

基于 ISSR 与 RAPD 标记分析内蒙古赤芍的遗传多样性

杜亚楠^{1,2,3}, 张敏^{1,2,3}, 孙淑英^{1,2,3*}, 陈贵林^{1,2,3}

(1 内蒙古大学 生命科学学院, 呼和浩特 010070; 2 内蒙古自治区中蒙药材规范化生产工程技术研究中心, 呼和浩特 010070; 3 牧草与特色作物生物学教育部重点实验室, 呼和浩特 010070)

摘要: 采用 ISSR 和 RAPD 分子标记技术对 28 个赤芍种群进行遗传变异和亲缘关系分析, 为准确地评价赤芍种质的遗传特征、资源保护及新品种选育提供理论依据。结果显示: (1) 利用分别筛选的 14 条 ISSR 和 RAPD 引物扩增出 257 条和 215 条条带, 其中多态性条带分别为 251 条和 209 条, 多态性条带百分率分别为 97.8% 和 97.2%; 同时证实野生赤芍种群的遗传多样性高于栽培种群。(2) 根据 Shannon's 信息指数 (I) 和 Nei's 基因多样性指数 (H_e) 值, 发现内蒙古多伦种群 (DL) 的遗传多样性水平最高, 建议在此地建立野生赤芍资源保护区。(3) 根据遗传分化系数 (G_{st}), 发现野生赤芍种群的遗传分化主要发生在种群内, 可能由遗传漂变引起; 而栽培赤芍种群的遗传分化主要在种群间, 说明栽培赤芍种群间的基因交流较少。(4) 两种分子标记的聚类分析结果均将 28 个赤芍种群聚为 5 大类, 遗传距离变化范围分别为 0.115 1~0.343 8 和 0.095 5~0.286 2。研究表明, 互相印证的 ISSR 和 RAPD 方法可以在 DNA 水平上更准确有效地分析赤芍种质资源的遗传结构和遗传多样性。

关键词: 赤芍; 遗传多样性; ISSR; RAPD; 资源保护

中图分类号: Q346⁺.5; Q789 **文献标志码:** A

Genetic Diversity Analysis of *Paeoniae Radix Rubra* from Inner Mongolia Using ISSR and RAPD

DU Ya'nan^{1,2,3}, ZHANG Min^{1,2,3}, SUN Shuying^{1,2,3*}, CHEN Guilin^{1,2,3}

(1 School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China; 2 The Good Agriculture Practice Engineering Technology Research Center of Chinese and Mongolian Medicine in Inner Mongolia, Hohhot 010070, China; 3 Key Laboratory of Herbage & Endemic Crop Biology, Ministry of Education, Hohhot 010070, China)

Abstract: We used ISSR and RAPD molecular markers to analyze the genetic variation and relationship of 28 *Paeoniae Radix Rubra* (PRR), which provides a biological foundation for accurately evaluating the genetic characteristics, protecting the germplasm resources and cultivating the excellent new varieties of PRR. The results showed that: (1) 257 and 215 bands were amplified by 14 ISSR and 14 RAPD markers. The polymorphic bands and polymorphism ratio were found to be 251, 209 and 97.8%, 97.2%, respectively. Two molecular markers showed that the genetic diversity of wild PRR population was higher than

收稿日期: 2021-03-10; 修改稿收到日期: 2021-05-08

基金项目: 内蒙古科技厅应用技术资金项目 (201702114)

作者简介: 杜亚楠 (1996-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物化学研究。E-mail: 370294040@qq.com

* 通信作者: 孙淑英, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药用植物资源与育种研究。E-mail: nmgsunshuying@163.com

that of cultivated population. (2) According to Shannon's information index (I) and Nei's gene diversity (H_e), the genetic diversity of population of Duolun County, Inner Mongolia (DL) was the highest, where can be recommended to establish a wild PRR nature reserve. (3) The genetic differentiation coefficient (G_{st}) indicated that the genetic differentiation of wild PRR populations was mainly within the population which may be caused by genetic drift. Conversely, the genetic differentiation of the cultivated PRR populations was mainly among the populations, indicating that there was less gene exchange among cultivated populations. (4) A UPGMA cluster grouped the 28 populations into 5 major clusters based on both ISSR and RAPD markers and their genetic distances were 0.115 1—0.343 8 and 0.095 5—0.286 2, respectively. This research shows that the complementary ISSR and RAPD methods can effectively analyze the genetic structure and genetic diversity of PRR populations at the DNA level.

Key words: *Paeoniae Radix Rubra*; genetic diversity; ISSR; RAPD; resource protection

遗传多样性是揭示物种适应环境的指标,也是物种与生俱来的特性^[1]。了解植物种群的遗传结构和变异程度,对于开展野生资源的保护和育种计划具有重要意义^[2]。在用于遗传分析的分子工具中,随机扩增多态性 DNA (RAPD)^[3] 和简单序列重复 (ISSR)^[4] 标记与简单序列重复 (SSR)、序列相关扩增多态性 (SRAP) 和目标起始密码子多态性 (SCoT) 等标记相比,具有节约成本、不需要序列信息、无需特定引物、操作简便快速等优点,被广泛应用于植物遗传多样性研究中^[5-7]。单一分子标记会使各项遗传参数产生偏差,检测多态性信息少,不能全面揭示物种的遗传多样性^[8]。ISSR 可以扩增基因组的内含子区域^[9],RAPD 可以同时扩增大量位点^[10],这两种分子标记的组合允许更程度的基因组覆盖。目前,ISSR 和 RAPD 两种分子标记结合广泛用于荔枝^[11]、竹子^[12]、红景天^[13]、茵芋^[14]、叶子花^[15] 及獐牙菜属^[16] 等植物的遗传变异、亲缘关系和遗传多样性研究中。

赤芍是中国常用的大宗药材,为毛茛科植物芍药 (*Paeoniae lactiflora* Pall.) 或川赤芍 (*Paeonia veitchii* Lynch) 的干燥根,具有清热凉血,散瘀止痛之功效^[17]。中国赤芍广泛分布于内蒙古、黑龙江和河北等省(区),其中内蒙古赤芍产量占据国内外供应市场近三分之一的份额,为重要的主产区^[18]。随着赤芍药材需求日益增加,野生赤芍资源经过半个世纪的无序采挖,特别是进入 21 世纪之后,已日趋枯竭,市场主要以栽培赤芍为主。但目前生产中赤芍种质混杂,来源不清,各地间盲目引种更加重了混杂程度,根本无法保证药材质量。为此,本研究从赤芍种群的遗传多样性角度解析其种群结构特征及亲缘关系,为赤芍的引种选育、优良种质挖掘和分子辅助育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试赤芍样本于 2017 年 9 月 25 日—10 月 8 日分别采自内蒙古自治区、黑龙江省和吉林省等地,共计 28 个赤芍种群,包括 12 个野生种群和 16 个栽培种群。每个种群采集 8 株健康赤芍的根部组织,迅速装入密封袋中,用硅胶干燥,带回实验室用去离子水清洗干净并编号,放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存。实验材料经内蒙古大学生命科学学院陈贵林教授鉴定为赤芍,样品采集地信息详见表 1。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取与质量检测 以单株赤芍的根组织样本为单位,使用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen) 提取 28 个种群 224 株赤芍样本的 DNA。经 1.3% 的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 核酸蛋白测定仪检测 DNA 质量与浓度后,存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 引物筛选与其检测 本研究初步筛选的 60 条 ISSR 引物参照 Zietkeiwicz 等^[4] 公布的序列,由上海生物工程技术公司合成。40 条 RAPD 分子标记引物^[19-20],由华大基因合成。用 2 个赤芍基因组 DNA 进行引物筛选,最后选取稳定、清晰和多态性条带丰富的 14 条 ISSR 引物和 14 条 RAPD 引物,并确定了其最佳退火温度,用于本实验研究。

ISSR 分子标记扩增的方法是按照 Liu 等^[21] 方法进行,并做了一些小的修改。反应体系的总体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$,包含 $2\text{ }\mu\text{L}$ ($20\text{ ng}/\mu\text{L}$) DNA 模板、 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$) 引物、 $9\text{ }\mu\text{L}$ ddH₂O 和 $12.5\text{ }\mu\text{L}$ 2×EsTaq Master Mix 酶 (TaKaRa)。PCR 扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,退火复性 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,循环 35 次; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

RAPD 分子标记 PCR 反应体系与循环参数参

表 1 赤芍种群采样点地理信息

Table 1 Collection information of the *Paeoniae Radix Rubra* populations

种质类型 Type	编号 No.	种群代码 Population code	来源 Source	地理坐标 Geo-coordinate	
野生 Wild	1-4	YKS1-YKS4	内蒙古呼伦贝尔市牙克石市牙克石农场 Yakeshi Farm, Yakeshi, Hulun Buir, Inner Mongolia	49°17'N 120°42'E	
	5	YKS5	内蒙古呼伦贝尔市牙克石市免渡河农场 MianDuHe Farm, Yakeshi, Hulun Buir, Inner Mongolia	49°12'N 120°25'E	
	6	ARQ	内蒙古呼伦贝尔市阿荣旗东兴村 Dongxing Village, Arong Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia	48°08'N 123°29'E	
	7	EEGN1	内蒙古呼伦贝尔市额尔古纳市 Ergun, Hulun Buir, Inner Mongolia	50°36'N 120°17'E	
	8	EEGN2	内蒙古呼伦贝尔市额尔古纳市拉布达林镇 Labudalin Town, Ergun, Hulun Buir, Inner Mongolia	50°13'N 120°11'E	
	9	ELC1	内蒙古呼伦贝尔市鄂伦春自治旗加格达奇区 Jiagedaqi District, Oroqen Autonomous Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia	50°35'N 123°44'E	
	10	ELC2	内蒙古呼伦贝尔市鄂伦春自治旗加格达奇区 Jiagedaqi District, Oroqen Autonomous Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia	50°32'N 123°42'E	
	11	DL	内蒙古锡林郭勒盟多伦县 Duolun County, Xilingol, Inner Mongolia	42°11'N 116°28'E	
	12	LK	黑龙江牡丹江市林口县朱家镇 Zhujia Town, Linkou County, Mudanjiang, Heilongjiang	47°23'N 123°55'E	
	栽培 Cultivated	13	HHHT1	内蒙古呼和浩特市玉泉区 Yuquan District, Hohhot, Inner Mongolia	40°49'N 111°41'E
		14	HHHT2	内蒙古呼和浩特市赛罕区 Saihan District, Hohhot, Inner Mongolia	40°42'N 111°39'E
		15	WNTQ1	内蒙古赤峰市翁牛特旗万隆泉村 Wanlongquan Village, Wengniute Banner, Chifeng, Inner Mongolia	42°56'N 119°01'E
16		WNTQ2	内蒙古赤峰市翁牛特旗万隆泉村 Wanlongquan Village, Wengniute Banner, Chifeng, Inner Mongolia	42°54'N 119°05'E	
17		YKS	内蒙古呼伦贝尔市牙克石农场 YaKeShi Farm, Hulun Buir, Inner Mongolia	49°17'N 120°42'E	
18		ARQ1	内蒙古呼伦贝尔市阿荣旗新兴村 Xinxing Village, Arong Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia	48°08'N 123°29'E	
19		ARQ2	内蒙古呼伦贝尔市阿荣旗永和村 Yonghe Village, Arong Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia	48°11'N 123°27'E	
20		ARQ3	内蒙古呼伦贝尔市阿荣旗东兴村 Dongxing Village, Arong Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia	48°08'N 123°29'E	
21		ELC3	内蒙古呼伦贝尔市鄂伦春自治旗大杨树镇 Dayangshu Town, Oroqen Autonomous Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia	50°35'N 123°44'E	
22		ELC4	内蒙古呼伦贝尔市鄂伦春自治旗加格达奇区 Jiagedaqi District, Oroqen Autonomous Banner, Hulun Buir, Inner Mongolia	50°35'N 123°44'E	
23		DL1	内蒙古锡林郭勒盟多伦县 Duolun County, Xilingol, Inner Mongolia	42°11'N 116°28'E	
24		ZLQ	内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗 Zhenglan Banner, Xilingol, Inner Mongolia	42°14'N 116°0'E	
25		LK1	黑龙江牡丹江市林口县朱家镇 Zhujia Town, Linkou County, Mudanjiang, Heilongjiang	47°23'N 123°55'E	
26		FS	吉林白山山市抚松县抚松镇 Fusong Town, Fusong County, Baishan, Jilin	41°56'N 126°26'E	
27		LY	河南洛阳市 Luoyang, Henan	35°02'N 112°45'E	
28		BZ	安徽亳州市 Bozhou, Anhui	34°24'N 115°18'E	

注:1-4 种群有距离

Note: 1-4 populations are far away from each other

照来明达等^[19]报道的方法进行。反应体系总体积为 25 μL , 包含 2 μL DNA 模板(20 ng/ μL)、1.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)引物、10 μL ddH₂O 和 11.5 μL 2 \times EsTaq Master Mix 酶(TaKaRa)。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 退火复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 循环 33 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。1.3% 琼脂糖凝胶观察扩增的 PCR 产物, 通过凝胶成像系统拍照, 记录结果。

1.3 数据统计与分析

将扩增产物进行拍照, 人工读带统计, 在凝胶的相同迁移位置上将有带记为“0”, 无带记为“1”, 输入到 Excel 中建立矩阵。利用 PopGene32 软件

对由野生和栽培的种质组成的两组矩阵数据进行分组分析, 计算多态性位点数(N_{PL})、多态性位点百分率(PPL)、观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H_e)、Shannon's 多样性信息指数(I)、遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)等遗传系数; 利用软件 NTsys Version 2.1 进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 扩增结果多态性分析

14 条 ISSR 引物共扩增得到 257 条清晰可重复条带, 平均每条引物扩增出 18.4 条条带, 多态性条

带为 251 条,平均每条引物扩增的多态性条带为 17.9 条,平均多态性比率为 97.8%。其中 ISSR UBC835 引物扩增的条带最多为 25 条,ISSR UBC860 引物扩增的条带最少为 14 条。

14 条 RAPD 引物共扩增出 215 条条带,平均每条引物扩增出 15.4 条带,多态性条带为 209 条,平

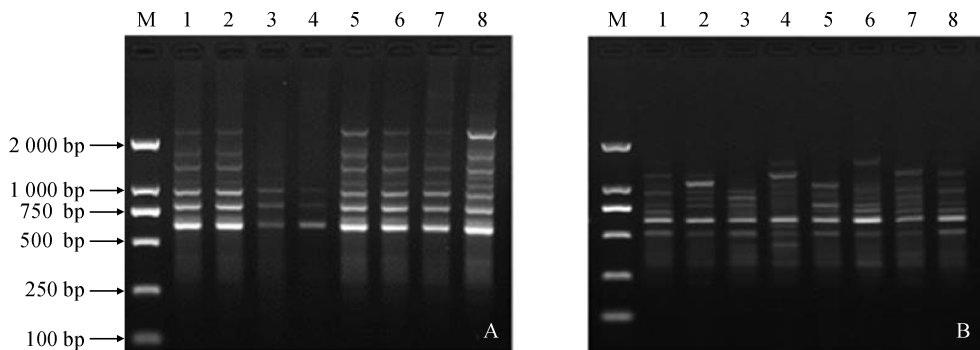
均每条引物扩增的多态性条带为 14.9 条,平均多态性比率为 97.2%。其中 RAPD S43、RAPD S1089 和 RAPD S1110 引物扩增的条带数最多为 18 条, RAPD S75 和 RAPD S1114 引物扩增的条带最少为 13 条(表 2)。两种标记扩增效率即多态带百分率数值相近,证明筛选的引物扩增条带清晰度和多态性

表 2 引物序列及扩增条带数

Table 2 The sequences of primers and the outcome of PCR amplification

引物及代号 Primer and code	序列 Sequence(5'→3')	退火温度 Annealing temperature	总条带数 Total number of bands	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性条带百分比 Polymorphism percentage/%
UBC807	(AG) ₈ T	55	16	16	100
UBC808	(AG) ₈ C	56.2	21	21	100
UBC813	(CT) ₈ T	47.7	17	16	94.1
UBC825	(AC) ₈ T	56.2	15	15	100
UBC834	(AG) ₈ YT	57	21	20	95.2
UBC835	(AG) ₈ YC	57	25	25	100
UBC841	(GA) ₈ YC	47.7	19	18	94.7
UBC845	(CT) ₈ RG	48.9	17	16	94.1
UBC850	(GT) ₈ YC	53.2	17	17	100
UBC855	(AC) ₈ YT	55	21	19	90.5
UBC860	(TG) ₈ RA	56.2	14	14	100
UBC866	(CTC) ₆	53.2	15	15	100
UBC888	BDB(CA) ₇	56.2	20	20	100
UBC848	(CA) ₆ RG	47	19	19	100
平均 Average			18.4	17.9	
总计 Total			257	251	97.8
S21	CAGGCCCTTC	36.8	14	14	100
S39	CAAACGTCGG	40.4	16	16	100
S43	GTCGCCGTCA	37.8	18	18	100
S72	GACGGATCAG	38.4	14	14	100
S75	GACGGATCAG	39.5	13	13	100
S191	GTCGTTCTG	39.4	15	15	100
S428	ACCTCAGCTC	41.1	17	17	100
S1050	GTTACCGCGA	36.8	16	16	100
S1076	CTGCGTGCTC	38.4	14	13	92.9
S1089	CAGCGAGTAG	39.4	18	17	94.4
S1090	AAGGCCCTG	37.8	15	14	93.3
S1100	TGGTTGCGGA	36.3	18	17	94.4
S1114	TCGCTGCGGA	39.4	13	13	100
S1130	CTGTGTGCTC	37.8	14	12	85.7
平均 Average			15.4	14.9	
总计 Total			215	209	97.2

注 Note:R=(A,G); Y=(C,T); B=(C,G,T); D=(A,G,T)



M, DL2000; 1-8. 多伦(DL)种群 8 株植株编号

图 1 引物 ISSR UBC807(A)和 RAPD S428(B)对多伦(DL)种群的扩增

M, DL2000; 1-8. No. of DL population's 8 samples

Fig. 1 Effect of primers ISSR UBC807 and RAPD S428 for amplification of Duolun (DL) population of *Paeoniae Radix Rubra*

较好,可用于本研究材料的遗传多样性分析。

ISSR 引物 UBC807 和 RAPD 引物 S428 对 DL 种群的扩增结果如图 1,扩增出的谱带稳定、清晰和多态性丰富,扩增片段长度约在 450~2 000 bp 之间。由扩增结果发现,ISSR 扩增出的条带清晰且多于 RAPD,对赤芍具有更强的检测能力。

2.2 遗传多样性分析

根据 ISSR、RAPD 两种分子标记得到的 0/1 矩阵,通过 PopGene32 软件,假定遗传平衡分别得到 28 个种群的遗传多样性参数,具体数据见表 3。在 28 个种群中,DL(内蒙古自治区锡林郭勒盟多伦县)种群各遗传参数最高,ELC3(内蒙古自治区呼伦贝尔市鄂伦春自治旗大杨树镇)种群最低。在野生种群中,DL 种群遗传多样性水平仍然最高,对其生存的环境适应能力最强;而 LK(黑龙江牡丹江市林口县朱家镇)种群的遗传多样性水平最低,对环境适应能力最弱。而在栽培种群中,YKS 种群(内蒙古呼伦贝尔牙克石市农牧场)遗传多样性最高,ELC3 种群最低。同时 ISSR 分子标记得出的多态性位点数、多态性条带百分率、 N_a 、 N_e 、 H_e 、 I 等值均高于 RAPD 分子标记,在一定程度上表明样品数相同、引物数相同时,ISSR 检测遗传多样性的能力较高,改进的 ISSR 可能是一种比 RAPD 更有效的研究赤芍植物系统发育的方法。

基于两种标记对赤芍群体遗传多样性结果的比较(表 4),28 个种群的多态性位点平均百分比分别为 39.57% 和 35.95%; N_a 平均值分别为 1.40 和 0.36; H_e 平均值分别为 0.15 和 0.13; I 平均值分别为 0.22 和 0.19,由此可见赤芍种群存在较高的遗传多样性。根据反映研究对象遗传多样性水平高

低指标的 I 和 H_e ,野生种群各遗传多样性指数平均值均高于栽培种群,即野生赤芍种群的遗传多样性水平高于栽培赤芍种群。

2.3 遗传分化分析

由表 5 可知,ISSR 和 RAPD 得到 28 个赤芍种群的总遗传多样性(H_t)分别为 0.32、0.27,种群内基因遗传多样性(H_s)结果为 0.15、0.12,那么群体之间的遗传多样性(D_{st})大小为 0.17、0.14。即遗传多样性在种群内占 46%、47%,在种群间则为 54%、53%,比较显示赤芍种群间的多样性水平大于种群内的。遗传分化系数是反映种群分化程度的指标, G_{st} 值在 0 至 0.05 之间,表示分化程度较弱; G_{st} 值在 0.05 至 0.15 之间代表中等分化程度; G_{st} 值在 0.15 至 0.25 之间表示较大的分化程度;大于 0.25 表示分化程度极大^[22],两种分子标记显示赤芍种群间的遗传分化程度较大,且栽培赤芍种群间的遗传分化程度大于野生种群。基因流(N_m)指生物个体在迁移过程中致使基因从一个种群到另一个种群的过程, N_m 在 0.44~0.47<1,说明种间产生了明显的遗传分化,28 个赤芍种群之间的基因流较为丰富。同时观察到野生种群比栽培种群 N_m 值高,且野生赤芍种群的遗传分化主要发生在种群内,这可能是由遗传漂变引起;而栽培赤芍种群之间的遗传分化较为明显,种群间的基因交流较少导致 N_m 值低。

2.4 聚类分析

根据 ISSR 的扩增结果得出 0/1 矩阵,经过 NTSYS2.10 软件计算的遗传距离构建聚类分析图,遗传距离变化范围为 0.115 1~0.343 8(图 2, A),28 个赤芍种群可约在遗传距离 0.234 处被分为 5 大类。第一类包括除了 LK 野生种群外的其余 11

表 3 28 个赤芍种群的 ISSR 与 RAPD 遗传多样性参数分析
Table 3 Genetic diversity analysis of 28 *Paeoniae Radix Rubra* populations by ISSR and RAPD

编号 Code	种群 Population	多态性位点 NPL			观测等位基因数 N _a			有效等位基因数 N _e			Net's 基因多样性 H _e			Shannon's 信息指数 I			
		ISSR	RAPD	PPL	ISSR	RAPD	PPL	ISSR	RAPD	PPL	ISSR	RAPD	PPL	ISSR	RAPD	PPL	ISSR
1	YKS1	115	81	44.75	1.45±0.50	1.38±0.49	37.67	1.27±0.37	1.20±0.33	0.16±0.20	0.12±0.18	0.23±0.28	0.19±0.26				
2	YKS2	105	93	40.68	1.41±0.50	1.43±0.50	43.26	1.26±0.37	1.28±0.38	0.15±0.20	0.16±0.20	0.22±0.28	0.23±0.29				
3	YKS3	123	96	47.86	1.48±0.50	1.45±0.50	44.65	1.27±0.37	1.26±0.37	0.16±0.20	0.15±0.20	0.24±0.28	0.23±0.28				
4	YKS4	119	81	45.14	1.45±0.50	1.38±0.49	37.67	1.27±0.37	1.27±0.38	0.16±0.20	0.15±0.21	0.23±0.28	0.22±0.29				
5	YKS5	113	97	43.97	1.44±0.50	1.45±0.50	45.12	1.31±0.41	1.27±0.37	0.17±0.21	0.16±0.20	0.25±0.30	0.24±0.28				
6	ARQ	136	96	52.92	1.53±0.50	1.45±0.50	44.65	1.34±0.39	1.29±0.38	0.19±0.21	0.16±0.20	0.29±0.29	0.24±0.29				
7	EEGN1	105	73	40.86	1.41±0.49	1.34±0.47	33.95	1.29±0.40	1.22±0.35	0.16±0.21	0.12±0.19	0.23±0.30	0.18±0.27				
8	EEGN2	93	96	36.19	1.36±0.48	1.45±0.50	44.65	1.22±0.34	1.28±0.37	0.13±0.19	0.16±0.20	0.19±0.27	0.24±0.29				
9	ELC1	106	78	41.25	1.41±0.49	1.36±0.48	36.28	1.25±0.36	1.22±0.35	0.14±0.19	0.12±0.19	0.22±0.28	0.17±0.27				
10	ELC2	108	100	42.02	1.42±0.49	1.47±0.50	46.51	1.27±0.37	1.28±0.37	0.15±0.20	0.16±0.20	0.23±0.29	0.24±0.28				
11	DL	156	115	60.70	1.61±0.49	1.53±0.50	53.49	1.39±0.40	1.30±0.36	0.22±0.20	0.17±0.19	0.33±0.29	0.26±0.28				
12	LK	82	57	31.91	1.32±0.47	1.27±0.44	26.51	1.22±0.35	1.15±0.30	0.12±0.19	0.09±0.17	0.18±0.28	0.13±0.24				
13	HHHT1	78	40	30.35	1.30±0.46	1.19±0.39	18.60	1.20±0.35	1.13±0.30	0.11±0.19	0.07±0.16	0.17±0.27	0.11±0.23				
14	HHHT2	93	73	36.19	1.36±0.48	1.34±0.48	33.95	1.24±0.37	1.23±0.36	0.14±0.20	0.13±0.20	0.20±0.28	0.19±0.28				
15	WNTQ1	90	47	35.02	1.35±0.48	1.22±0.41	21.86	1.25±0.38	1.15±0.32	0.14±0.20	0.08±0.17	0.20±0.29	0.12±0.24				
16	WNTQ2	110	88	42.80	1.42±0.50	1.41±0.50	40.93	1.28±0.38	1.24±0.36	0.16±0.20	0.14±0.19	0.24±0.29	0.21±0.28				
17	YKS	132	109	51.36	1.51±0.50	1.51±0.50	50.70	1.34±0.40	1.32±0.40	0.19±0.21	0.18±0.20	0.28±0.30	0.27±0.29				
18	ARQ1	101	53	39.30	1.39±0.49	1.25±0.43	24.65	1.26±0.37	1.15±0.31	0.15±0.20	0.08±0.17	0.22±0.29	0.13±0.24				
19	ARQ2	116	69	45.14	1.45±0.50	1.32±0.47	32.09	1.31±0.40	1.18±0.32	0.17±0.21	0.11±0.18	0.25±0.30	0.16±0.25				
20	ARQ3	102	81	39.69	1.40±0.49	1.38±0.49	37.67	1.24±0.35	1.26±0.38	0.14±0.19	0.14±0.20	0.21±0.28	0.21±0.29				
21	ELC3	43	36	16.73	1.17±0.37	1.18±0.37	16.74	1.11±0.28	1.12±0.29	0.06±0.15	0.07±0.16	0.09±0.22	0.10±0.22				
22	DL1	120	75	46.69	1.47±0.50	1.35±0.48	34.88	1.29±0.37	1.20±0.33	0.17±0.20	0.12±0.18	0.25±0.29	0.17±0.26				
23	ZLQ	88	64	32.24	1.34±0.48	1.30±0.46	29.77	1.24±0.37	1.18±0.32	0.13±0.20	0.11±0.18	0.19±0.28	0.16±0.26				
24	LK1	57	56	22.18	1.22±0.42	1.26±0.44	26.05	1.15±0.32	1.17±0.33	0.09±0.17	0.10±0.18	0.13±0.25	0.14±0.26				
25	FS	74	60	28.79	1.29±0.45	1.28±0.45	27.91	1.20±0.35	1.16±0.32	0.11±0.19	0.09±0.17	0.17±0.27	0.14±0.25				
26	LY	107	93	41.63	1.42±0.49	1.43±0.50	43.26	1.26±0.36	1.24±0.35	0.15±0.20	0.15±0.19	0.22±0.28	0.22±0.27				
27	BZ2	87	54	33.85	1.34±0.47	1.25±0.43	25.12	1.21±0.35	1.17±0.33	0.12±0.19	0.09±0.18	0.18±0.27	0.14±0.25				
28	ELC4	97	103	37.74	1.38±0.49	1.48±0.50	47.91	1.22±0.35	1.29±0.37	0.13±0.19	0.17±0.20	0.19±0.27	0.25±0.29				

注:代号同表 1 Note: The population codes are same as Table 1

表 4 赤芍群体 ISSR 和 RAPD 遗传多样性结果比较

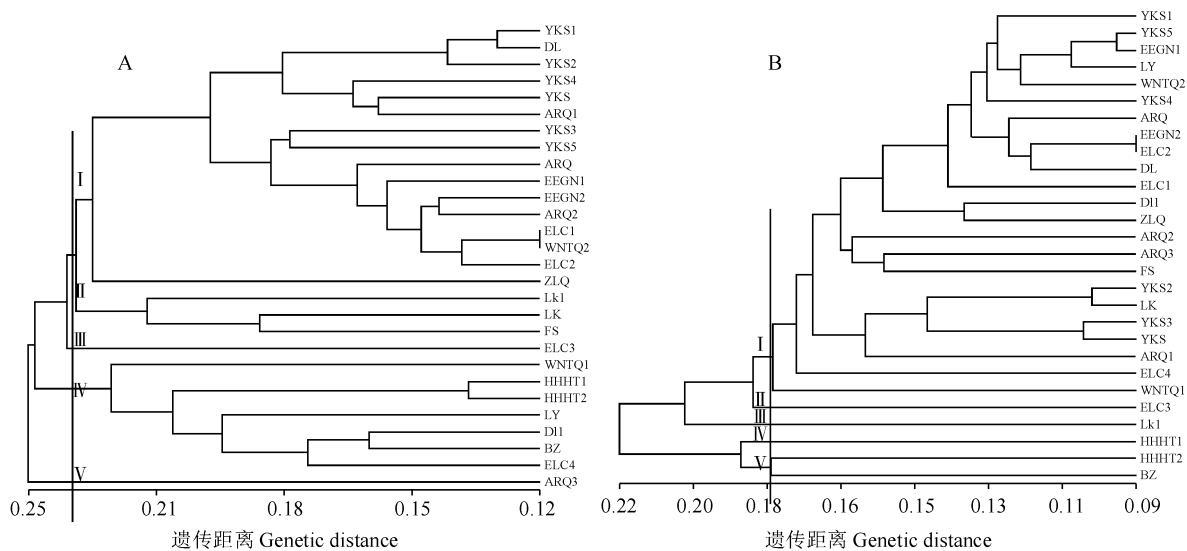
Table 4 Genetic diversity analysis of Paeoniae Radix Rubra by ISSR and RAPD

标记 Marker	种质类型 Type	<i>NPL</i>	<i>PPL</i>	N_a	N_e	H_e	<i>I</i>
ISSR	野生 Wild	113	44.02	1.44±0.49	1.28±0.38	0.25±0.20	0.24±0.29
	栽培 Cultivated	93	36.23	1.36±0.47	1.24±0.36	0.14±0.19	0.20±0.28
	全部 Total	102	39.57	1.40±0.48	1.26±0.37	0.15±0.20	0.22±0.18
RAPD	野生 Wild	89	41.20	1.41±0.48	1.25±0.35	0.15±0.19	0.21±0.17
	栽培 Cultivated	70	32.01	1.32±0.46	1.20±0.34	0.11±0.18	0.17±0.26
	全部 Total	77	35.95	1.36±0.47	1.22±0.35	0.13±0.19	0.19±0.27

表 5 基于 ISSR 和 RAPD 的赤芍种群的遗传分化分析

Table 5 Coefficient of genetic differentiation for geographic populations of Paeoniae Radix Rubra

标记 Marker	种质类型 Type	H_t	H_s	D_{st}	G_{st}	N_m
ISSR	全部 Total	0.32	0.15	0.17	0.54	0.44
	野生 Wild	0.29	0.16	0.13	0.46	0.60
	栽培 Cultivated	0.31	0.14	0.17	0.56	0.40
RAPD	全部 Total	0.27	0.12	0.14	0.53	0.47
	野生 Wild	0.25	0.14	0.11	0.42	0.70
	栽培 Cultivated	0.27	0.11	0.16	0.57	0.38



种群编号同表 1

图 2 基于 ISSR (A)和 RAPD (B)的 UPGMA 聚类结果图

The population codes are same as Table 1

Fig. 2 UPGMA dendrogram based on ISSR (A) and RAPD (B) markers

个野生种群,还有 YKS、ARQ1、ARQ2、WNTQ2 和 ZLQ 5 个栽培种群组成;第二类包括 LK、LK1 和 FS 种群,这 3 个种群分别来自黑龙江省和吉林省;第三类只包括 ELC3 种群;第四类包括 WNTQ1、DL1、BZ、ELC4、LY、HHHT1、HHHT2 种群;第五类只包括 ARQ3 种群。

基于 RAPD 分子标记与 ISSR 方法得到的结果相似,遗传距离变化范围为 0.095 5~0.286 2,在遗传距离 0.179 处同样将 28 个赤芍种群分为 5 类(图 2,B)。第一类包括 23 个种群,其中包括了全部 12 个野生赤芍种群和大部分栽培赤芍种群,野生赤芍种群和栽培赤芍种群没有完全分开;第二类由

ELC3 种群单独聚为一类;第三类只有 LK1 种群;第四类 HHHT1 种群单独聚为一类;第五类由 HHHT2 和 BZ2 组成。

两种分子标记的聚类结果显示 YKS、ARQ1、ARQ2、WNTQ2 和 ZLQ 等 5 个栽培种群总是与野生种群聚在一类,说明这 5 个栽培赤芍种群与野生赤芍种群的亲缘关系较近;且均显示栽培赤芍种群 ELC3 是独立聚类的,该种群与其他栽培赤芍种群相比差异显著,亲缘关系较远,具有独特的遗传背景。ISSR 结果中 LK、LK1 和 FS 种群聚为一类,这 3 个种群分别来自黑龙江省和吉林省,证明种质聚类与地理分布有一定的相关性。但不完全一致,RAPD 聚类中同是栽培种的安徽亳州 BZ 和内蒙古呼和浩特 HHHT2 种质聚在一起,以及 ISSR 聚类结果中 ELC1 和 WNNTQ1 种群、RAPD 聚类结果中 EEGN2 和 ELC2 种群也未完全分开,这可能存在人为引种等原因导致它们在遗传背景上相似。

3 讨 论

分子标记被认为是最可靠、最有力的种质资源鉴定手段^[23]。不同分子标记的结合使用可以根据各自的特点检测基因组的的不同部分,提高多态性位点的覆盖率和均匀度,弥补一种分子标记带来的局限性和弊端^[24, 25]。在评价赶黄草^[26]、野生艾蒿^[27]和红花^[28]种质遗传多样性的研究中发现多种分子标记技术的使用可以互相验证结果,从多方面、多角度地了解植物资源的遗传信息,有效地揭示种质之间的遗传多样性。近年来,国内外学者对芍药属进行了大量的遗传多样性研究,主要是探讨牡丹的种间亲缘关系^[29, 30]和观赏芍药的群体遗传关系^[31-32],而关于药用芍药遗传结构的研究多集中于白芍^[33-34]。内蒙古作为赤芍的道地产区,因其优越的自然地理条件及退耕还林政策,赤芍的蕴藏量十分丰富,目前对该地区赤芍道地药材的分子遗传研究鲜有报道。本研究应用 ISSR 和 RAPD 两种分子标记评估不同赤芍种群遗传多样性水平、遗传变异以及种群之间的亲缘关系,对于就地保护野生赤芍种质资源和内蒙古赤芍产业的发展具有重要意义。

在本研究中,ISSR 和 RAPD 两种分子标记分析均发现内蒙古锡林郭勒盟多伦县种群(DL)的赤芍遗传多样性水平最高,而近代以来一直推崇内蒙古多伦县所产的野生赤芍为最佳道地药材,使得多伦亦处于生产性赤芍资源濒危状态。因此,亟需就地建立自然保护区,制定赤芍资源保护策略,尽快开展优良种质基因库的保护、研究及科学引种工作。通过历代本草的记载发现,野生赤芍产区随着野生资源的枯竭逐渐北移,目前主产区已转至呼伦贝尔等地^[35]。来自呼伦贝尔市的大部分赤芍野生种群具有较丰富的遗传多样性,是选育优良药用和观赏品种的物质基础;而栽培赤芍种群遗传多样性降低,可能是由于栽培赤芍所用繁殖材料主要取自野生资源并以分根的方式克隆繁殖,且药农多从经济价值角度出发,主观选择根较粗壮的植株种植,使得群体的种质趋于单一;另外在栽培种群引种驯化过程中,参与驯化的野生种群偏小影响其基因频率的变化,遗传多样性逐渐变窄。

两种标记的聚类结果虽都将野生种群聚在一类,但栽培赤芍种群和野生赤芍群体之间有所交叉,未完全分开,可能是由于栽培赤芍的种源多来源于野生种,且初期栽培种多用种苗和芽头无性繁殖^[36]。在雪莲果遗传研究中认为,无性繁殖的营养性质会使其遗传变异性变低^[37],使得栽培种与野生种之间的性状差异并不显著,因而难以按产地聚类。独自聚类的 ELC3 种群在所有种群中具有最低水平的遗传多样性,根据第四次中药资源普查了解到内蒙古鄂伦春自治旗(县)赤芍种植历史悠久,ELC3 可能是在人工驯化过程中形成了独特的基因型种质,可作为优质赤芍新品种进行进一步培育。对药用植物而言,次生代谢物是临床疗效的物质基础,丰富的化学成分多样性使其具有更高的进化潜力和应用价值^[38]。次生代谢物的合成和积累主要受内部遗传基础和外部环境因素的影响。因此,基于本研究基础,扩大采样区域,结合化学成分及环境因子对赤芍资源进行更加全面系统的分析和评价,以保存和挖掘优良的基因型和化学型,为赤芍原位保护、遗传改良和品种选育提供科学依据。

参考文献:

[1] ZIRBEL CR, GRMAN E, BASSETT T, *et al.* Landscape context explains ecosystem multifunctionality in restored

grasslands better than plant diversity[J]. *Ecology*, 2019, **100** (4): e02634.

[2] ZHANG Y, ZHANG X J, CHEN X, *et al.* Genetic diversity

- and structure of tea plant in Qinba area in China by three types of molecular markers[J]. *Hereditas*, 2018, **155**: 22.
- [3] WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(22): 6 531-6 535.
- [4] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, **20**(2): 176-183.
- [5] WANG C, ZHANG H, QIAN Z Q, *et al.* Genetic differentiation in endangered *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino based on ISSR polymorphism and its implications for conservation [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2008, **36**(9): 699-705.
- [6] 李 菁, 张小飞, 陈珏屹, 等. 基于 ISSR 分子标记的西藏构兰种群遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(6): 969-977.
- LI J, ZHANG X F, CHEN J Y, *et al.* Genetic diversity of *Cypripedium tibeticum* populations revealed by ISSR analysis [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(6): 969-977.
- [7] SIRIJAN M, DRAPAL M, CHAIPRASART P, *et al.* Characterisation of Thai strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars with RAPD markers and metabolite profiling techniques[J]. *Phytochemistry*, 2020, **180**: 112 522.
- [8] MULPURI S, MUDDANURU T, FRANCIS G. Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker[J]. *Plant Science*, 2013, **207**: 117-127.
- [9] BORNET B, BRANCHARD M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, **19**(3): 209-215.
- [10] KUMARI N, THAKUR S K. Randomly amplified polymorphic DNA-A brief review[J]. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2014, **9**(1): 6-13.
- [11] LONG Y, CHENG J L, MEI Z Q, *et al.* Genetic analysis of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) in southern China by improved random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2015, **42**(1): 159-166.
- [12] AMOM T, TIKENDRA L, APANA N, *et al.* Efficiency of RAPD, ISSR, iPBS, SCoT and phytochemical markers in the genetic relationship study of five native and economical important bamboos of North-East India[J]. *Phytochemistry*, 2020, **174**: 112 330.
- [13] 王梦亮, 任晓琳, 崔晋龙, 等. 野生红景天的 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析[J]. 中草药, 2016, **47**(3): 469-473.
- WANG M L, REN X L, CUI J L, *et al.* Genetic diversity of wild plants in *Rhodiola* L. with two molecular marker methods of RAPD and ISSR[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, **47**(3): 469-473.
- [14] GIACHINO RRA. Investigation of the genetic variation of anise (*Pimpinella anisum* L.) using RAPD and ISSR markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2020, **67**(3): 763-780.
- [15] 唐源江, 武晓燕, 曹雯静. 叶子花种质资源遗传多样性及亲缘关系的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(7): 1 325-1 332.
- TANG Y J, WU X Y, CAO W J. Genetic diversities and phylogenetic relationships of *Bougainvillea* germplasm resources based on RAPD and ISSR markers[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, **33**(7): 1 325-1 332.
- [16] KAUR P, PANDEY DK, GUPTA RC, *et al.* Assessment of genetic diversity among different population of five *Swertia* species by using molecular and phytochemical markers[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, **138**: 111 569.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [18] 丁立威. 赤芍产供销趋势分析[J]. 中国现代中药, 2013, **15**(5): 426-430.
- [19] 来明达, 陈 莹, 朱振洪, 等. 不同居群白芍的 DNA 随机扩增多态性研究[J]. 中国现代医药杂志, 2012, **14**(2): 4-6.
- LAI M D, CHEN Y, ZHU Z H, *et al.* Studies on RAPD polymorphism of radix paeoniae alba from different natural populations[J]. *Modern Medicine Journal of China*, 2012, **14**(2): 4-6.
- [20] 郭先锋, 王莲英. 部分芍药种质资源的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2007, **34**(5): 1 321-1 326.
- GUO X F, WANG L Y. Genetic relationship of partial peony germplasm resources with RAPD marker[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, **34**(5): 1 321-1 326.
- [21] LIU G D, CHEN G L, LI W, *et al.* Genetic and phytochemical diversities of *Cynomorium songaricum* Rupr. in Northwest China indicated by ISSR markers and HPLC-fingerprinting[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, **48**: 34-41.
- [22] BUSO GSC, RANGEL P H, FERREIRA M E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers [J]. *Molecular Ecology*, 1998, **7**(1): 107-117.
- [23] RAY A, JENA S, HALDAR T, *et al.* Population genetic structure and diversity analysis in *Hedychium coronarium* populations using morphological, phytochemical and molecular markers[J]. *Industrial Crop and Products*, 2019, **132**: 118-133.
- [24] GOGOI B, WANN SB, SAIKIA SP. Comparative assess-

- ment of ISSR, RAPD, and SCoT markers for genetic diversity in *Clerodendrum* species of North East India[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, **47**(10): 7 365-7 377.
- [25] ETMINAN A, POUR-ABOUGHADAREH-A, MOHAMMADI R, *et al.* Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016, **30**(6): 1 075-1 081.
- [26] MEI Z Q, ZHANG X Q, IMANI S, *et al.* Genetic analysis of *Penthorum chinense* Pursh by improved RAPD and ISSR in China[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, **30**: 6-11.
- [27] YOUNSI F, RAHALI N, MEHDI S, *et al.* Relationship between chemotypic and genetic diversity of natural populations of *Artemisia herba-alba* Asso growing wild in Tunisia[J]. *Phytochemistry*, 2018, **148**: 48-56
- [28] GOLKAR P, MOKHTARI N. Molecular diversity assessment of a world collection of safflower genotypes by SRAP and SCoT molecular markers[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2018, **24**(6): 1 261-1 271.
- [29] 陈 燕, 李婉茹, 唐 红. 不同花色紫斑牡丹的 CDDP 体系优化及其遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2018, **38**(10): 1 823-1 831.
- CHEN Y, LI W R, TANG H. System optimization and genetic diversity of different color *Paeonia rockii* by CDDP makers [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, **38**(10): 1 823-1 831.
- [30] DUAN Y B, GUO D L, GUO L L, *et al.* Genetic diversity analysis of tree peony germplasm using iPBS markers[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, **14**(3): 7 556-7 566.
- [31] LI L, CHENG F Y, ZHANG Q X. Microsatellite markers for the Chinese herbaceous peony *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2011, **98**(2): e16-8.
- [32] 李珂楠, 杨成龙, 范竟超. 基于 SSR 标记的芍药种质资源遗传多样性研究[J]. 种子, 2020, **39**(3): 57-60.
- LI K N, YANG C L, FAN J C. Genetic diversity of *Paeonia lactiflora* germplasm based on SSR markers [J]. *Seed*, 2020, **39**(3): 57-60.
- [33] 周红涛, 胡世林, 郭宝林, 等. 芍药野生与栽培群体的遗传变异研究[J]. 药学学报, 2002, **37**(5): 383-388.
- ZHOU H T, HU S L, GUO B L, *et al.* A study on genetic variation between wild and cultivated populations of *Paeonia lactiflora* Pall. [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2002, **37**(5): 383-388.
- [34] 周佐斌. 白芍原植物种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[D]. 南昌:南昌大学, 2007.
- [35] 赵佳琛, 翁倩倩, 张 悦, 等. 经典名方中芍药类药材的本草考证[J]. 中国中药杂志, 2019, **44**(24): 5 496-5 502.
- ZHAO J C, WENG Q Q, ZHANG Y, *et al.* Textual research on Chinese herbaceous peony in Chinese classical prescriptions[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, **44**(24): 5 496-5 502.
- [36] 谢 婷, 周 萌, 李 鑫, 等. 多伦赤芍野生植株和芽头无性栽培植株生物学性状和芍药苷含量对比研究[J]. 中国中药杂志, 2015, **40**(24): 4 830-4 833.
- XIE T, ZHOU M, LI X, *et al.* Comparative study of biological characters and paeoniflorin content of wild and asexual cultivated *Paeonia lactiflora* growing at Duolun County, Inner Mongolia[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, **40**(24): 4 830-4 833.
- [37] ZIAROVSKA J, PADILLA-GONZALEZ G F, VIEHMAN-NOVA I, *et al.* Genetic and chemical diversity among yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] accessions based on iPBS markers and metabolomic fingerprinting[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, **141**: 183-192.
- [38] LI Y Q, KONG D X, FU Y, *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, **148**: 80-89.

(编辑:宋亚珍)