片,或是不同药用部位,通过 DNA 分子技术皆能准确予以鉴别。

本研究利用已开发的 SSR 引物对天麻的 3 种变型进行了群体遗传分析,并构建了天麻种质资源的 SSR 指纹图谱,为中国传统中药材天麻变型间区分提供了可靠的分子依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

本研究所用 120 份样本采自于陕西省汉中市、贵州省毕节市、云南省昭通市和湖北省宜昌市。每个地区采集茎秆颜色分明的乌天麻、红天麻和黄天麻各 10 个样本,将块茎清洗,切片存于-80 ℃超低温冰箱中保存备用。所有样品的标本凭证保存于陕西理工大学生物科学与工程学院植物分子生物学实验室。

1.2 方 法

1.2.1 天麻 DNA 提取 采用改良 2×CTAB 法提取天麻 4 个栽培居群 120 个样本的基因组 DNA,溶解在 100 μ L 0.1% TE 缓冲液中,0 ℃保存备用。应用紫外分光光度计(NanoDrop 2000)检测其纯度,记录 DNA 浓度和 A_{260}/A_{280} 吸光比值。各取 10 μ L 基因组 DNA 用浓度为 1% 琼脂糖凝胶检测其完整性。

1.2.2 天麻的 PCR 扩增与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 从本实验室开发的 20 对天麻 SSR 引物^[10]中选取条带清晰,多态性高的 7 对引物(表 1)对 4 个居

群 120 个样本进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

PCR 扩增反应体系为 20 μ L,包括 DNA 模板 50 ng,2 $\times$ Mix(天根生物科技)10 μ L,正反引物各 50 ng,加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应在 PCR 扩增仪(Bio-Rad S1000TM)上按以下程序运行:首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度下 45 s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 45 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

完成 PCR 循环 48 h 内,取 2 μ L PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压 160V 电泳 14h。用 NaOH 银染方法进行染色显影。显影完成之后,用凝胶成像系统(Bio-Rad GEL DOCTM XR+)采集图像并进行数据统计分析。

1.2.3 数据统计与软件分析 将银染过的聚丙烯酰胺凝胶拍照,使用 Bio-Rad Quantity 软件对电泳图进行条带统计,采用人工读带的方式记录主要带型,忽略弱杂带,在 Excel 2016 中构建天麻 SSR 条带数据库。应用 POPGENE Version1.32^[11] 计算各引物的等位基因数目(N_a)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、多态性信息含量^[12] (PIC)等参数,计算天麻变型和种群的遗传多样性,统计平均等位基因数目(A)、Nei's 基因多样性指数(H)和 Shannon 多样性指数(I)。使用 GenALEX 6.1 统计所有样本的基因型组成,并计算所有个体的 Simpson 指数(D),计算公式为: $D=1-\sum[n_i(n_i-1)/N(N-1)]$,其中 n_i 是指具有第 i 个基因型的个数。Simpson 指数是测定种群克隆多样性的重要指标,数值越高说明种群克隆多样性越好。在本研究中借用 Simpson 指数来说明所有样本中个体基因型的多样性,如果群体中所有个体基因的基因型各不相同,则 Simpson 指数最大,即 $D=1$;如果所有个体基因型都相同,则 Simpson 指数最小,即 $D=0$ 。

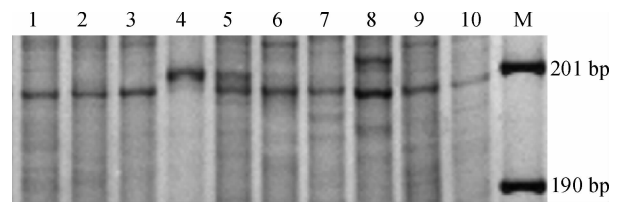
此外,为了分析天麻种质资源样本的遗传关系,应用 Structrue V2.3.4^[13] 软件来确定所有样本的聚类分组,并构建了各样本的遗传关系图^[14],使用 GenALEX6.1 对所有样本进行主相关性(The Principal Coordinates Analysis, PCoA)分析,使用软件 ARLQEUIN 3.0 进行分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA),计算天麻物种及变型遗传分化。

2 结果与分析

2.1 引物扩增多态性与区分效率

本研究所提取的天麻样本基因组 DNA 检测结果显示,天麻 DNA 浓度均在 45~360 ng/ μ L 之间, A_{260}/A_{280} 吸光比值均在 1.6~2.0 之间。琼脂糖凝胶电泳显示,天麻 DNA 长度均大于 20 000 bp。提取到的天麻样本总 DNA 纯度和完整度高,能够用于 PCR 扩增。

本研究所采用的 7 对天麻 SSR 引物均能对 120 份样品进行扩增,效果良好(图 1)。表 1 显示,SSR 引物的等位基因数在 5~7 之间,共计 45 个;每个位点的等位基因数(N_a)平均为 6.428 6 个,具有较好的多态性和通用性;期望杂合度(H_e)范围为 0.325 0~



M. PUC-18 DNA marker; 1~10. YCB 居群的 10 个个体
图 1 引物 GEBL28 对宜昌乌天麻(YCB)居群的扩增结果
M. PUC-18 DNA marker; 1~10. 10 samples of population YCB

Fig.1 Amplification pattern of population YCB using the primer pair GEBL28

表 1 本研究所用 SSR 引物的遗传多样性
Table 1 The genetic diversity of 7 SSR primer pairs used in this study

引物 Primer	等位基因数 Number of alleles (N_a)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	多态信息量 Polymorphism information content (PIC)
GEBL03	7	0.700 0	0.810 1	0.782 5
GEBL07	5	0.533 3	0.679 8	0.626 2
GEBL14	7	0.500 0	0.846 8	0.823 5
GEBL20	7	0.575 0	0.831 9	0.805 3
GEBL27	7	0.741 7	0.767 4	0.732 1
GEBL28	6	0.408 3	0.679 8	0.745 5
GEBL31	6	0.325 0	0.825 7	0.801 2
平均 Mean	6.428 6	0.540 5	0.792 3	0.759 5

0.741 7,平均值为 0.540 5;观测杂合度(H_o)范围为 0.325 0~0.741 7,平均值为 0.540 5(表 1)。多态信息含量(PIC)范围为 0.626 2~0.823 5,平均值为 0.759 5,而 PIC 值能够反映引物对材料的区分能力,说明引物对材料具有较好的鉴别能力。

2.2 天麻变型的遗传多样性与遗传分化

对天麻各变型及种群的群体遗传分析发现,天麻在物种水平和变型水平有较高的遗传多样性(物

种水平: $A=6.428\ 6$, $H=0.789\ 0$, $I=1.682\ 9$;变型水平: $A=2.666\ 6$, $H=0.523\ 9$, $I=0.812\ 3$),其中红天麻遗传多样性明显高于乌天麻与绿天麻(表 2)。

分子方差分析(AMOVA)结果(表 3)显示,38.18%的变异来自于变型间,17.68%的变异来自于变型内种群间,而种群内的变异占 44.14%。这说明天麻种群间遗传分化强烈($F_{st}=0.558\ 6$),天麻

表 2 天麻种群的采样地与遗传多样性
Table 2 The sample locations and genetic diversities of *G. elata* populations

种群名称 Population ID	采样地 Sample location	平均等位基因数 Number of alleles per locus (<i>A</i>)	遗传多样性指数 Genetic diversity (<i>H</i>)	Shannon 信息指数 Shannon's Information index (<i>I</i>)
乌天麻 <i>G. elata</i> Bl. f. <i>glauca</i> S. Chow				
略阳乌天麻 LYB	陕西略阳 Lueyang Shaanxi	2.000 0	0.432 9	0.618 9
宜昌乌天麻 YCB	湖北宜昌 Yichang Hubei	1.857 1	0.338 6	0.489 5
毕节乌天麻 BJB	贵州毕节 Bijie Guizhou	2.142 9	0.324 3	0.501 3
昭通乌天麻 ZTB	云南昭通 Zhaotong Yunnan	2.142 9	0.436 4	0.648 2
平均 Mean		2.035 7	0.383 1	0.564 5
变型水平 Form level		2.857 1	0.546 8	0.878 2
红天麻 <i>G. elata</i> Bl. f. <i>elata</i>				
略阳红天麻 LYR	陕西略阳 Lueyang Shaanxi	2.000 0	0.440 7	0.631 1
宜昌红天麻 YCR	湖北宜昌 Yichang Hubei	2.142 9	0.388 6	0.597 6
毕节红天麻 BJR	贵州毕节 Bijie Guizhou	2.142 9	0.385 0	0.582 3
昭通红天麻 ZTR	云南昭通 Zhaotong Yunnan	2.714 3	0.389 3	0.654 9
平均 Mean		2.250 0	0.400 9	0.616 5
变型水平 Form level		2.857 1	0.505 8	0.794 6
绿天麻 <i>G. elata</i> Bl. f. <i>viridis</i> Makino				
略阳红天麻 LYG	陕西略阳 Lueyang Shaanxi	1.857 1	0.338 6	0.489 5
宜昌红天麻 YCG	湖北宜昌 Yichang Hubei	2.000 0	0.382 9	0.564 4
毕节红天麻 BJG	贵州毕节 Bijie Guizhou	2.000 0	0.380 7	0.563 4
昭通红天麻 ZTG	云南昭通 Zhaotong Yunnan	2.000 0	0.372 1	0.547 0
平均 Mean		2.285 7	0.519 0	0.765 0
变型水平 Form level		2.083 3	0.384 2	0.574 0
种群平均 Population mean		2.083 3	0.384 2	0.574 0
变型平均 Form mean		2.666 6	0.523 9	0.812 6
物种水平 Species level		6.428 6	0.789 0	1.682 9

表 3 天麻样本的分子方差分析
Table 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) of *G. elata*

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	方差分量 Variance component	变异比例 Percentage of variation/%
变型间 Among forms	222.667	1.231 30	38.18
变型内的种群间 Among population within form	115.462	0.570 27	17.68
种群内 Within population	324.600	1.423 68	44.14
总计 Total	662.729	3.225 26	

变型间也存在明显的遗传分化($F_{ct}=0.3818$)。

2.3 天麻变型间 SSR 指纹图谱的构建与鉴定

利用 7 对天麻 SSR 引物构建天麻 SSR 指纹图谱(表 4)并对指纹图谱进行分析。在 120 份样本中有 106 份样本的基因型,绝大多数个体具有特有的

基因型。仅有个别个体存在共享基因组型的情况,例如 YLG10 与 YLG01 共享一个基因型,ZTG10、ZTG09 和 ZTG08 共享一个基因型,但这种共享基因型的情况仅仅发生在相同种群内,变型间和种群间没有共享基因型的情况。这表明本研究所用的 7

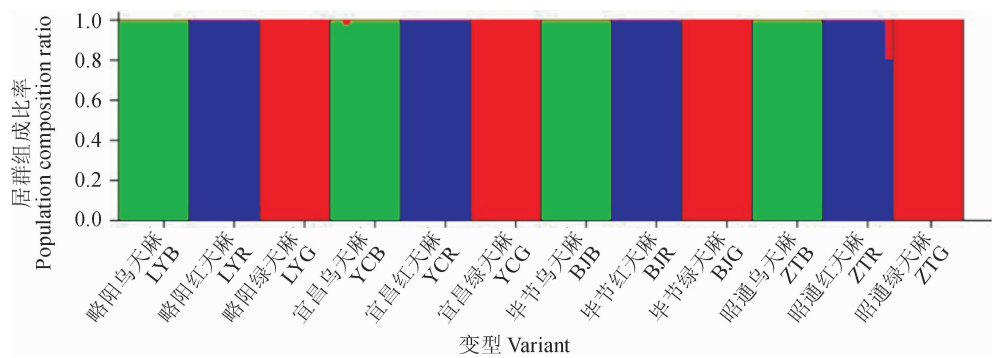
表 4 天麻样本的 SSR 指纹图谱
Table 4 The SSR fingerprinting for *G. elata* samples

样本与编号 Species & code	SSR 引物 SSR primer													
	GEBL03		GEBL07		GEBL14		GEBL20		GEBL27		GEBL28		GEBL31	
LYB01	155	160	160	180	165	165	205	210	210	220	198	205	212	240
LYB02	155	160	160	180	165	165	205	210	210	210	198	205	212	240
LYB03	155	160	160	180	165	165	205	210	210	220	198	205	240	240
LYB04	155	155	160	180	165	165	205	205	210	220	198	198	212	240
LYB05	155	160	160	160	165	165	205	210	210	210	198	205	212	240
LYB06	155	160	160	180	165	171	205	210	210	220	198	198	212	240
LYB07	155	160	160	180	165	165	205	205	210	220	198	205	212	240
LYB08	155	160	160	180	165	171	205	210	210	210	198	205	212	240
LYB09	155	155	160	180	165	165	205	210	210	220	198	205	212	240
LYB10	155	160	160	160	165	165	205	205	210	220	198	205	212	212
YCB01	155	155	180	180	165	171	205	210	210	220	198	198	212	240
YCB02	155	160	180	180	165	165	205	205	220	220	198	198	212	240
YCB03	150	155	160	180	165	171	205	205	220	220	198	198	212	212
YCB04	155	160	175	180	165	171	205	210	210	220	205	205	212	240
YCB05	155	160	160	180	165	171	205	205	220	220	198	205	212	240
YCB06	160	160	180	180	165	171	205	205	220	220	198	198	212	240
YCB07	155	160	180	180	165	171	205	205	220	220	198	198	212	240
YCB08	155	155	160	180	165	171	205	205	210	220	198	213	212	212
YCB09	155	160	180	180	165	171	205	205	220	220	198	198	212	240
YCB10	155	160	160	175	165	171	205	205	220	220	198	198	212	212
BJB01	160	173	160	175	165	165	205	210	210	210	205	213	212	212
BJB02	160	173	160	175	165	165	205	210	210	210	205	213	212	212
BJB03	160	173	160	180	165	165	210	210	210	220	213	213	212	219
BJB04	160	160	160	175	165	165	205	210	210	210	213	213	212	212
BJB05	160	173	175	175	165	165	210	210	210	210	205	213	212	219
BJB06	160	173	160	175	165	165	205	210	210	210	213	213	212	212
BJB07	160	173	160	175	165	165	210	210	210	210	205	213	212	212
BJB08	160	173	160	175	165	165	210	210	210	210	205	213	212	212
BJB09	160	173	160	175	165	165	210	210	210	210	205	213	212	212
BJB10	160	160	160	175	165	171	205	205	210	210	205	213	212	212
ZTB01	160	160	160	175	165	171	205	205	210	210	213	213	212	219
ZTB02	160	173	160	175	165	171	205	205	220	220	213	213	212	212
ZTB03	173	173	160	175	165	171	205	210	210	210	213	213	212	219
ZTB04	173	173	160	175	165	171	210	210	210	210	205	213	212	212
ZTB05	160	160	171	175	165	171	210	210	210	210	205	213	212	219
ZTB06	160	173	171	175	171	171	205	205	210	210	213	213	212	219
ZTB07	160	173	160	175	165	171	210	210	210	210	213	213	212	219

续表 4 Continued Table 4														
样本与编号 Species & code	SSR 引物 SSR primer													
	GEBL03		GEBL07		GEBL14		GEBL20		GEBL27		GEBL28		GEBL31	
ZTB08	160	160	160	175	165	171	210	210	220	220	213	213	212	212
ZTB09	173	173	160	175	165	171	210	210	210	210	213	213	212	219
ZTB10	173	173	160	175	165	171	210	210	210	210	205	213	212	219
LYR01	163	180	155	160	165	165	205	205	203	215	210	210	222	258
LYR02	163	180	155	160	165	180	205	205	203	215	210	220	222	222
LYR03	163	180	155	160	165	180	205	195	203	215	210	220	222	258
LYR04	163	180	155	155	165	165	205	205	203	203	210	220	222	258
LYR05	163	180	155	160	165	165	205	205	203	215	210	220	222	258
LYR06	163	163	155	160	165	165	195	205	203	215	210	220	222	258
LYR07	163	163	155	160	165	165	205	205	203	215	210	220	222	222
LYR08	163	180	155	160	165	165	195	205	203	215	210	210	222	258
LYR09	163	180	155	160	165	180	195	205	203	215	210	220	222	258
LYR10	163	180	155	155	165	180	195	205	203	215	210	210	222	258
YCR01	163	180	155	155	165	165	195	205	215	215	210	220	222	258
YCR02	163	180	155	155	165	165	195	205	215	215	220	220	258	258
YCR03	155	163	155	159	165	165	195	195	215	215	210	220	222	258
YCR04	155	163	155	159	165	165	195	195	203	215	210	220	258	258
YCR05	163	163	155	159	165	180	195	205	215	215	210	220	258	258
YCR06	163	163	155	155	165	165	195	195	215	215	210	220	222	258
YCR07	163	180	155	159	165	180	195	205	203	215	210	220	258	258
YCR08	163	180	155	159	165	165	195	195	215	215	210	220	258	258
YCR09	163	180	155	155	165	180	195	195	215	215	220	220	222	258
YCR10	163	180	155	159	165	180	195	195	203	203	210	220	258	258
BJR01	155	180	155	160	165	180	195	195	203	203	220	220	222	222
BJR02	155	180	155	160	165	180	195	205	203	203	220	220	222	222
BJR03	155	180	155	160	165	180	195	205	203	215	220	220	222	258
BJR04	155	180	155	160	165	165	195	205	203	203	210	220	222	222
BJR05	155	155	155	159	165	165	195	205	203	203	220	220	222	222
BJR06	155	180	155	160	165	165	195	205	203	203	220	220	222	222
BJR07	155	180	155	160	165	180	195	205	203	215	220	220	222	258
BJR08	155	155	155	155	165	180	195	205	203	203	210	220	222	258
BJR09	155	180	155	160	165	180	195	205	203	215	220	220	222	222
BJR10	155	155	155	160	165	180	195	205	203	203	220	220	222	258
ZTR01	155	163	155	155	165	165	200	205	203	215	220	220	222	222
ZTR02	155	163	155	155	180	180	195	205	203	203	210	220	222	222
ZTR03	155	163	155	155	165	180	195	205	203	203	220	220	222	222
ZTR04	163	163	155	159	165	165	195	205	203	203	220	220	222	222
ZTR05	163	180	155	155	165	180	205	205	203	203	210	220	222	258
ZTR06	163	163	155	159	165	180	200	205	203	203	220	220	222	222
ZTR07	155	163	155	159	165	180	205	205	203	203	220	220	222	222
ZTR08	155	163	155	159	165	168	200	205	203	203	220	220	222	258
ZTR09	155	155	155	155	165	180	200	205	203	203	220	220	222	258
ZTR10	155	163	155	155	165	180	200	205	203	215	185	200	222	222

续表 4 Continued Table 4

样本与编号 Species & code	SSR 引物 SSR primer													
	GEBL03		GEBL07		GEBL14		GEBL20		GEBL27		GEBL28		GEBL31	
YLG01	150	155	147	155	175	175	180	180	195	195	185	200	230	237
YLG02	150	155	147	155	175	175	180	180	195	195	200	200	230	237
YLG03	150	155	147	155	175	175	180	197	195	195	185	200	230	237
YLG04	150	155	147	155	175	175	180	197	195	195	185	200	230	230
YLG05	150	155	147	155	175	175	180	197	195	195	185	200	230	230
YLG06	150	150	147	147	175	175	180	197	195	195	185	200	230	237
YLG07	150	155	147	155	175	175	180	180	195	195	185	200	237	237
YLG08	150	155	147	147	175	180	180	180	195	195	185	185	230	237
YLG09	150	150	147	155	175	175	180	180	195	195	185	200	230	237
YLG10	150	155	147	155	175	175	180	180	195	195	185	200	230	237
YCG01	155	155	147	155	175	180	180	197	195	200	185	185	230	230
YCG02	155	160	155	155	175	180	180	197	195	195	185	185	230	230
YCG03	155	160	155	155	175	180	180	180	195	200	185	200	230	237
YCG04	155	160	155	155	175	180	180	180	195	200	185	185	230	237
YCG05	155	160	147	155	175	180	180	180	195	200	185	185	230	230
YCG06	155	160	147	155	175	180	180	180	195	200	185	200	230	230
YCG07	155	155	147	155	175	175	180	180	195	200	185	185	230	230
YCG08	155	160	147	155	175	175	180	180	195	200	185	200	230	230
YCG09	155	160	147	155	175	175	180	180	195	195	185	200	230	230
YCG10	155	160	147	155	175	180	180	180	195	200	185	200	230	237
BJG01	169	169	147	155	175	180	197	197	195	195	185	185	237	237
BJG02	169	169	147	147	175	180	197	197	200	200	185	185	230	237
BJG03	155	169	147	155	175	180	197	197	200	200	185	200	237	237
BJG04	155	169	147	147	180	180	180	197	200	200	185	200	230	237
BJG05	169	169	147	155	175	180	197	197	195	200	185	200	230	237
BJG06	169	169	147	155	180	180	197	197	200	200	185	185	230	237
BJG07	169	169	147	155	175	180	180	197	200	200	185	185	230	237
BJG08	169	169	147	155	175	180	197	197	200	200	185	185	230	237
BJG09	155	169	147	155	175	180	197	197	200	200	185	200	230	237
BJG10	155	169	147	155	180	180	197	197	195	195	185	200	230	237
ZTG01	155	169	155	155	180	180	197	197	195	200	200	200	230	237
ZTG02	155	169	147	155	175	180	197	197	195	200	185	200	230	237
ZTG03	155	169	147	155	175	180	197	197	200	200	185	185	230	237
ZTG04	155	169	147	155	175	175	197	197	200	200	200	200	237	237
ZTG05	169	169	147	155	175	175	180	197	200	200	200	200	230	237
ZTG06	169	169	147	147	175	175	197	197	195	200	200	200	230	237
ZTG07	155	169	147	147	175	180	197	197	200	200	185	200	237	237
ZTG08	155	169	147	155	175	180	197	197	200	200	200	200	230	237
ZTG09	155	169	147	155	175	180	197	197	200	200	200	200	230	237
ZTG10	155	169	147	155	175	180	197	197	200	200	200	200	230	237



此图为 K=3 时 STRUCTURE 分组结果条形图,图中同一颜色表示同一变型

图 2 天麻样本的贝叶斯聚类图

Bar plots showing assignment probabilities from STRUCTURE analyses when K = 3,
the same color in the figure represents the same variant

Fig. 2 Cluster dendrogram of *G. elata* samples based on Bayes analysis

对天麻 SSR 引物在个体水平有着极高的鉴定效率。

利用 Structure 软件对 120 份样本进行贝叶斯聚类分析结果表明,当 $K=3$ 时, ΔK 出现最大峰值,此时聚类图将不同地域的相同天麻变型聚为一类,不同变型之间基因渗透现象较少(图 2)。此外,使用 GenAlEx 6.1 软件对样本进行居群主相关性分析(图 3),得到的结果与上述结果完全一致。这说明天麻不同变型在遗传上的差异较为稳定,本研究的结果和基于花萼颜色对不同变型进行分类的结果完全一致。这也表明,本研究所用的天麻 SSR 引物在变型水平也具有非常良好的鉴定效果,能有效区分天麻的不同变型。

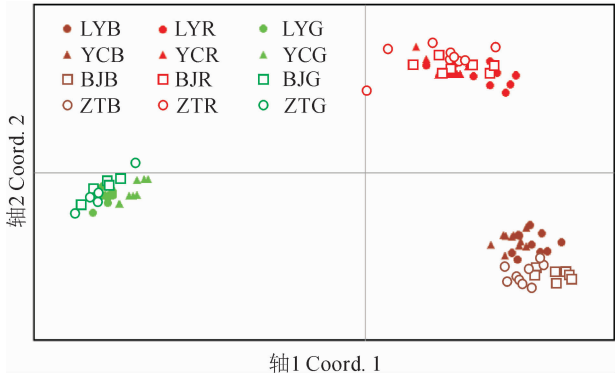


图 3 基于遗传距离的天麻样本主相关性分析
Fig. 3 The Principal Coordinates Analysis (PCoA)

dendrogram for *G. elata* samples based
on genetic distance

3 讨 论

目前许多中药材均存在同名异物和同物异名的现象,而解决这类问题的方法则是进行有效准确的物种鉴定。目前常用的鉴定方法如形态学鉴定、显微鉴定、理化鉴定等都无法准确地对同属同种等亲缘关系较近的物种进行有效的鉴别。对于天麻而言,药用部位为块茎,更无法从形态学上进行准确的鉴定,而 SSR 分子标记技术有着信息量高、重复性好、呈共显性遗传等特点^[15]成为天麻种质资源鉴定的首选技术。本研究选用了 7 对天麻 SSR 引物对 3 种变型、12 个种群共计 120 个样本进行了检测分析,并构建了天麻变型间 SSR 指纹图谱。

本研对 120 份样品进行群体遗传分析结果显示,7 对引物的平均观测杂合度(H_o)为 0.540 5,平均期望杂合度(H_e)为 0.792 3。7 对天麻 SSR 引物共获得 45 个变异位点,平均每对引物 6.43 个,说明 SSR 引物变异丰富。并且 7 对天麻 SSR 引物多态性信息含量(PIC)较高,平均为 0.759 7,表现出较

高的鉴别材料样本的能力,表明本研究所选用的 7 对 SSR 引物可用于天麻的种质资源鉴定。

天麻为中国二级保护植物,野生资源资源稀少,亟需保护。本研究对所有样本进行遗传多样性分析结果表明,天麻在物种水平上和变型水平上均有较高的遗传多样性(物种水平: $A = 6.428\ 6$, $I = 1.682\ 9$, $H = 0.789\ 0$;变型水平: $A = 2.666\ 6$, $I = 0.523\ 9$, $H = 0.812\ 6$),进化潜能丰富。同时 AMOVA 分析表明,在所有天麻样本中,主要遗传变异(44.14%)来自于各个种群之内,其次 38.18% 的遗传变异来自于变型之间,并且变型间遗传分化强烈($F_{ct}=0.381\ 8$)。随着天麻产业的快速发展,天麻的供需矛盾也日渐突出,尽管在全国范围内均有栽培,但野生天麻种质资源依旧遭到严重破坏,对天麻野生种质资源的保护已刻不容缓。天麻在物种水平上具有高度遗传多样性,且遗传分化强烈,因此首先应该对现有野生天麻种群进行就地保护。其

次,应对野生天麻种质资源进行广泛的收集与保存,建立天麻种质资源库,确保收集天麻种质资源中保留有该物种绝大部分的遗传信息。

Structure 聚类表明,当 $K=3$ 时, ΔK 出现最大峰值,此时聚类图将不同地域的相同天麻变型聚为一类,同一个产区内不同变型间基因渗透现象较少,这是由于在不同海拔上各个变型的分布比例不同,花期也存在一定差异,基因交流主要存在于同一变型间^[16]。本研究对 120 份样本进行居群主相关性分析(PCoA),其结果与 Structure 聚类结果一致。最终根据 PCoA 图以及 Structure 聚类显示 7 对引物可以完全区分所有供试天麻变型材料,7 对引物在变型水平上具有较高的鉴别能力,能用于今后对天麻种质资源的分析与评价。

参考文献:

[1] 陈心启, 吉占和, 郎楷永, 等. 中国植物志(第 18 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 29-33.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 58-59.

[3] 周慧君. 天麻有效成分的药理作用与临床应用研究进展[J]. 中医临床研究, 2016, **8**(22): 56-58.

ZHOU H J. A review on pharmacological action of active principle in *Gastrodia elata* and the clinical application[J]. *Clinical Journal of Chinese Medicine*, 2016, **8**(22): 56-58.

[4] 李德勋, 陈桂, 李辅碧, 等. 天麻不同变异类型药材中天麻素含量比较[J]. 现代中药研究与实践, 2007, **22**(3): 23-24.

LI D X, CHEN G, LI F B, *et al.* Comparison of *Gastrodia* from different variation types of *Gastrodia elata*[J]. *Research and Practice on Chinese Medicines*. 2007, **22**(3): 23-24.

[5] 梁纪军, 田大丰, 王中彦, 等. HPLC 法测定不同产地天麻中天麻素的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, **23**(1): 26-27.

LIANG J J, TIAN D F, WANG Z Y, *et al.* Determination of the contents of *Gastrodia* in Rhizoma *Gastrodiae* from different regions by HPLC[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2006, **23**(1): 26-27.

[6] GUICHOUX E, LAGACHE L, WAGNER S, *et al.* Current trends in microsatellite genotyping[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, **11**(4): 591-611.

[7] KAUR K, SHARMA V, SINGH V, *et al.* Development of novel SSR markers for evaluation of genetic diversity and population structure in *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae)[J]. *Biotech*, 2016, **6**(2): 156.

[8] ZHAO B, DU Y Q, LI J J, *et al.* Development of 18 novel microsatellite primers for *Begonia fimbriatipula* (Begoniaceae), an endangered medicinal plant in China [J]. *Applications in Plant Sciences*, 2016, **4**(7): 1600004.

[9] TIAN H Z, GUI F Z, *et al.* Characterization of EST-derived microsatellite loci in *Sarumahenryi* Oliv., an endangered Chinese en-

通过计算得出 Simpson 指数(D)为 0.998,表明所有天麻样本的基因型丰富度较高,在 120 个样本中共检测出了 106 个样本的基因型组成不同,其余 14 个个体仅共享 6 个基因型,且共享基因型的个体均在相同的种群中。结果表明本研究所选用的 7 对 SSR 引物在个体水平有着较高的鉴定效率。

本研究运用现代分子生物学研究手段,利用开发的引物对天麻进行群体遗传分析,并且建立适合天麻的种质资源鉴定体系。研究结果可为后期天麻的良种选育与质量控制提供技术方法与重要的科学依据。本研究结果表明,天麻不同变型遗传差异较大,因此根据天麻的花茎的颜色进行变型的分类是完全可靠的。本研究的结果也为天麻变型的分类提供了重要理论支撑。

demic herb[J]. *Conservation Genet Resource*, 2009, **1**: 67-70.

[10] 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): 1 728-1 735.

ZHOU T H, DING J X, TIAN W, *et al.* Genomic microsatellite characteristic analysis and molecular marker development for *Gastrodia elata* BL[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, **37**(9): 1 728-1 735.

[11] LIU K, MUSE SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. *Bioinformatics*, 2005, **21**(9): 2 128-2 129.

[12] MILBOURNE D, MEYER R, *et al.* Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato[J]. *Molecular Breeding*, 1997, **3**(2): 127-136.

[13] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, **155**(2): 945-959.

[14] EVANNO G, REGNAUT S, *et al.* Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study[J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(8): 2 611-2 620.

[15] 仇萍, 盛孝邦, 罗杰英, 等. DNA 指纹图谱与测序技术在中药品质鉴定中的研究概述[J]. 中医药导报, 2006, **11**: 77-79.

QIU P, SHENG X B, LUO J Y, *et al.* Overview on the studies of DNA finger printing and sequencing techniques in qualitative determination of Chinese Crude Drugs[J]. *Guiding Journal of TCM*, 2006, **11**: 77-79.

[16] 吴会芳, 李作洲, 黄宏文. 湖北野生天麻的遗传分化及栽培天麻的种质评价[J]. 生物多样性, 2006, **14**(4): 315-329.

WU H F, LI Z Z, HUANG H W. Genetic differentiation among natural populations of *Gastrodia elata* (Orchidaceae) in Hubei and germplasm assessment of the cultivated populations[J]. *Biodiversity Science*, 2006, **14**(4): 315-329.