

轮叶党参 EST-SSR 标记的开发及在党参属中的应用

刘新星, 石有太, 罗俊杰*, 欧巧明, 陈子萱, 李忠旺

甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070

摘要:目的 开发 EST-SSR 标记, 分析其在党参属及近缘属种间的通用性。方法 利用 MISA 软件对轮叶党参在 NCBI 公布的 EST 序列进行 SSR 位点查找, Primer 3.0 软件设计引物, 经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳对引物进行初步筛选, 聚丙烯酰胺凝胶电泳对所筛选的引物进行多态性检测。**结果** 共查找到 204 个 EST-SSR 位点, 总长 5 263 bp, 平均长度 25.80 bp, 出现频率为 22.97%, 其中单核苷酸、二核苷酸和六核苷酸重复占比最多, 分别为 36.8%、24.8% 和 15.3%。单核苷酸、二核苷酸、六核苷酸中的主要重复基元类型是 A、TG 和 CAGCTC/GTGGCA。共设计引物 112 对, 以党参为模板, 能够扩增出清晰稳定条带的引物有 67 对, 有效引物比率 59.82%, 其中 27 对能扩增出多态性条带, 多态引物比率 24.11%。随机选取 5 对引物对党参属及桔梗共 12 份材料进行 PCR 扩增, 聚类结果将党参属和桔梗属分为 2 大类。**结论** 研究筛选出的 EST-SSR 标记能够在党参属及近缘属内进行区分鉴别, 研究结果为党参种质鉴别、遗传多样性分析及资源的评价利用等提供了重要技术手段。

关键词: 轮叶党参; EST-SSR; 党参属; 分子标记; 鉴别

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)13-3110-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.023

Development of EST-SSR markers in *Codonopsis lanceolata* and its application in *Codonopsis*

LIU Xin-xing, SHI You-tai, LUO Jun-jie, OU Qiao-ming, CHEN Zi-xuan, LI Zhong-wang

Biotechnology Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To develop EST-SSR markers and analyze its universality in *Codonopsis* and its related genera. **Methods** EST-SSR detection was performed by Perl program MISA. The primers were designed by Primer 3.0 software, followed by agarose gel electrophoresis for preliminary screening after PCR amplification, and polyacrylamide gel electrophoresis was used to detect the polymorphism of the selected primers. **Results** A total of 204 SSRs were mined from 888 ESTs with a frequency of 22.97 %. The whole length was 5 263 bp and the average length of EST-SSR was 25.80 bp. Mononucleotide, dinucleotide, and hexanucleotide nucleotide EST-SSR were dominant, which accounted for 36.8%, 24.8%, and 15.3%, respectively. Among them, A, TG, and CAGCTC/GTGGCA were highly abundant in mononucleotide, dinucleotide, and hexanucleotide nucleotide repeats. Among 112 designed primer pairs, 67 primer pairs showed ideal amplifications and the effective amplification rate was 59.82%. Moreover, 27 primer pairs displayed polymorphic, which accounts for 24.11% of the total primers. Five pairs of primers were selected randomly to mark test materials, and the UPGMA result showed that 12 materials were mainly divided into two categories. **Conclusion** The *Codonopsis* and its related genera can be identified by EST-SSR markers selected from our study, they could be used in germplasm identification, genetic diversity analysis, and resources evaluation.

Key words: *Codonopsis lanceolata* (Sieb. et Zucc.); EST-SSR; *Codonopsis* Wall. ex Roxb; molecular markers; identify

党参属 *Codonopsis* Wall. ex Roxb 共 40 多种, 我国有 39 种, 多产于中国西藏东南部、四川西部、云南西北部、甘肃东部南部、陕西南部、贵州、宁夏、青海东部、河南、山东、山西、河北、内蒙古及东北等地区, 全国各地均有大量栽培^[1]。轮叶党参 *Codonopsis lanceolata* (Sieb. et Zucc.) 就是其中一

收稿日期: 2018-02-13

基金项目: 甘肃省农业科学院中青年基金项目 (2016GAAS52); 甘肃省农业科学院科技支撑计划 (2016GAAS59); 甘肃省农业科学院科技创新工程学科团队项目 (2015GAAS02)

作者简介: 刘新星 (1986—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为药用植物种质资源评价。E-mail: lxx19860621@163.com

***通信作者** 罗俊杰 (1962—), 男, 博士生导师, 研究员, 从事旱地农业作物遗传育种工作。E-mail: hnslijie@s163.com

种, 也称山胡萝卜、山地瓜、羊乳。党参属中大多数种类的根部都具有药用价值, 而这些种类当中应用最广泛的就是党参, 需求量逐年递增。目前我国党参资源破坏严重, 野生资源变得稀少, 再加上混伪品大量充斥市场, 因此急需对党参资源进行保护。

EST-SSR 标记是一种基于 EST (expressed sequence tag) 数据库, 与功能基因相关的新型分子标记。在资源鉴定、遗传图谱构建、基因定位等方面具有潜在的应用价值。近年来, 专家学者对 EST-SSR 的开发做了大量研究。SSR 按来源可分为基因组 SSR (G-SSR) 和 EST-SSR, EST 来源于基因表达序列, 是生物体某一组织特定时期的表达基因, 具有种属通用性^[2]。不同物种间 EST-SSR 引物的通用性可以丰富标记数量、提高标记的利用价值, 可应用于植物遗传育种工作, 如重要农艺性状定位、功能基因比较、遗传图谱构建等^[3]。传统 SSR 引物开发需要构建基因组文库、探针杂交和克隆测序等一系列程序, 耗时且开发成本很高。近年来更多作物 cDNA 的大规模测序及网上公布, 为基于 EST 的 SSR (EST-SSR) 标记开发提供了有利条件。目前 EST-SSR 标记已广泛应用于粮食作物和经济作物的遗传研究中, 如玉米^[4]、藜麦^[5]、

偃麦草^[6]、荔枝^[7]等。但在药用植物中, EST-SSR 开发相对较少。

目前, 在党参的分子标记研究中, 学者多采用 RAPD^[8]、AFLP^[9]、ISSR^[10]、SRAP^[11]、ITS/ITS2^[12]对党参进行分析和混伪品鉴定, SSR 相关研究甚少。李忠虎等^[13]利用 G-SSR 技术筛选出 5 对引物能够在党参遗传多样性 4 个近缘物种成功扩增, 王东等^[14]分析党参转录组中 SSR 位点信息, 但暂未对引物的多态性展开进一步研究。因此笔者拟利用轮叶党参 EST 公布信息, 开发 EST-SSR 标记, 分析其在同属党参及近缘属种中的通用性, 进一步为党参标记的开发及党参资源的评价利用提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

引物筛选所用的党参模板由甘肃省农业科学院中药材资源圃提供, 分析引物在党参属中通用性的材料共 12 份, 其中党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 2 份、轮叶党参 *C. lanceolata* (Sieb. et Zucc.) 2 份、川党参 *C. tangshen* Oliv. 2 份、野生党参 *C. pilosula* (Franch.) Nannf. var. *pilosula* 4 份, 同时采集 2 份桔梗科桔梗属植物桔梗 *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. 作为外类群, 采集地点见表 1。供试材料经甘肃省农业科学院中药材研究所石有太研究员鉴定。

表 1 样品信息

Table 1 Informatica of samples

编号	名称	来源	纬度 (N)	经度 (E)	海拔/m
1	党参	宕昌县南河乡脚力铺村	34°14'40.82"	104°27'61.61"	1 970
2	党参	宕昌县哈达铺镇上罗村	34°18'88.95"	104°24'77.43"	2 224
3	轮叶党参	福建省武夷山	27°62'67.50"	117°97'94.36"	221
4	轮叶党参	福建省武夷山	27°62'67.50"	117°97'94.36"	221
5	川党参	四川省绵阳市	32°40'85.84"	104°52'90.36"	865
6	川党参	四川省绵阳市	32°40'85.84"	104°52'90.36"	865
7	桔梗	甘肃省农科院中药材资源圃	36°09'88.78"	103°68'61.58"	1 537
8	桔梗	甘肃省农科院中药材资源圃	36°09'88.78"	103°68'61.58"	1 537
9	野生党参	平凉市华亭县关山	35°15'89.40"	106°40'23.81"	2 307
10	野生党参	天水市麦积区	34°34'59.26"	106°14'56.13"	1 088
11	野生党参	渭源县会川镇太白山	34°99'70.48"	104°03'48.10"	2 266
12	野生党参	陇南市康县	33°32'93.64"	105°60'85.33"	1 246

1.2 方法

1.2.1 EST-SSR 引物设计与筛选 从 NCBI 上下载轮叶党参的全部 EST 序列, 使用 MISA 软件进行 SSR 位点搜索, 搜索原则设置: SSR 重复最低长度

为 18 bp, 单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复最低次数为 20、9、6、5、4 和 3 次, 间隔不完全重复的 SSR 位点不列为搜索对象。利用 Primer 3.0 对 SSR 位点的侧翼序

列进行引物设计。引物设计的原则为 EST 序列长度大于 200 bp, SSR 序列的开始和结束位置分别距 5' 和 3' 端不少于 20 bp, 引物长度 18~24 bp, 退火温度 T_m 值 40~60 °C, 上游和下游引物的 T_m 值相差不大于 5 °C, GC 含量 40%~60%, 且上游和下游引物的 GC 含量相差不太大, 产物预期长度 100~500 bp。对各条引物的最佳退火温度进行试验, 以每条引物的解链温度 (T_m 值) 为参考, 上下各浮动 5 °C, 通过梯度 PCR 仪自动生成 8 个温度梯度, 以扩增条带多且明亮、背景清晰者为最适温度选择。

1.2.2 样品 DNA 提取 样品由硅胶颗粒迅速干燥后带回, 每个样品取约 50 mg, 用液氮研磨, 采用天根的植物提取基因组试剂盒进行样品 DNA 的提取, 提取完成后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行样品质量的检测, 并用紫外分光光度计测定其质量浓度和纯度, 将 DNA 稀释至 20~50 ng/ μ L, 4 °C 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增和产物检测 PCR 扩增体系总反应体积 15 μ L, 包括 2 $\times$ Taq Master Mix 7.5 μ L, DNase-Free Water 4.5 μ L, Forward Primer 1 μ L, Reverse Primer 1 μ L, 党参基因组 1 μ L。反应程序: 95 °C 热启动 3 min, 95 °C 变性 45 s, 48~65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 34 个循环后, 72 °C 延伸 5 min 后结束。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶下检测, 用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物, 银染色法进行多态性检测。

1.2.4 数据分析 采用人工读带的方法, 将电泳图上可重复的、易分辨的条带记为“1”, 同一位置无带计为“0”, 建立原始数据矩阵。利用 EXCEL 软件统计分析数据, NTSYS 软件的 UPGMA 进行聚类分析。

2 结果分析

2.1 轮叶党参 EST-SSR 的分布特征

搜索共得到 SSR 204 个, 总长 5 263 bp, 平均长度 25.80 bp, 占全部 EST 序列数的 22.97%。由表 2 可见, 轮叶党参具有丰富的 EST-SSR 类型, 单核苷酸及二、三、四、五、六核苷酸重复均有出现, 但不同核苷酸重复类型出现的频率不同。其中以单核苷酸、二核苷酸和六核苷酸重复基元类型为主, 分别占 43.63%、29.41% 和 18.1%。从表 3 看出, 单核苷酸中以比例高达 97.75% 的 A 基元重复类型为主, 二核苷酸中以占比 53.33% 的 TG 基元重复类型为主, 三核苷酸重复类型最高的是 ATA 基元,

表 2 轮叶党参 EST-SSR 类型

基序类型	数量	占比/%
单核苷酸	89	43.63
二核苷酸	60	29.41
三核苷酸	13	6.37
四核苷酸	1	0.49
五核苷酸	4	1.96
六核苷酸	37	18.10

表 3 基于主要重复类型的 EST-SSR 分布

Table 3 Distribution of EST-SSR based on motif sequence type

主要重复基序	数量	占比/%
A	87	97.75
TG	32	53.33
AG/GA	10	16.66
TA	7	11.66
TC	7	11.66
ATA	6	46.15
CAA	4	30.77
CGATC	4	100.00
CAGCTC	8	21.62
GTGGCA	6	16.22

占 46.15%, 五核苷酸虽然在全部 SSR 中占比少, 但是它的重复基元类型只有 1 种 CGATC, 六核苷酸重复基元类型中, CAGCTC 和 GTGGCA 所占比例较高, 分别为 21.62% 和 16.22%。

2.2 轮叶党参 EST-SSR 引物在党参中的通用性

下载公共数据库 NCBI 的轮叶党参 EST 序列 888 条, 利用 MISA 软件搜索得到含 SSR 的序列 204 条, 共合成引物 112 对, 扩增片段在 100~500 bp。在党参中能够扩增出清晰稳定条带的引物有 67 对, 有效扩增率 59.82%, 其中能扩增出多态性条带的引物有 27 对, 多态性引物扩增率为 24.11%。27 对 EST-SSR 引物在党参中共扩增出 118 个位点, 每对引物扩增位点数为 2~8 个, 平均为 4.37 个, 多态性位点 109 个, 平均多态性比率 (PPB) 为 92.37%, 引物信息见表 4。

2.3 SSR 基元类型在党参中的扩增差异

轮叶党参 EST 序列中, 共有 38 种重复基元类型, 以单核苷酸、二核苷酸和六核苷酸重复为主。所筛选出的 EST-SSR 引物, 各核苷酸重复类型的有

表 4 27 对 EST-SSR 引物信息

Table 4 Primer information for 27 pairs of EST-SSR

引物编码	方向	引物序列	基元类型	总位点数	多态性位点数	PPB/%
DS85	F	AGCAGAGCAAAAGGCAAAAG	(TA) ₁₀	2	2	100.00
	R	TTAAATTTGGCCCCAAACAA				
DS92	F	GCCGGGGGAGATAGAGAG	(AG) ₁₄	4	4	100.00
	R	TCCAATGCCGACAACATTTA				
DS116	F	AAAGTGCAAAGGTTGTTGGG	(A) ₂₇	5	4	80.00
	R	TAAAATCGAATGGGCCAAAG				
DS75	F	AGGTTTTTCGTTACGCCTCCT	(GTGGCA) ₃	7	6	85.71
	R	AAAACAAAACAATCGCCGTC				
DS89	F	AAAATAATTGTGGCCCATGC	(CAGCTC) ₃	8	6	75.00
	R	TAAAAGAGGGGAGGATGGCT				
DS120	F	AATGAATTCTGCCACTTCGG	(ATA) ₁₂	7	7	100.00
	R	AATGTACCCAATTGCCCCTT				
DS86	F	ACCCGTGTGGTTGATTTGAT	(A) ₃₂	7	6	85.71
	R	AAAAAGAAAATGGGGCCAAAG				
DS115	F	AATGAATTCTGCCACTTCGG	(ATA) ₁₂	6	6	100.00
	R	AATGTACCCAATTGCCCCTT				
DS13	F	ATCAACATTGCTGCTGTTGC	(A) ₁₁₀	2	2	100.00
	R	CAAGTTTTAAATCGCCTGGG				
DS87	F	AGCGAGGTCAGGTGCATACT	(TG) ₁₆	7	7	100.00
	R	GAGGAGTTAGAAGCCCCCAC				
DS61	F	TCGTATCATCCCCCTCTTCA	(TC) ₁₃	5	5	100.00
	R	AATTCATGGCTCAAGTGGC				
DS24	F	AGGGTGCAAGATGTACCCAG	(TG) ₁₄	3	3	100.00
	R	TCGTTTATACAAAAGCAAGGCA				
DS06	F	AATGAATTCTGCCACTTCGG	(ATA) ₁₂	4	4	100.00
	R	AATGTACCCAATTGCCCCTT				
DS22	F	CAGCAATCATGGTCCCTTCT	(TC) ₁₀	2	2	100.00
	R	TACATTTTGGGGAAACCCAC				
DS35	F	CACCTGCAAATGATGAGTGG	(A) ₇₉	5	5	80.00
	R	CATGCAAAAAGCTTGCTGAAG				
DS41	F	TACAGTGGGGAGACCAGGAG	(TTTTGG) ₃	2	2	100.00
	R	CACCGTAGCAAGGGGATTTA				
DS65	F	AGTGTGAGAGGGAAGGGAG	(CA) ₁₃	4	4	100.00
	R	CAACTGCAGCATCAAAGGAA				
DS74	F	TAAACCCAGGTCCTCAACA	(TGG) ₆	4	4	100.00
	R	GTAGGGGCAAAACGTTTGAA				
DS76	F	ACCCTCATTCTTGGTGTGC	(TG) ₁₄	3	3	100.00
	R	CCGCATGATAAGCTTGTTGA				
DS100	F	TTAGTACCCCGTTCTGCGTC	(ATA) ₁₂	3	2	100.00
	R	TTTAAAAGGTCACATCGCCC				
DS92	F	GCCGGGGGAGATAGAGAG	(AG) ₁₄	1	1	100.00
	R	TCCAATGCCGACAACATTTA				
DS97	F	CCCCTAGCCAATTAGCCATT	(GA) ₉	8	6	75.00
	R	AAACACGGTGGATACGCTTC				
DS122	F	AGGGTGCAAGATGTACCCAG	(TG) ₁₆	4	3	75.00
	R	TCGTTTATACAAAAGCAAGGCA				
DS128	F	CTTCTCTCTCGTATTGGCCG	(GGTGTG) ₃	4	4	100.00
	R	TGTATCTTTGGCTTACCGGG				
DS129	F	GACCACGCCTCCATTTTCTA	(GCAGCC) ₄	6	6	100.00
	R	CGAGGAGTAGAATTGGCTCG				
DS124	F	AGGGTGCAAGATGTACCCAG	(TG) ₁₆	3	3	100.00
	R	CGTGTATACAAAAGCAAGGCA				
DS106	F	GTCTCCCTCACTCCCTCCTT	(CT) ₉	2	2	100.00
	R	ATCATGATCCATCCAACGGT				
合计				118	109	

效引物比例介于 0~80.00% (表 5), 三核苷酸重复的有效引物数比例最高, 为 80%, 其次是二核苷酸和六核苷酸重复, 分别为 61.22% 和 62.50%, 四核苷酸重复未得到有效引物。各核苷酸重复类型的多态引物比例介于 0~50.00%, 多态性引物数比例最高的基元类型仍然为三核苷酸重复, 占 50%, 其次是二核苷酸, 占 26.53%, 单核苷酸重复占 23.53%, 四、五核苷酸重复均未得到多态性引物。根据表 2 统计, 多态性引物中, 单核苷酸以基元 A 重复为主, 二核苷酸基元类型以 TG/AG 为主, TA、TC/CT、CA、GA 均有分布, 三核苷酸基元类型以 ATA 重复类型最多。

2.4 EST-SSR 引物在党参属及近缘属中的应用

选取党参、川党参、轮叶党参、野生党参及近

表 5 不同核苷酸重复 EST-SSR 的 PCR 扩增

Table 5 PCR amplification of repetited EST-SSR markers with different nucleotide

核苷酸重复类型	引物数	有效引物数 (占比/%)	多态性引物数 (占比/%)
单核苷酸	17	8 (47.06)	4 (23.53)
二核苷酸	49	30 (61.22)	13 (26.53)
三核苷酸	10	8 (80.00)	5 (50)
四核苷酸	1	0 (0)	0 (0)
五核苷酸	3	1 (33.33)	0 (0)
六核苷酸	32	20 (62.50)	5 (15.63)
总和	112	67 (59.82)	27 (24.11)

缘属桔梗为材料, 从 27 对多态性引物中随机选取 5 对进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。图 1 可以看出, 仅一对引物 DS61 就能够将 4 种党参和 1 份桔梗有效区分, 引物 DS35 和 DS100 相结合也可以将 5 种不同种质进行区分。图 1-C 中利用引物 DS100 扩增, 在 275 bp 和 400 bp 处的差异片段为轮叶党参所特有, 该条带能将轮叶党参与其他党参区分开来。聚类分析结果 (图 2) 看出, 在阈值 0.52 时可将 12 份材料分为 2 大类, 党参属党参、轮叶党参、川党参和野生党参聚为一大类, 桔梗单独聚为一类, 表明筛选出的 EST-SSR 引物能够在党参与其近缘属间进行区分。党参属内, 轮叶党参单独成群, 川党参与野生党参遗传距离近聚为一类, 栽培党参聚为一类, 表明 EST-SSR 引物能够对党参属种间进行有效鉴别。

3 讨论

3.1 轮叶党参 EST-SSR 标记的开发

SSR 位点的多态性是由重复基元数量和基元碱基数不同所产生的简单序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism, SSLP) 和随机扩增微卫星多态性 (random amplified microsatellites polymorphism, RAMP) 共同决定的。本研究下载轮叶党参全部 EST 序列 888 条, 搜索共得到 SSR 204 个, 总长 5 263 bp, 平均长度 25.80 bp, 占全部 EST 序列数的 22.97%。SSR 基元重复类型丰富, 主要以

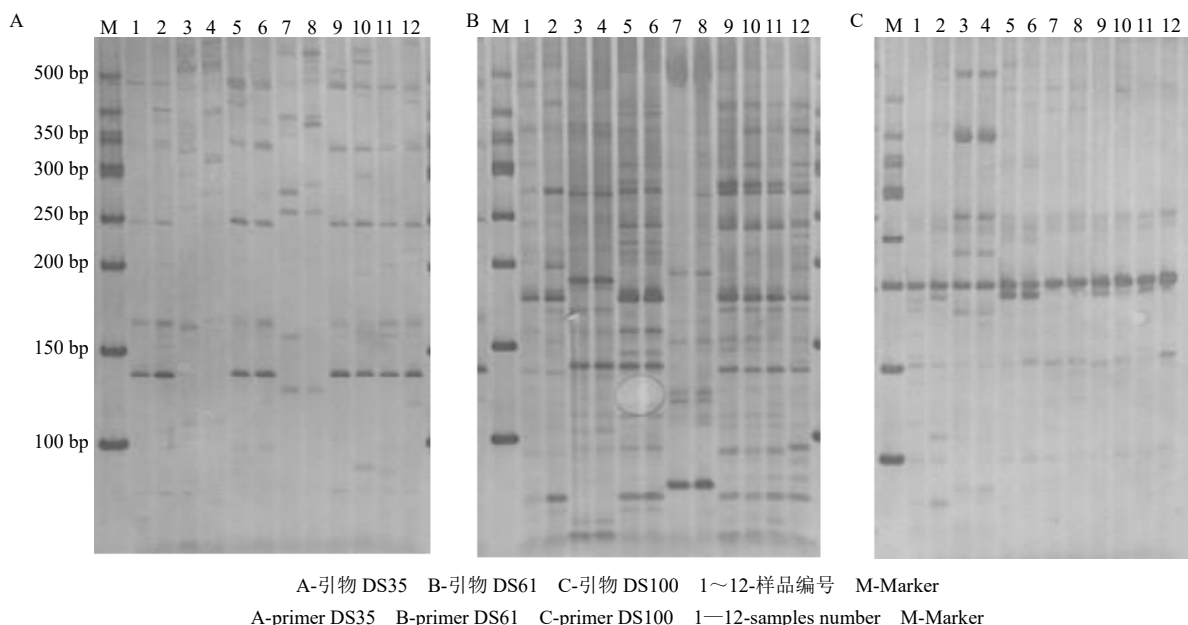


图 1 部分标记对 12 份材料的扩增电泳图

Fig. 1 Amplification of 12 tested materials by part of primers

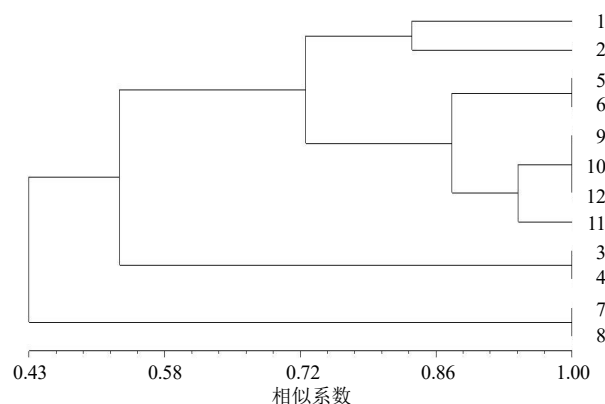


图 2 12 份供试材料聚类图

Fig. 2 Cluster analysis dendrogram for 12 tested materials

单核苷酸、二核苷酸和六核苷酸重复为主。根据已有报道,大多数植物的 EST-SSR 以三核苷酸和二核苷酸重复类型为主,但主要的重复基元类型并不相同^[15],这与本实验研究结果有所差异。但是,针对这些 SSR,本实验设计引物并进行通用性分析结果表明,有效引物数比例较高的是二核苷酸、三核苷酸和六核苷酸重复,多态性引物数比例较高的则是二核苷酸和三核苷酸重复。进一步分析其重复基元,发现含有重复基元 A、TG/AG 和 ATA 的 SSR 引物多态性高,GC 基元重复未见到。本研究中,单核苷酸、二、三和六核苷酸重复率较四、五核苷酸更为丰富,这可能与四、五核苷酸的变异更容易引起移码突变、受到更强的自然选择压力有关^[16]。另外,轮叶党参中出现的大量六核苷酸重复,在以往研究的大多作物中,六核苷酸重复基元类型均不常见且所含比例较低,曾在甘薯^[17]、玉米^[18]和萝卜^[19]等中见到报道,这些可能与物种本身的基因组或转录组序列差异性有关。

3.2 EST-SSR 标记为党参属的鉴别和遗传分析提供资源

通过聚类分析,可将栽培党参、川党参、轮叶党参、野生党参和桔梗进行区分。其中野生党参与川党参的遗传距离较与栽培党参的遗传距离近,这可能是采集的 2 份川党参种源来源有别于长期人工栽培的党参。陈大霞^[11]对川党参的分子标记研究中曾提到,川党参的种源十分混杂,主要有野生种、半野生种和驯化的栽培种,而一些药农的零星栽培,更多的是自留种或直接采集当地野生种子用于生产。采集栽培党参材料的宕昌县,是甘肃党参的主产地,人工栽培历史深远,其种源较川党参统一。

分子标记的种间通用性可降低其开发成本,提

高利用效率,促进遗传研究较薄弱物种的分子遗传学研究。而分子标记技术中,RAPD 技术重复性差、不稳定;AFLP 虽然稳定可靠,但成本高、对 DNA 质量要求高,实验程序复杂、工作量大;ITS 条形码仅可用于药用植物及其易混伪品的鉴定,对种内鉴别能力有限;SSR 标记具有共显性、高度可重复、多态性丰富、对 DNA 质量要求低、可通过 PCR 快速检测,是遗传学背景研究非常有效的工具。缺点是 SSR 标记具有特异性,必须进行 PCR 检测,存在引物开发问题。本实验利用公共数据库中轮叶党参 EST 信息开发 SSR 引物,方法快速、通量大、成本低,并通过筛选共获得 27 对多态性引物,占总设计引物数的 24.11%,为党参属及近缘属的种内种间鉴别及遗传多样性分析奠定基础。

4 结论

党参属为药用资源丰富的重要类群,属内药用植物种类繁多、种间关系复杂,常用药材存在替代混用等情况。利用 GenBank 公共 EST 数据库成功开发出 27 对 EST-SSR 标记,这些标记具有良好的稳定性和多态性。 $(A)_n$ 、 $(TG/AG)_n$ 和 $(ATA)_n$ 核苷酸重复多态性高,可作为党参 SSR 引物设计的首选。随机筛选出的 3 对引物 DS35、DS61 和 DS100,不仅能将党参属与桔梗属区分,还能将属内党参、川党参、轮叶党参及野生党参 4 种种质完全区分,表明通过轮叶党参 EST 开发的 SSR 标记在党参属种间通用性高,能够作为党参种质鉴别、资源评价及遗传多样性研究的重要工具。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 贺润丽,樊杰,平莉莉,等. 大豆基因组 SSR 和 EST-SSR 在黄芪中的通用性分析 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(5): 994-998.
- [3] 姜蔚. 不同作物间 EST-SSR 标记的通用性及其应用研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [4] 卢玉飞,蒋剑雄,易自立. 玉米 SSR 引物和甘蔗 EST-SSR 引物在芒属中的通用性研究 [J]. 草业学报, 2012, 21(5): 86-95.
- [5] 张体付,戚维聪,顾闽峰,等. 藜麦 EST-SSR 的开发及通用性分析 [J]. 作物学报, 2016, 42(4): 492-500.
- [6] 王瑞晶,李培英. 小麦 EST-SSR 标记在偃麦草中的通用性分析 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(6): 1516-1523.
- [7] 孙清明,马文朝,马帅鹏,等. 荔枝 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSR 标记开发 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(19): 4037-4049.

(下转第 3121 页)

- populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages [J]. *Brazil Arch Biol Technol*, 2005, 48(2): 275-284.
- [18] 黄久香, 庄雪影. 观光木种群遗传多样性研究 [J]. 植物生态学报, 2002, 26(4): 413-419.
- [19] 陈俊秋, 慈秀芹, 李巧明, 等. 樟科濒危植物思茅木姜子遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生物多样性, 2006, 14(5): 410-420.
- [20] 由永飞, 邓洪平. 珍稀濒危植物金毛狗的 SRAP 分析 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(4): 688-692.
- [21] Nybom H, Bartish I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspect Plant Ecol Evol Syst*, 2000, 3(2): 93-114.
- [22] 史艳财, 唐健民, 柴胜丰, 等. 广西特有珍稀濒危植物小花异裂菊遗传多样性分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(1): 9-14.
- [23] 王 宇. 东北地区胡桃楸遗传多样性 SRAP 研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [24] 文亚峰, 韩文军, 吴 顺. 植物遗传多样性及其影响因素 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(12): 80-87.
- [25] Lenormand T, Guillemaud T, Bourgeuet D, et al. Evaluating gene flow using selected markers: A case study [J]. *Genetics*, 1998, 149(3): 1383-1392.
- [26] Whitlock M C, McCauley D E. Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm+1)$ [J]. *Heredity*, 1999, 82(2): 117-125.
- [27] Wright S. Evolution in Mendelian populations [J]. *Bull Mathemat Biol*, 1990, 52(1): 241-295.
- [28] Slatkin M. Estimating levels of gene flow in natural populations [J]. *Genetics*, 1981, 99(2): 323-335.
- [29] Hansson L. *Ecological Principles of Nature Conservation* [M]. London & New York: Elsevier Applied Science, 1992.
- [30] 陈小勇. 植物的基因流及其在濒危植物保护中的作用 [J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 97-102.
- [31] 孙 坤, 王瑞雪, 陈 纹, 等. 山西五台山不同海拔中国沙棘居群的遗传变异 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2013, 49(2): 75-79.
- [32] Avise J C, Hamrick J L. *Conservation Genetic: Case Histories from Nature* [M]. London: Chapman & Hall, 1996.
- [33] 李建晨, 冯 丽, 野原稔弘. 细叶石仙桃的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1691-1693.
- [34] Frankel O H, Brown A H D, Burdon J J. *The Conservation of Plant Biodiversity* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

(上接第 3115 页)

- [8] 张建清, 苏 雪, 吴 琼, 等. 药用植物党参的 RAPD 分析 [J]. 中药材, 2006, 29(5): 417-420.
- [9] 苏 强, 杨 静, 王 哲, 等. 党参 DNA-AFLP 分析体系建立及条件优化 [J]. 药物生物技术, 2010, 17(4): 326-330.
- [10] 张延红, 高素芳. 党参 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(7): 551-555.
- [11] 陈大霞, 彭 锐, 李隆云, 等. 利用 SRAP 和 ISSR 标记分析川党参的遗传多样性 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 255-259.
- [12] 赵 莎, 辛天怡, 侯典云, 等. 党参药材及其混伪品的 ITS/ITS2 条形码鉴定研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 421-428.
- [13] 李忠虎, 刘晓东, 王小琦, 等. 党参微卫星引物筛选及群体遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 210-214.
- [14] 王 东, 曹玲亚, 高建平. 党参转录组中 SSR 位点信息分析 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2390-2394.
- [15] 王炜勇, 俞少华, 张 飞, 等. 近缘属 SSR 标记引物在光萼荷属植物中的通用性 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(4): 583-587.
- [16] Li Y C, Korol A B, Fahima T, et al. Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2004, 21: 991-1007.
- [17] 黄立飞, 房伯平, 陈景益, 等. 甘薯 EST 资源的 SSR 信息分析 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(1): 23-27.
- [18] 赵美琼, 宋 燕, 范静华, 等. 玉米 EST 序列中微卫星的频率和分布 [J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(5): 585-589.
- [19] 崔 娜, 邱 杨, 李锡香, 等. 萝卜 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSRs 标记开发 [J]. 园艺学报, 2012, 39(7): 1303-1312.