

基于表型性状和SSR标记的知母遗传多样性及关联分析

狄根森¹, 闫立萱¹, 任俊男¹, 吴立柱², 王泽永¹, 马春英¹

(¹河北农业大学农学院, 保定 071000; ²河北农业大学生命科学学院, 保定 071000)

摘要: 为明确知母(*Anemarrhena asphodeloides*)种内种质的遗传背景,本研究利用聚类分析和主成分分析等方法,对160份知母种质材料进行了基于表型性状和SSR分子标记的遗传多样性分析。结果表明,21个表型性状的多样性指数变化范围为0.99~7.60,均值为1.99;变异系数的变化范围为17.22%~151.07%,均值为51.49%。采用新开发的27对SSR引物对160份知母种质材料进行毛细管电泳,共检测到143个等位基因,有效等位基因数变幅为0.56~7.40,均值为3.54;Shannon's信息指数变幅为0.17~0.51,均值为0.36;多态信息含量变幅为0.15~0.50,均值为0.38。聚类分析表明,160份知母种质材料并没有明显的分开,但部分同来源的知母成簇出现。主成分分析与聚类分析相互验证,也呈现相似的结果,这可能与不同地区的知母种植者频繁交换种子种苗有关。本研究通过卡方检验和T检验筛选出与6个表型性状相关联的9个SSR标记,可用于知母分子标记辅助育种。

关键词: 知母;表型性状;SSR标记;遗传多样性;关联分析

Genetic Diversity and Correlation Analysis of *Anemarrhena asphodeloides* Based on Phenotypic Traits and SSR Markers

DI Gensen¹, YAN Lixuan¹, REN Junnan¹, WU Lizhu², WANG Zeyong¹, MA Chunying¹

(¹College of Agronomy, Hebei Agricultural University, Baoding 071000; ²College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000)

Abstract: In order to clarify the genetic background of the germplasm of *Anemarrhena asphodeloides*, the genetic diversity of 160 germplasm materials of *A. asphodeloides* was analyzed based on phenotypic traits and SSR markers using cluster analysis and principal component analysis. The results showed that the diversity index of 21 phenotypic traits ranged from 0.99 to 7.60, with an average value of 1.99. The coefficient of variation ranged from 17.22% to 151.07%, with an average of 51.49%. A total of 143 alleles were detected by capillary electrophoresis using 27 pairs of newly developed SSR primers. The effective alleles ranged from 0.56 to 7.40, with an average of 3.54. Shannon's information index ranges from 0.17 to 0.51, with an average value of 0.36. Polymorphism information content (PIC) ranged from 0.15 to 0.50, with an average of 0.38. Cluster analysis showed that there was no obvious separation of 160 germplasm materials, but some of the same source of germplasm appeared in clusters. Principal component analysis and cluster analysis verified each other and showed similar results, which may be related to the frequent exchange of seeds and seedlings by the seed growers in different regions. In this study, 9 SSR markers associated with 6 phenotypic traits were screened by Chi-square test and T-test, which could be used for marker assisted breeding of female breeding.

Key words: *Anemarrhena asphodeloides*; phenotypic traits; SSR markers; genetic diversity; correlation analysis

收稿日期: 2024-05-27 网络出版日期: 2024-11-22

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240527001>

第一作者研究方向为药用植物栽培, E-mail: dgs0623@163.com

通信作者: 马春英, 研究方向为药用植物资源培育, E-mail: bushbucker@126.com

基金项目: 河北省自然科学基金项目(H2023204001)

Foundation project: Natural Science Foundation of Hebei (H2023204001)

知母 (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge) 为百合科知母属多年生草本植物, 具有2000多年的药用历史^[1], 在世界范围内主要分布在中国、蒙古、韩国、日本等东亚国家^[2]。知母最早记载于中国的《尔雅》, 称其为“茝藩”^[3], 《广雅》称其为“茝母”, 《本草纲目》中李时珍将其定义为“知母”^[4]。知母的根状茎入药, 性味苦、甘、寒, 归肺、胃、肾经, 具有清热泻火, 滋阴润燥的功效, 用于外感热病、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘等症^[5]。研究证明其化学成分主要包括皂苷类、双苯吡酮类、生物碱类、氨基酸类、挥发油类等物质, 现代药理研究表明, 知母具有降血糖、解热、抗炎、利尿, 抗癌, 抗抑郁, 改善老年性痴呆, 改善骨质疏松等多种功效^[6-7]。随着中医药卫生事业的发展, 知母的市场需求量不断增加, 引起人们掠夺式的过度采挖, 导致知母野生资源日趋匮乏。为了解决知母野生资源供不应求的现状, 人工栽培知母、仿野生栽培知母等已进入市场。我国栽培知母主产于河北、山西、陕西、甘肃、内蒙古、安徽等地, 河北易县为知母道地产区^[8]。由于知母药材栽培历史短, 生产上尚无品种, 而不同地区的知母种植者会通过不同渠道交换种子种苗, 导致种质混杂, 药材产量与质量参差不齐, 与药材产量和质量密切相关的表型性状也表现出丰富的多样性, 如何鉴定和利用这些表型性状对知母新品种选育及遗传改良具有重要的意义。

遗传多样性是生物多样性的基础, 也是物种稳定和持续进化的动力。遗传多样性的研究方法包括形态学和分子标记技术等^[9]。其中, 形态学是最简单方便的标记方法, 可以在一定程度上揭示植物遗传变异的程度。但形态特征容易受到生态条件

的影响, 仅使用形态标记进行遗传多样性研究具有一定的局限性^[10]。DNA分子标记因不受生态因子的影响, 近年来已经成为研究种质资源遗传多样性及分子辅助育种的重要手段, 主要包括RFLP、RAPD、AFLP、SSR标记等。SSR标记也称微卫星序列标记, 以其数量丰富、共显性遗传、多态性丰富等优点被广泛应用于药用植物的遗传多样性分析和亲缘关系鉴定等领域^[11-13]。目前尚无SSR标记在知母上应用的报道, 因此开发知母SSR标记, 筛选与知母产量和质量相关的表型性状和SSR标记, 是分子标记辅助育种的关键步骤, 对于提高知母的产量及药用功效具有开创性的意义。

本研究采用磁珠法开发27对SSR分子标记, 并利用统计分析、聚类分析、主成分分析及综合评价等方法对来自我国道地产区和非道地产区的160份知母种质进行表型性状和分子标记的遗传多样性分析, 筛选与表型性状相关联的SSR分子标记, 为知母种质资源鉴定以及分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究材料为不同来源、多年生的知母种质资源160份(表1), 其中河北省易县宝石村阳生仿野生知母95株、河北省易县宝石村阴生仿野生知母(板栗树下种植知母)42株、安徽省亳州市栽培知母1株、广东省韶关市栽培知母21株和河北农业大学教学实验基地栽培知母1株, 均由河北农业大学农学院马春英副教授鉴定为百合科植物知母 (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)。

表1 供试材料来源

Table 1 Source of test materials

序号 No.	来源 Source	缩写 Abbreviation	样本数 Sample size	样本编号 Sample number
1	河北省易县宝石村阳生仿野生知母	易县阳生	95	1~95
2	河北省易县宝石村阴生仿野生知母	易县阴生	42	X01~X42
3	广东省韶关市栽培知母	韶关栽培	21	G01~G21
4	安徽省亳州市栽培知母	亳州栽培	1	A01
5	河北省河北农业大学教学实验基地栽培知母	农大栽培	1	S01

1.2 表型性状调查

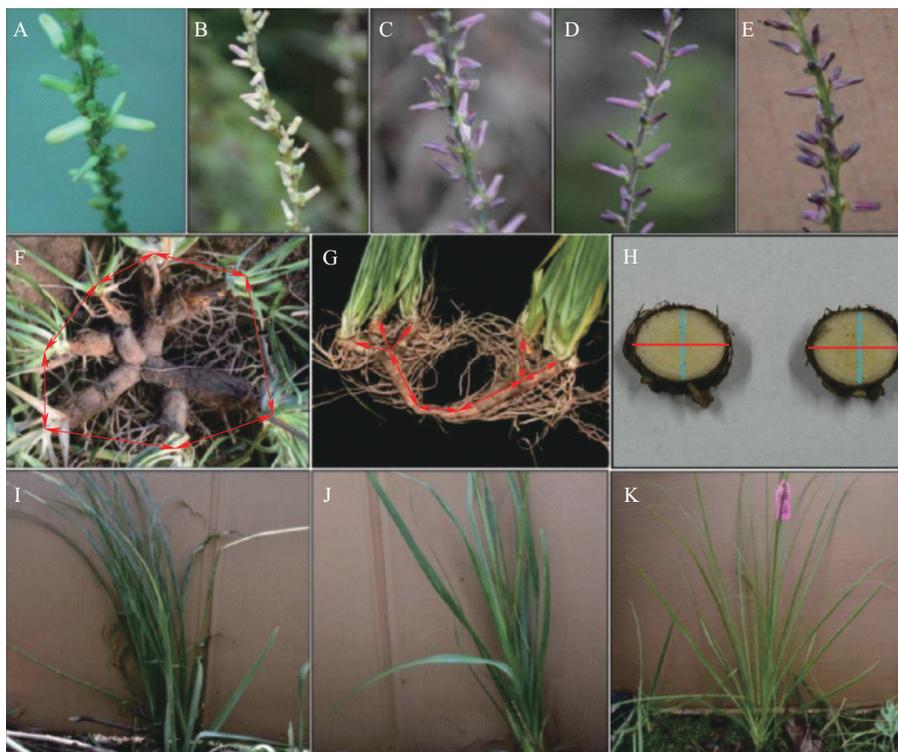
2022 年 6 月 20-23 日, 在知母道地产区河北易县宝石村, 于知母生长旺盛期选择阳生和阴生条件下两个知母群体, 对表型性状有明显差异的单株进行地上部 13 个性状调查并挂牌标记。2022 年 10 月份在药材收获期将标记知母挖出, 调查 6 个地下部性状, 同时将每个单株带芦头部分种植于易县宝石村。韶关市栽培知母、亳州市栽培知母、河北农业大学教学实验基地栽培知母为邮寄的成熟期样品, 只调查了地下部表型性状和部分地上部分蘖数、主

分蘖叶数、叶长、叶宽 4 个表型性状, 未调查生长旺盛期花色, 主花茎长, 主花茎粗等地上部表型性状。由于带芦头的一部分根茎需继续种植用于后续性状观察, 无法准确测量单株根茎产量数据, 因此本研究使用单株根茎体积代表单株根茎产量, 同时为了便于分析, 将成熟期知母根茎中的芒果苷含量和新芒果苷含量两个指标列入表型性状。综上, 本研究共测定 21 个表型性状, 包括 19 个数量性状和 2 个质量性状, 2 个质量性状分别为株型和花色。各性状测量方法见表 2。知母部分表型性状见图 1。

表 2 表型性状测定标准

Table 2 Criteria for the determination of phenotypic traits

性状 Traits	测定方法 Assay method	单位 Unit
分蘖数 Tiller number	单株分蘖的个数	个
单株外围周长 Perimeter of individual plant	单株所有分蘖围成的外围长度	cm
主分蘖叶数 Leaf number of main tiller	每个单株主分蘖上叶片的个数	片
叶长 Leaf length	主分蘖短缩茎中部第 4、5、6 片叶片基部至叶尖长度的平均值	cm
叶宽 Leaf width	主分蘖短缩茎中部第 4、5、6 片叶片最宽处的平均值	cm
主花茎长 Length of main flower stalk	主分蘖花茎基部到顶端的长度	cm
主花茎粗 Width of main flower stalk	主分蘖花茎基部的直径	mm
结果数 Fruit number	单株蒴果数总和	个
株高 Plant height	自然状态下植株基部至叶片顶端的高度	cm
株幅 Stem width	单株基部向上 10 cm 处的外围长度	cm
叶厚 Leaf thickness	主分蘖上叶片的平均厚度	mm
株型 Plant type	松散型为 1 级, 半紧凑型为 2 级, 紧凑型为 3 级; 根据第 4、5、6 片叶片与主茎的夹角平均值判定: 1 级 > 40°, 40° > 2 级 > 20°, 20° > 3 级	
花色 Flower color	白色为 1 级, 白紫色为 2 级, 浅紫色为 3 级, 紫色为 4 级, 深紫色为 5 级	
地下器官鲜重 Fresh weight of underground organ	单株根茎和须根的重量	kg
根茎长 Rhizome length	单株根茎的长度之和	cm
根茎直径(长) Rhizome diameter (length)	单株根茎最宽处的横轴直径	mm
根茎直径(宽) Rhizome diameter (width)	单株根茎最宽处的短轴直径	mm
须根密度 Fibrous root density	平均每厘米根茎上的须根数量	个/cm
根茎体积 Rhizome volume	根茎长度×根茎直径(长)×根茎直径(宽)	mm ³
芒果苷含量 Mangiferin content	色谱条件、标准品溶液和供试品溶液的制备参考钟可 ^[14]	g/g
新芒果苷含量 Nemangiferin content	色谱条件、标准品溶液和供试品溶液的制备参考钟可 ^[14]	g/g



A: 白花; B: 白紫花; C: 浅紫花; D: 紫花; E: 深紫花; F: 红线连接为单株外围周长; G: 红线连接为根茎长; H: 红色线段表示根茎直径(长), 蓝色线段表示根茎直径宽; I: 紧凑型; J: 半紧凑型; K: 松散型

A: White flower; B: White purple flower; C: Light purple flower; D: Purple flower; E: Deep purple flower; F: The red line connection is perimeter of individual plant; G: The red line is rhizome length; H: The red line is rhizome diameter (length), and the blue line is rhizome diameter (width); I: Compact; J: Semi-compact; K: Loose type

图1 知母部分表型性状

Fig. 1 Partial phenotypic characters of *A. asphodeloides*

1.3 SSR分子标记开发和利用

在知母收获期,挑选每个知母种质的2片幼嫩叶片,用剪刀从基部剪下2 cm后置于PE管中,储藏至超低温冰箱。从160份知母种质中选择24份在株高、叶长、叶宽等地上部性状和根茎长、根茎直径(长)、根茎体积等地下部性状上差异大的知母材料,用其超低温储藏的幼嫩叶片混合建池,由上海派森诺基因科技有限公司完成高通量测序,然后设计SSR引物;根据引物多态性筛选100对引物,使用

24个建池单株样本对引物进行多态性的检测和验证,最终筛选出27对群体验证引物(表3),利用这些引物采用毛细管检测方法^[15]对160份知母种质进行遗传多样性分析。PCR反应体系为2× M5 Hipe Tap Hif PCR mix(北京聚合美生物科技有限公司)10 μL, DNA 1 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, dd H₂O 7 μL。PCR扩增程序:95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共35次循环;72 °C再延伸10 min。

表3 SSR标记信息列表

Table 3 List of SSR marker information

标记名称 Marker name	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	下游引物序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')
P2	CATTCAATCAAGTGGCATCG	GACCGAAATCAAACCAGCAC
P4	TCTTTGGCTCCTCTCTCTCG	TCCGATTGGATTTTGATTTC
P13	CCACCCTGTTGCTCTCTCTC	AACAAAGGATGAAGGCTTGC
P14	TGGTTGAGGGAGAGTCAAGC	TGCAGGGATCTAGATTTGGG
P15	CGAACATGATGACAAGGACG	GAGAGCTCCACAGGATACACAG
P25	CCTCGGACGTGAGAGAGAAG	TTTTGGGAGAGCCATAATGC

表 3 (续)

标记名称 Marker name	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	下游引物序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')
P26	TGGAAATCAGATGTTATGGGC	GCTGTGATGTTGGTTTGTGG
P36	GGATGTATTCCTCACACCCG	TCTTTGCCCTACATCCTTG
P37	AAGAAGATGATGACCTGCCG	GGAAGAAGCTGGATGAGCAG
P40	TCCTTTCACCCACCTCTCTC	TGAGCAACAGAGGTAATGCC
P42	CTCCGTTGGTGAGAAGAAGG	TGGAATGCTCTGCAAACAAG
P43	GGAGAGAGAATTTGTGAGGGG	GGGTTGTAAACCGGTGACTG
P49	GTAACCATGCCACATCTCC	AGGAAGACAGAGGGAGAGCC
P50	GCAGACCCGTTATCGAAGAG	GCGCTTGACTTCGTAGAACC
P53	TTTAAGATCCACGCCAAAGG	CGAGAGAGAGAACCAGAGGG
P56	TAATGGGTGGTTGGAGAAGC	TTTGAAATGCTGTGTTTGGC
P58	AGCCGGACTTACACCATCAG	AAAAGCAATGTCGATCTCCG
P61	CGATGGAGGAGGGGTTAAG	AAAATTTGCTAACATGGCGG
P62	CGATAGCTCTTGGGAGCAAC	TGACGTCGCTTGAGAGTTTG
P65	ACGATTGAACGAACGTTTCC	GCGTAGAGAGGCGAAAATTG
P67	ATTCGCAACCGAATTTAAC	TTTCTTCGTTACGGTGGAGG
P69	TATTTGTCAGGCTGCTGCAC	TTGACAAAACACACAACACCG
P72	TTCGGCGAAGCATACCTG	ATGTCAGCGATCCAGAAACC
P76	CCAAAACCTGTAGCAGGAGC	GGCTGGTCACATGTCATTCT
P77	CATATATGTGTGTGTATGTGTGTG	TGACAATTTACATTGAGTGGA
P82	TTGGACCTATTCTGTAAGGCG	AGGCTATGCATCCCCAAGTT
P98	TGACGGTGGGCTTAAGTAGC	GCAATTTTGACATTATGTGTGTG

1.4 数据分析

1.4.1 表型性状统计与分析 采用 SPSS 26.0 软件对表型性状数据进行统计分析,包括平均值、最大值、最小值、标准差和单因素方差检验。在 Excel 中计算变异系数、多态信息含量、遗传多样性指数。使用 Origin 对表型性状进行主成分分析。

变异系数公式: $CV = (\text{标准差} / \text{平均值}) \times 100\%$

多态信息含量 (PIC, polymorphism information content) 的公式为: $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$

式中: PIC 为多态信息含量, P_{ij} 表示位点 i 的第 j 个等位变异出现的频率, i 表示第 i 个等位基因。

根据性状平均值 (X_i) 和标准差 (σ) 将各个性状的观测值划分为 10 级, 每 0.5σ 为 1 级, 从第 1 级 ($X_i < x - 2\sigma$) 到第 10 级 ($X_i \geq x + 2\sigma$), x 为某个性状的平均数, 每一组的相对频率用于计算多样性指数。

各个等级的分布频率 (P_i) 的计算公式为: $P_i = n_i / N$

式中: n_i 表示某个性状处于第 i 级的材料个数, N 表示材料总数。

Shannon's 多样性指数 (I , shannon's diversity

index) 公式: $I = -\sum P_i \ln P_i$

式中: i 为某一性状的分级, P_i 为该性状第 i 级内材料份数占总份数的百分比。

1.4.2 SSR 标记性状统计与分析 根据 27 对分子标记检测 160 份材料的结果, 采用人工读带, 将电泳图上能清晰分辨的条带记为“1”, 同一位置无带记为“0”, 建立原始矩阵。利用 PopGene32 软件计算观测等位基因数 (N_a , number of average allele)、有效等位基因数 (N_e , effective number of alleles)、Nei's 多样性指数 (Nei's diversity index) 及 Shannon's 信息指数 (I), 并计算多态信息含量。采用 R 编程语言中的绘图功能绘制聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 表型性状的遗传多样性分析

由于亳州栽培和农大栽培的知母材料均只有 1 株, 无法进行遗传多样性分析。因此对 158 份知母种质的 21 个表型性状进行测量分析, 并计算变异系数和遗传多样性指数 (表 4)。21 个表型性状的变异

系数范围在 17.22%~151.07%, 其中最大的为结果数, 最小的为根茎直径(长), 变异系数均值为 51.49%; 多样性指数范围为 0.99~7.60, 其中最大的

为结果数, 最小的为叶厚, 均值为 1.99, 说明本研究 158 份知母种质的 21 个表型性状在知母群体中存在较高的遗传多样性。

表 4 表型性状多样性分析

Table 4 Diversity analysis of phenotypic traits

性状 Traits	变异系数 (%) CV	多样性指数 Diversity index	来源 Source	平均值 Average value	变幅 Amplitude of variation	标准差 SD
新芒果苷含量(g/g) Nemangiferin content	43.83	2.00	易县阳生	0.014	0.001~0.035	0.007
			韶关栽培	0.008	0.003~0.012	0.003
			易县阴生	0.012	0.003~0.033	0.006
			均值	0.011	0.002~0.026	0.005
芒果苷含量(g/g) Mangiferin content	42.28	2.02	易县阳生	0.010	0.003~0.022	0.004
			韶关栽培	0.010	0.005~0.020	0.004
			易县阴生	0.011	0.004~0.024	0.005
			均值	0.010	0.004~0.022	0.004
分蘖数 Tiller number	59.38	1.82	易县阳生	7.970	1~38	6.057
			韶关栽培	14.950	7~25	4.347
			易县阴生	3.240	1~14	2.367
			均值	8.720	3~25.667	4.257
单株外围周长(cm) Perimeter of individual plant	72.86	1.93	易县阳生	67.980	14~170	40.736
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	37.190	0~167	31.909
			均值	52.585	7.000~168.500	36.323
主分蘖叶数 Leaf number of main tiller	56.87	1.63	易县阳生	24.880	12~112	11.361
			韶关栽培	26.050	10~119	22.589
			易县阴生	23.900	0~47	9.141
			均值	24.943	7.330~92.670	14.364
叶长(cm) Leaf length	27.02	1.97	易县阳生	30.712	15.670~46.670	6.786
			韶关栽培	52.733	25.000~75.330	12.511
			易县阴生	37.048	0~60	13.055
			均值	40.164	13.560~60.670	10.784
叶宽(cm) Leaf width	30.45	2.01	易县阳生	1.161	0.500~1.970	0.298
			韶关栽培	0.968	0.500~1.700	0.312
			易县阴生	1.041	0~2.300	0.348
			均值	1.057	0.330~1.990	0.319
主花茎长(cm) Length of main flower stalk	26.85	1.72	易县阳生	113.174	34~189	28.641
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	98.238	0~145	27.884
			均值	105.706	17~167	28.263
主花茎粗(mm) Width of main flower stalk	33.29	1.58	易县阳生	3.904	2.810~6.320	1.370
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	3.673	2.330~6.120	1.156
			均值	3.789	1.170~6.220	1.263

表 4 (续)

性状 Traits	变异系数 (%) <i>CV</i>	多样性指数 Diversity index	来源 Source	平均值 Average value	变幅 Amplitude of variation	标准差 <i>SD</i>
结果数 Fruit number	151.07	7.60	易县阳生	5.880	0~39	7.926
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	4.830	0~31	8.082
			均值	5.355	0~35	8.004
株高(cm) Plant height	31.70	1.51	易县阳生	45.700	31~70	16.434
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	45.476	33~68	12.475
			均值	45.588	16.5~69.0	14.455
株幅(cm) Stem width	32.54	1.77	易县阳生	76.190	29~176	24.590
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	75.760	38~152	24.860
			均值	75.975	33.5~164.0	24.725
叶厚(mm) Leaf thickness	75.48	0.99	易县阳生	0.406	0.29~0.61	0.139
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	0.479	2.290~3.950	0.559
			均值	0.443	0.140~2.280	0.349
株型 Plant type	46.71	1.35	易县阳生	1.650	0~3	0.860
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	2.000	0~3	0.826
			均值	1.825	0~3	0.843
花色 Flower color	37.65	1.57	易县阳生	2.940	0~5	1.165
			韶关栽培	-	-	-
			易县阴生	2.930	0~5	1.045
			均值	2.935	0~5	1.105
地下器官鲜重(kg) Fresh weight of underground organs	68.03	1.90	易县阳生	0.212	0.018~0.936	0.156
			韶关栽培	0.255	0.110~0.420	0.072
			易县阴生	0.067	0.020~0.440	0.069
			均值	0.178	0.048~0.598	0.099
根茎长(cm) Rhizome length	61.28	1.82	易县阳生	79.689	12.000~408.500	58.719
			韶关栽培	167.250	43.500~295.000	55.532
			易县阴生	28.452	10.000~103.000	21.897
			均值	91.797	21.830~268.830	45.383
根茎直径(长)(mm) Rhizome diameter (length)	17.22	2.03	易县阳生	16.424	11.010~23.360	2.429
			韶关栽培	19.339	14.790~25.910	2.924
			易县阴生	14.320	8.850~25.200	3.117
			均值	16.694	11.550~24.820	2.823

表4 (续)

性状 Traits	变异系数 (%) CV	多样性指数 Diversity index	来源 Source	平均值 Average value	变幅 Amplitude of variation	标准差 SD
根茎直径(宽)(mm) Rhizome diameter (width)	40.25	1.06	易县阳生	13.606	8.330~115.250	10.825
			韶关栽培	16.171	12.270~22.210	2.583
			易县阴生	11.696	7.910~24.230	2.950
			均值	13.824	9.500~53.890	5.453
根茎体积(mm ³) Rhizome volume	97.44	1.63	易县阳生	17088.789	1919.450~94720.430	13540.400
			韶关栽培	53996.174	11916.360~120727.100	25541.930
			易县阴生	5856.883	1014.300~62891.390	9710.055
			均值	25647.282	4950.040~92779.740	16264.130
须根密度(个/cm) Fibrous root density	29.07	1.81	易县阳生	3.858	1.910~11.140	1.627
			韶关栽培	2.941	1.800~3.880	0.569
			易县阴生	2.930	0.730~4.800	0.752
			均值	3.243	1.480~6.600	0.983

--:无数据

--:No data

2.2 基于SSR标记的遗传多样性分析

从100对SSR标记中最终筛选出扩增条带清晰、重复性高的SSR标记27对,27对标记在160份知母中共检测出143个等位变异,每个标记的多态性条带数变幅为1~12个,平均为5.3个。其中,多态性位点最丰富的是P4标记,P53、P56、P58、P37、P76

和P67标记检测到的等位基因较少,分别为4个、4个、4个、3个、3个和2个。有效等位基因数变幅为0.56~7.40,平均为3.54;Shannon's信息指数变幅为0.17~0.51,平均为0.36;多态信息含量变幅为0.15~0.50,平均为0.38(表5)。图2为P53标记在知母供试材料中的扩增图谱。

表5 27对SSR标记遗传多样性参数

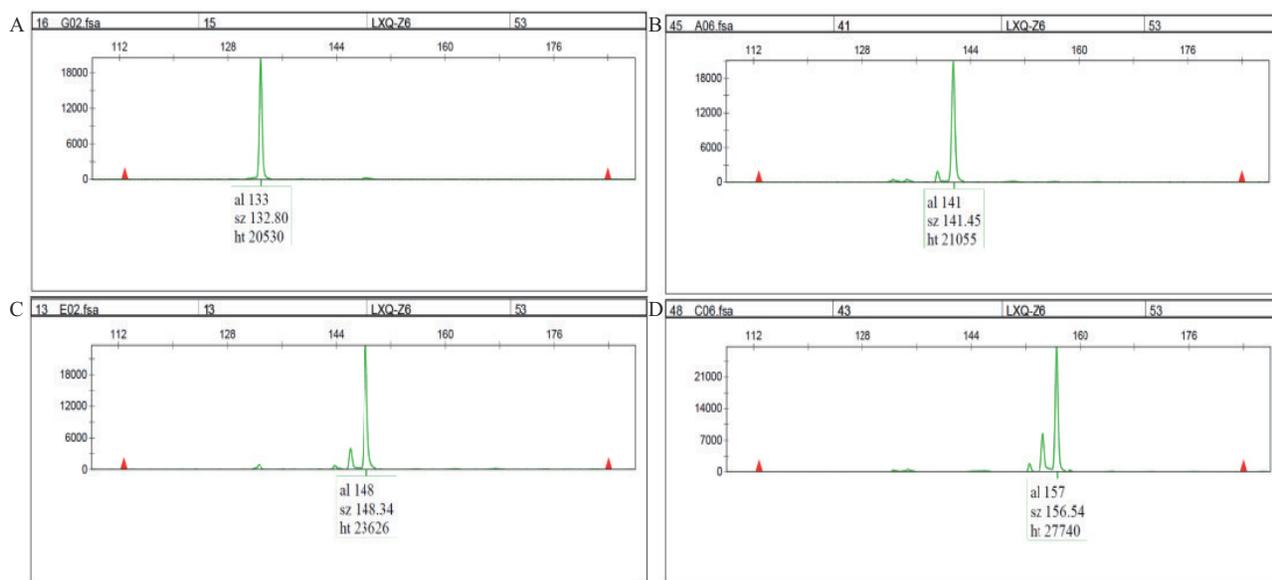
Table 5 Genetic diversity parameters of 27 SSR markers

标记 Marker	多态性条带数 Polymorphic band number	有效等位基因数 Ne	Nei's多样性指数 Nei's diversity index	Shannon's信息指数 I	多态信息含量 PIC
P13	5	3.42	0.24	0.39	0.43
P14	7	4.38	0.16	0.26	0.32
P15	5	3.20	0.19	0.31	0.40
P2	8	4.80	0.15	0.25	0.27
P25	6	4.11	0.24	0.39	0.41
P26	5	3.44	0.24	0.39	0.41
P36	6	4.14	0.26	0.42	0.41
P37	3	2.21	0.29	0.45	0.50
P4	12	7.40	0.18	0.31	0.31
P40	6	3.98	0.22	0.35	0.37
P42	5	3.47	0.26	0.41	0.41
P43	5	2.95	0.11	0.19	0.33
P49	5	3.61	0.28	0.44	0.44

表 5 (续)

标记 Marker	多态性条带数 Polymorphic band number	有效等位基因数 Ne	Nei's 多样性指数 Nei's diversity index	Shannon's 信息指数 I	多态信息含量 PIC
P50	7	4.65	0.24	0.39	0.38
P53	4	2.88	0.26	0.41	0.44
P56	4	3.08	0.33	0.50	0.48
P58	4	2.91	0.28	0.44	0.45
P61	7	4.37	0.16	0.27	0.32
P62	6	3.83	0.20	0.33	0.34
P65	5	3.70	0.31	0.48	0.46
P67	2	1.09	0.08	0.17	0.15
P69	5	3.48	0.24	0.38	0.42
P72	7	4.36	0.18	0.31	0.32
P76	3	2.47	0.35	0.51	0.50
P77	5	3.51	0.24	0.38	0.41
P82	5	3.48	0.25	0.39	0.41
P98	1	0.56	0.11	0.22	0.20
均值 Mean	5.30	3.54	0.22	0.36	0.38

Ne: Effective number of alleles; I: Shannon's diversity index; PIC: Polymorphism information content



A 为 15 号知母种质, 扩增产物大小为 133 bp; B 为 41 号知母种质, 扩增产物大小为 141 bp; C 为 13 号知母种质, 扩增产物大小为 148 bp; D 为 43 号知母种质, 扩增产物大小为 157 bp; 横坐标为扩增片段长度, 纵坐标为荧光信号强度; al 为片段长度; sz 为保留时间; ht 为峰面积

A is germplasm No.15, the amplified product size was 133 bp; B is germplasm No.41, the amplified product size was 141 bp; C is germplasm No.13, the amplified product size was 148 bp; D is germplasm No.43, the amplified product size was 157 bp; The horizontal coordinate is the amplified fragment length, the ordinate is the fluorescence signal intensity; al is the fragment length; sz indicates the retention time; ht is the peak area

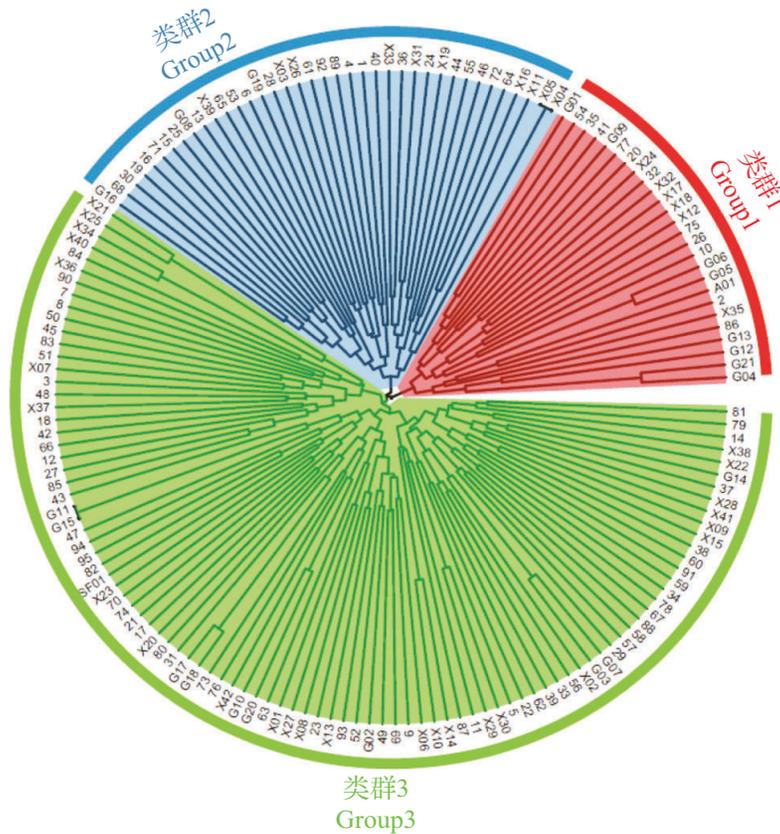
图 2 P53 标记扩增产物的毛细管电泳检测

Fig. 2 Capillary electrophoresis assay of the product amplified by marker P53

2.3 基于SSR标记聚类分析

利用R语言中的绘图功能对160份材料进行聚类分析,结果表明160份材料被划分为3大类群(图3)。类群1中共有26份材料,其中韶关栽培知母8份,易县阳生仿野生知母11份,易县阴生仿野生知母6份,安徽亳州栽培知母1份;类群2共有38份材料,其中韶关栽培知母3份,易县阳生仿野生知母25份,易县阴生仿野生知母10份;类3群共有96份材料,其中韶关栽培知母10份,易县阳生仿野生

知母59份,易县阴生仿野生知母26份,河北农业大学教学实验基地栽培知母1份。从聚类图可以发现,5个不同来源地和两种栽培条件下的知母种质资源并没有很明显的分开,聚类结果与知母种质的来源地并没有明显的相关性,说明不同来源地的知母种质没有明显的分化。但部分同一来源的知母资源成簇出现,如X34、X40均为易县宝石村阴生仿野生知母,G04、G21均为韶关栽培知母。



材料编号同表1,下同

Material numbers are the same as those in table 1, the same as below

图3 160份知母种质聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of 160 germplasms

2.4 知母种质资源主成分分析

为了更好地验证知母种质间的遗传关系,利用Origin对供试材料进行主成分分析,以第1主成分和第2主成分分别作为横坐标和纵坐标,构建二维主成分分析图(图4)。其中第1主成解释率为3.4%,第2主成解释率为3.2%。主成分分析将160份种质划分为3个组,每一组均分布在不同象限内。

主成分分析表明,4个象限中均有韶关栽培知母、易县阳生仿野生知母和易县阴生仿野生知母,并且聚类分析中组1的亳州栽培知母和组3中河北

农业大学教学实验基地栽培知母分别分布在第三和第二象限。主成分分析从不同角度直观反映出供试材料间的亲缘关系,不同颜色的圆点代表不同地区的知母种质材料,由图4可知,5个地区的种质并没有明显分开,只有少量几个种质材料聚在距离原点较远的区域,比如X34和X40,G04和G21,X25和X21。同样是易县阴生仿野生知母,X05却与X34、X40分布在相距较远的象限中。聚类分析中部分成簇出现的X34、X40和G04、G21在主成分分析中分布也较近,两者呈现相似的结果,因此主成分分析与聚类分析可以相互验证。

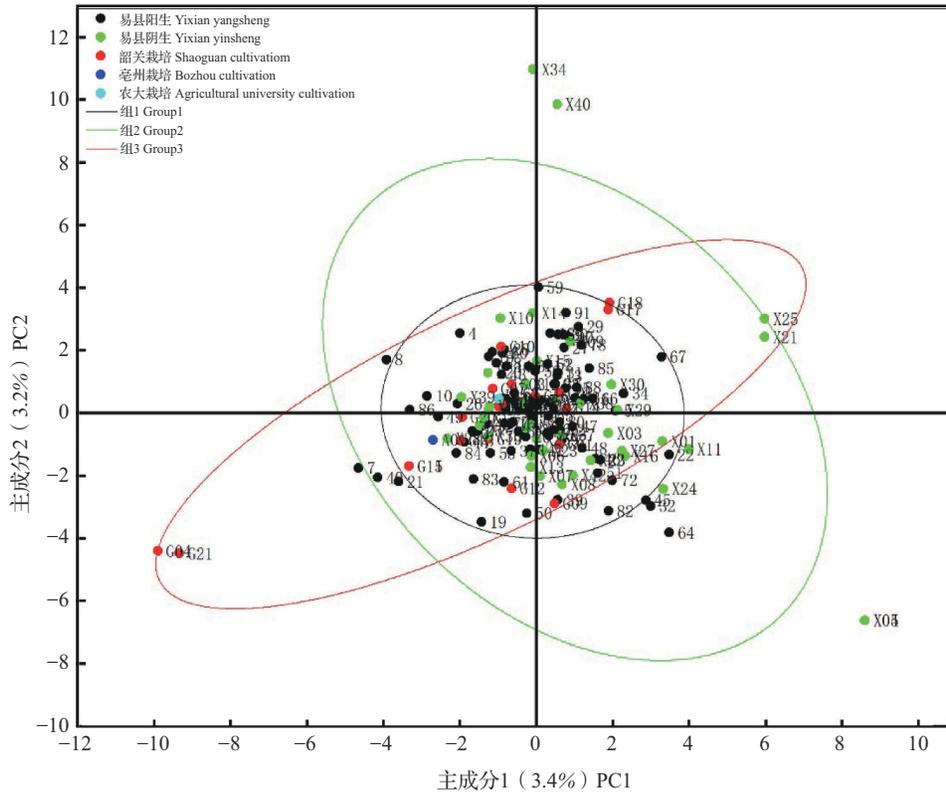


图 4 160 份知母种质主成分分析的二维散点图

Fig. 4 Two dimensional scatter plot for principal component analysis of 160 spermatogony germplasm

2.5 表型性状与 SSR 标记关联分析

27 对 SSR 标记在质量性状上进行卡方检验, 数量性状上进行 T 检验, 结果显示(表 6), 有 9 个 SSR 标记与 6 个表型性状显著或极显著相关。其中, P25 标记与根茎体积和地下器官鲜重均达到极显著相

关; P15 标记与根茎直径(长)和芒果苷含量均达到极显著相关, 与根茎体积达到显著相关; P4 标记与芒果苷含量达到极显著相关; P42 和 P67 均与叶长达到极显著相关, P62、P69 和 P61 均与叶长达显著相关; P36 与分蘖数达到显著相关。

表 6 与表型性状显著关联的 SSR 标记

Table 6 Quantitative traits were significantly correlated with SSR markers

性状 Traits	标记 Marker	F 值 F value
根茎体积 Rhizome volume	P15	2.49*
	P25	0.79**
地下器官鲜重 Fresh weight of underground organs	P25	0.39**
根茎直径(长) Rhizome diameter (length)	P15	0.06**
	P4	4.46**
芒果苷含量 Mangiferin content	P15	6.29**
	P42	6.68**
叶长 Leaf length	P62	10.01*
	P67	5.71**
	P69	4.92*
	P61	0.78*
分蘖数 Tiller number	P36	0.33*

*、** 分别表示在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 水平上显著相关

* and ** indicated significant correlation at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively

3 讨论

分子标记和形态学性状可在植物分类、品种鉴别和遗传多样性分析中起到互补作用,本研究将两者结合应用于道地产区知母和非道地产区知母的遗传多样性分析,并筛选与表型性状相关联的SSR分子标记,对利用这些表型性状进行知母新品种选育及遗传改良具有重要的意义。

本研究对158份知母种质进行了表型性状的遗传多样性分析,发现不同来源地的知母种质间表型性状差异较大,甚至同一道地产区,阳生和阴生条件下种质间表型性状差异也较大,说明本研究调查的表型性状在知母的种群间和种群内均存在较高的遗传多样性。

李文秀等^[11]利用71对SSR引物对84份砂仁资源进行了遗传多样性分析,表明了砂仁群体内具有丰富的遗传多样性;许祎珂等^[16]利用100对引物对27份半夏资源进行了遗传多样性分析,筛选出10对具有高度多态性的引物,结果表明在半夏群体内表现出较高的遗传多样性水平。SSR分子标记对于不同药用植物的遗传多样性分析具有一定的意义。本研究通过开发知母的SSR分子标记,检测到160份知母材料中有143个等位变异,每个标记的等位基因数平均为5.3个,有效等位基因数平均为3.54; Shannon's信息指数平均为0.36,多态信息含量平均为0.38,说明本研究筛选的SSR引物多态性较高,鉴别能力强,能够精准评价160份知母种质的遗传多样性。

本研究聚类分析表明,160份材料被划分为3大类群,并没有将不同地区的知母资源完全分开,知母目前栽培的地区有河北、山西、陕西、甘肃、内蒙古、安徽等地,调研发现,不同地区的知母种植者通过不同途径频繁交换种子种苗。Oh等^[17]研究200份不同地理位置来源的紫苏种质,结果表明这些种质并没有按地理位置进行聚类,这与不同地区的紫苏种植者在很长一段时期内通过各种途径频繁交换种子有关,与本研究的聚类结果一致。主成分分析结果与聚类分析的结果相似,5个不同来源的知母种质并没有明显分开,说明聚类分析和主成分分析可以相互验证。许祎珂等^[16]对27份半夏进行了主成分分析和聚类分析,同样呈现了相似的结果,说明在进行药用植物遗传多样性分析中主成分分析结合聚类分析法可更清晰地表明各材料之间的关系。

表型性状与SSR标记关联分析是一种研究遗传多样性和基因型与表型之间关联关系的方法。张嘉^[18]在基于SSR标记的中国芍药品种分子身份证构建及观赏性状关联分析中发现,芍药共有23个SSR位点与8个性状相关联。于彤^[19]在基于ISSR分子标记的土沉香遗传多样性评价及重要性状关联分析中发现,土沉香19个ISSR分子标记与16个性状间具有一定关联,其中4个标记与多个性状相关联;株高、含水量和叶柄长同时与2个标记相关联,叶干重、叶长、叶周长和叶厚同时与1个标记相关联。本研究发现知母中9个SSR标记与6个性状相关联,且部分SSR标记位点与多个性状相关联。本研究发现这种位点共有两个,分别为P15和P25。P15与根茎体积、根茎直径(长)和芒果苷含量密切相关;P25与根茎体积和地下器官鲜重密切相关。同时本研究发现根茎体积同时与P15和P25相关联,芒果苷含量同时与P4和P15相关联,叶长同时与P42、P62、P67、P69和P61相关联。本研究为知母的育种提供理论依据,挖掘出的标记位点需要进一步展开相关的研究。

参考文献

- [1] 钟可,王文全,靳风云,侯俊玲,雷飞,韩亚南.知母道地药材史学探讨.中医药信息,2013,30(1):29-33
Zhong K, Wang W Q, Jing F Y, Hou J L, Lei F, Han Y N. A discussion on the history of medicinal materials of *Anemarrhena asphodeloides*. Information on Traditional Chinese Medicine, 2013,30(1):29-33
- [2] Liu C, Cong Z, Wang S, Wang S, Zhang X, Song H, Xu T, Kong H, Gao P, Liu X L. A review of the botany, ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, toxicology and quality of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 302:115857
- [3] 郭璞注,邢昺.尔雅注疏.上海:上海古籍出版社,2010:418
Guo P Z, Xing B. Er ya zhushu. Shanghai: Shanghai Classics Publishing House, 2010:418
- [4] 李时珍.本草纲目.北京:北京燕山出版社,2010:310-311
Li S Z. Compendium of materia medica. Beijing: Beijing Yanshan Press, 2010:310-311
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.北京:中国医药科技出版社,2020
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Beijing: China Medical Science Press, 2020
- [6] 王颖异,郭宝林,张立军.知母化学成分的药理研究进展.科技导报,2010,28(12):110-115
Wang Y Y, Guo B L, Zhang L J. Advances in pharmacological research on chemical constituents of *Anemarrhena asphodeloides*.

- Science and Technology Guide, 2010, 28(12):110-115
- [7] 翁丽丽, 陈丽, 宿莹, 许天阳. 知母化学成分和药理作用. 吉林中医药, 2018, 38(1):90-92
Weng L L, Chen L, Su Y, Xu T Y. Chemical composition and pharmacological action of *Anemarrhena asphodeloides*. Jilin Journal of Chinese Medicine, 2018, 38(1):90-92
- [8] 陈千良, 石张燕, 孙小明, 王文全, 马长华, 刘建勇. 栽培西陵知母与野生知母药材质量比较. 中国中药杂志, 2011, 36(17):2316-2320
Chen Q L, Shi Z Y, Sun X M, Wang W Q, Ma C H, Liu J Y. Comparison research on quality of cultivated and wild *Anemarrhena asphodeloides* from Yi county. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(17):2316-2320
- [9] 王红燕, 陈垣, 郭凤霞, 梁伟, 董鹏斌, 程嘉丽. 党参属种质资源多样性及可药用种质创新研究进展. 中草药, 2024, 55(3):978-988
Wang H Y, Chen H, Guo F X, Liang W, Dong P B, Cheng J L. Research progress on diversity of Codonopsis genus resources and innovation of medicinal germplasm. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(3):978-988
- [10] 田骏. 种质资源遗传多样性研究进展. 草业与畜牧, 2012(10):53-58
Tian J. Research progress on genetic diversity of germplasm resources. Pruniculture & Animal Husbandry, 2012(10):53-58
- [11] 李文秀, 李进良, 贺军军, 张华林, 罗萍, 魏滢, 赵美婷. 基于 SSR 标记的砂仁种质资源遗传多样性与群体结构分析. 中国中药杂志, 2022, 47(17):4618-4626
Li W X, Li J L, He J J, Zhang H L, Luo P, Wei Y, Zhao M T. Genetic diversity and population structure of germplasm resources of *Amomum villosum* based on SSR markers. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(17):4618-4626
- [12] 乔萍, 汪奕衡, 孙嘉惠, 康传志, 郭兰萍, 黄璐琦. 基于 SSR 的人参果色种质资源遗传多样性评估. 中国中药杂志, 2022, 47(8):2158-2164
Qiao P, Wang Y H, Sun J H, Kang C Z, Guo L P, Huang L Q. Evaluation of genetic diversity of ginseng fruit color germplasm resources: Based on SSR analysis. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(8):2158-2164
- [13] 汪亚菲, 陆建农, 施玉珍, 陈森, 李文秀, 何晓琳, 殷学贵. 基于 SSR 标记的华南野生蓖麻遗传多样性分析. 分子植物育种, 2019, 17(3):910-916
Wang Y F, Lu J N, Shi Y Z, Chen S, Li W X, He X L, Yin X G. Genetic diversity analysis of wild castor materials in south China based on SSR markers. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(3):910-916
- [14] 钟可, 王文全, 靳风云, 姚鹏, 杨芳芳. 知母的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究. 中草药, 2016, 47(15):2747-2750
Zhong K, Wang W Q, Jin F Y, Yao P, Yang F F. Research on HPLC-ELSD fingerprint of *Anemarrhena asphodeloides*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(15):2747-2750
- [15] 秦英之, 车佳航, 尹跃, 饶书培, 安巍, 戴国礼, 陈金焕. 基于全长转录组信息的枸杞 SSR 标记开发. 植物遗传资源学报, 2022, 23(6):1816-1827
Qin Y Z, Che J H, Yin Y, Rao S P, An W, Dai G L, Chen J H. SSR marker development of *Lycium* germplasm based on full-length transcriptome information. Journal of Plant Genetic Resources. 2022, 23(6):1816-1827
- [16] 许玮珂, 李爽, 寇佩雯, 刘长乐, 孙晓春, 黄文静. 基于表型性状和 SSR 标记的半夏遗传多样性分析及分子身份证构建. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5):134-142
Xu Y K, Li S, Kou P W, Liu C L, Sun X C, Huang W J. Genetic diversity analysis and molecular ID card construction of pinellia ternata based on phenotypic traits and SSR markers. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(5):134-142
- [17] Oh J S, Sa K J, Park H, Lee S, Rhee J H, Lee J K. Genetic variation of native Perilla germplasms collected from south Korea using simple sequence repeat (SSR) markers and morphological characteristics. Plants, 2021, 10(9):1764
- [18] 张嘉. 基于 SSR 的中国芍药品种分子身份证构建及观赏性状关联分析. 北京:北京林业大学, 2016
Zhang J. Molecular ID construction and association analysis of ornamental traits in peony cultivars based on SSR. Beijing: Beijing Forestry University, 2016
- [19] 于彤. 基于 ISSR 分子标记土沉香遗传多样性评价及重要性状关联分析. 南宁:广西大学, 2023
Yu T. Genetic diversity evaluation and correlation analysis of important characters of *Aquilaria Sinensis* based on ISSR markers. Nanning: Guangxi University, 2023