

苦玄参转录组 EST-SSR 引物开发及群体遗传多样性分析

闫国跃^{1,2,3}, 杨帆^{1,3}, 白燕远^{3,4}, 李耀燕^{3,4}, 吴梦丽^{1,3}, 阿里穆斯^{1,2*}, 谢阳姣^{1,3,4*}

1. 中央民族大学 民族医药教育部重点实验室, 北京 100081

2. 中央民族大学药学院, 北京 100081

3. 广西中医药大学瑶医药学院, 广西 南宁 530001

4. 广西壮瑶药工程技术研究中心, 广西 南宁 530001

摘要: 目的 研究 18 个苦玄参种群的遗传多样性及亲缘关系, 为苦玄参的资源评价及开发利用提供依据。方法 采用 EST-SSR 引物开发技术, 利用 SSR 分子标记, 分析 18 个种群的遗传多样性, 并基于遗传距离对其进行聚类分析, 明确各种群间的亲缘关系。结果 从 100 对 EST-SSR 标记中, 筛选出具有多态性的引物 48 对。随机抽取 20 对具有多态性的引物对 18 个种群进行扩增, 共扩增出 71 个等位基因, 平均每对引物 3.55 个。各引物间多态位点百分数 (P) 为 0~40.7%, 平均 19.9%; 多态信息含量 (PIC) 为 0~0.794 1, 平均 0.397 7; Shannon 信息指数 (I) 为 0~1.814 3, 平均 0.808 4。观测杂合度 (Obs_Het) 为 0~0.442 3, 平均值 0.212 7; 预期杂合度 (Exp_Het) 变化范围 0~0.826 9, 平均值 0.455 8。18 个种群内近交系数 (F_{is}) 值为 -0.095 3~0.663 9, 平均 0.159 2; 总群体内亚群间近交系数 (F_{it}) 值为 0.062 6~0.858 7, 平均 0.537 2; 遗传分化系数 (F_{st}) 为 0~0.686, 平均 0.449 6。基因流 (N_m) 在 0.114 4~0.759 4, 平均值为 0.306 1。各种群基因多样性指数 (Nei) 为 0~0.401 6、 I 为 0~0.620 9, 广西梧州最高, 云南普洱龙潭乡最低。云南景洪勐龙镇和云南景洪景哈乡遗传距离最近, 仅 0.031 9; 广西龙州和云南勐海县打洛镇遗传距离最大, 为 0.963 8。在遗传距离 0.321 3 处, 可将 18 个种群分成 4 个群体, 其中广西 3 个种群归入同一群体, 云南勐满镇、勐伦镇及勐遮镇归为同一个群体, 第 3 个群体为云南勐海县勐宋乡, 其余种群归入第 4 个群体。结论 18 个种群遗传分化水平不一致, 各种群杂合度差异较大。种群间 N_m 较小, 群体基因交换不大; 群体内存在一定的近交率, 种群亲缘关系受地理隔离影响较大。

关键词: 苦玄参; SSR; 引物开发; EST-SSR; 遗传多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0195-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.029

Transcriptomic EST-SSR primer development and genetic diversity analysis of *Picria felterrae*

YAN Guo-yue^{1,2,3}, YANG Fan^{1,3}, BAI Yan-yuan^{3,4}, LI Yao-yan^{3,4}, WU Meng-li^{1,3}, Borjigidai Almaz^{1,2}, XIE Yang-jiao^{1,3,4}

1. Key Laboratory of Ethnomedicine, Ministry of Education, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China

3. College of Yao Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

4. Guangxi Center for Zhuang and Yao Medicine Engineering and Technology Research, Nanning 530001, China

Abstract: Objective To explore genetic diversity of and genetic relationships among 18 *Picria felterrae* populations to provide references for the resource assessment and utilization. **Methods** The genetic diversity of 18 *P. felterrae* populations were analyzed using the EST-SSR primer development technology and SSR molecular markers, and cluster analysis was performed based on genetic distances to determine the relationships among those populations. **Results** A total of 48 pairs of polymorphic primers were selected from 100 pairs of EST-SSR markers, of which 20 pairs were randomly selected and used for amplification of 18 populations. A total of 71 alleles were amplified, 3.55 alleles per primer. Among the primers, the percentage of polymorphic loci (P) varied from 0 to 40.7%,

收稿日期: 2018-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31460074); 国家自然科学基金资助项目 (81573535); 国家重点研发计划 (2017YFC1704000); 民族医药教育部重点实验室自主课题资助 (KLEM-ZZ201805)

作者简介: 闫国跃 (1985—), 男, 中央民族大学药学院, 博士研究生, 研究方向为民族医药资源保护与利用。E-mail: 419088316@qq.com

*通信作者 谢阳姣, 副研究员, 研究方向为民族医药资源保护与利用。E-mail: 524598948@qq.com

阿里穆斯, 教授, 研究方向为民族医药资源保护与利用。E-mail: almaz.b@hotmail.com

with an average of 19.9%; The polymorphism information content (PIC) varied from 0 to 0.794 1, 0.397 7 on average; The Shannon diversity information index (I) varied from 0 to 1.814 3, with an average of 0.808 4; Obs_Het varied from 0 to 0.442 3, with an average of 0.212 7; And the Exp_Het varied from 0 to 0.826 9, with an average of 0.455 8. For the 18 populations, the Inbreeding Coefficient (F_{is}) varied from -0.095 3 to 0.663 9, with an average of 0.159 2; The inbreeding coefficient of subgroups (F_{it}) varied from 0.062 6 to 0.858 7, with an average of 0.537 2; The genetic differentiation coefficient (F_{st}) varied from 0 to 0.686, with an average of 0.449 6; The gene flow (N_m) varied from 0.114 4 to 0.759 4, with an average of 0.306 1. For the 18 samples tested, the gene diversity index (Nei) varied from 0 to 0.401 6, the I varied from 0 to 0.620 9, Wuzhou Guangxi having the maximum value and Longtan Yunnan the minimum value. Menglong and Jingha, two towns in Yunnan, had the shortest genetic distance (0.031 9), whereas Longzhou Guangxi and Menghai Yunnan had the maximum genetic distance (0.963 8). The 18 populations could be divided into four groups at the location where genetic distance was 0.321 3. The three populations in Guangxi belonged to the same group, populations from Menglong, Menglun and Mengzhe of Yunnan belonged in the same group, populations from Mengsong Yunnan became an independent group, and the rest belonged in the fourth group. **Conclusion** The genetic differentiation levels of 18 populations were not consistent, and the heterogeneity difference was significant. The gene flow among populations was small, which indicated that the population gene exchange was low. A certain inbreeding rate exists among the populations. The relationship among populations was influenced by geographical isolation and environmental factors.

Key words: *Picria felterrae* Lour.; SSR; primer development; EST-SSR; genetic diversity

苦玄参 *Picria felterrae* Lour. 是玄参科苦玄参属唯一的一种植物, 属《中国药典》收载品种, 药用已有 200 多年历史, 是广西道地药材。具有消肿止痛、抗菌、消炎、镇痛等药理作用^[1-3], 是多种知名品牌中成药如妇炎净胶囊、万通炎康片、维威消炎灵等及保健品梧州龟苓膏等的主要原料药材之一。目前, 苦玄参原料主要来源于人工种植的药材, 前期研究发现, 人工栽培苦玄参质量差异明显, 同一产地不同株系间有效成分苦玄参苷 I_A 在 0.19%~0.57%, 苦玄参苷 I_B 在 0.16%~0.34%^[4], 苦玄参药材品质差异对其临床应用带来不利影响。植物性状差异的产生受环境条件影响, 但主要原因在于种质差异^[5], 遗传多样性的研究可揭示植物种质资源的亲缘关系, 并进行种质鉴定及优质资源评价^[6]。因此, 分析不同地理来源苦玄参种质遗传差异, 可为苦玄参优良种群及优质种质筛选, 确定道地生产区域提供基础, 为优质苦玄参药材的生产和开发利用提供技术参考。

微卫星标记 (microsatellite) 又称短串联重复序列 (short tandem repeats, STR) 或简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR), 指由 1~6 个核苷酸组成的简单重复序列, 是近年发展起来的建立在 PCR 基础上的第 2 代分子标记, 它广泛分布于真核生物整个基因组中, 在种内居群间及各植物间均存在高度的多态性特征, 且不同物种 SSR 序列在组成、长度、突变率及其在染色体上的分布情况表现出高度的等位基因多样性^[7]。微卫星具有较保守的侧翼序列, 根据保守序列设计的 SSR 引物, 专属性强, 可对特定的 SSR 进行有效扩增^[8]。由于该法开

发引物数量大、技术简单、成本较低, 已成为 SSR 引物开发的常用方法^[6-9]。SSR 分子标记呈共显性, 符合孟德尔遗传模式, 易于操作, 具有高度重复性和可靠性, 显示出较强的多态性等诸多优点, 使其在基因组差异与性状变异的相关性研究、植物遗传育种等方面得到广泛应用^[6,10-12]。随着高通量测序技术的迅速发展和应用, RNA 测序技术可对任意物种的整体转录活动进行检测, 利用转录组测序的表达序列搜索 SSR 位点, 并进行 SSR 引物开发, 突破了前期生物遗传信息匮乏的限制^[13]。

苦玄参的分子生物学研究仍处于起步阶段, 相关生物遗传信息匮乏, 本研究通过高通量测序方法获得了苦玄参盛花期转录组数据, 对所得数据进行拼接, 搜索 Unigenes 中的 SSR 位点信息, 筛选出 100 个 SSR 标记, 针对 SSR 位点的两侧序列开发设计 SSR 引物, 并随机抽取来源于中国不同区域 18 个不同种群的 4 个苦玄参样品单株, 对 100 对引物的扩增效果及多态性进行分析, 筛选出具有多态性的引物 48 对。随机选择其中 20 对引物, 对 18 个苦玄参种群样品 DNA 进行扩增, 并根据扩增结果分析群体遗传多样性。本研究将为苦玄参资源评价、优良种质筛选及适宜产地选择提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

2014 年 7—11 月, 在苦玄参主产区广西梧州、龙州、凭祥以及云南景洪市、勐伦县、勐海县、澜沧县、西盟县、勐腊县、宁洱县、普洱市等地采集

苦玄参种子; 2015—2017 年于广西中医药大学药用植物苗圃连续种植 3 年。每年于盛花期采集苦玄参

倒数第 2 对展开叶, 硅胶干燥, 置于 -20°C 中备用。采集样品具体信息及地理分布见表 1。

表 1 苦玄参种群信息
Table 1 Information of *P. felterrae* population

编号	产地	经度 (E)	纬度 (N)	年均温/ $^{\circ}\text{C}$	年均降雨量/mm	年均日照/h	土壤类型	海拔/m
1	广西梧州	111.49	23.94	21.2	1 507	1 725	水稻土	280
2	广西龙州	106.64	22.39	22.4	1 260	1 547	水稻土	196
3	广西凭祥	106.76	22.09	21.4	1 392	1 614	赤红壤	332
4	云南勐腊县勐伦镇	101.37	21.87	22.1	1 487	1 984	砖红壤	882
5	云南宁洱县	101.04	23.07	18.2	1 415	1 921	赤红壤	1 328
6	云南勐腊县勐满镇	100.17	22.15	21.3	1 750	1 950	砖红壤	1 389
7	云南西盟县	99.59	22.64	15.2	2 758	2 205	赤红壤	1 165
8	云南勐海县勐遮镇	100.27	21.99	18.4	1 202	2 155	赤红壤	1 178
9	云南澜沧县	99.93	22.56	18.9	1 643	2 098	赤红壤	1 024
10	云南勐海县打洛镇	100.06	21.70	21.9	1 220	2 750	赤红壤	632
11	云南勐海县勐混镇	100.39	21.84	18.5	1 400	1 950	赤红壤	1 197
12	云南澜沧县上允镇	99.84	23.05	19.3	1 020	2 098	赤红壤	994
13	云南景洪农场	101.29	22.51	20.3	1 450	2 050	砖红壤	796
14	云南景洪市勐龙镇	100.68	21.58	21.6	1 400	1 732	砖红壤	629
15	云南景洪市曼沙区	100.75	22.03	22.0	1 200	1 950	赤红壤	575
16	云南勐海县勐宋乡	100.56	22.06	16.5	1 400	1 903	赤红壤	1 220
17	云南景洪市景哈乡	100.90	21.76	22.7	1 311	1 693	赤红壤	713
18	云南普洱龙潭乡	101.59	23.08	16.4	1 370	1 938	赤红壤	1 699

1.2 仪器和试剂

DYY-6B 电泳仪 (北京六一仪器厂), GELI-DOC2000 凝胶成像分析仪 (美国伯乐 BIO-RAD 公司), Bio-Rad PCR 扩增仪 (美国伯乐 BIO-RAD 公司), 3730XL 测序仪 (美国 ABI 公司)。DNA 提取试剂盒 (Sunbiotech 公司)、PCR 试剂盒 (成都 Foregene)。

2 方法

2.1 引物筛选

对不同来源的 63 个苦玄参样品的转录组进行测序, 并从转录组序列中挖掘 SSR 标记 12 886 个。从具有多态性、2~6 碱基且 90% 以上样品有分布的标记位点中, 筛选出 100 个 SSR 标记, 根据 SSR 标记位点两端的保守序列设计引物。并随机抽取来源于不同群体的 4 个单株, 对 100 对引物 (P1~P100) 的扩增效果及多态性进行分析, 筛选出具有多态性的引物。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

2.2 群体遗传多样性分析

从多态性引物中, 随机选择 20 对引物, 对 18

个苦玄参种群样品 DNA 进行扩增, 根据扩增结果分析群体遗传多样性。DNA 提取参照谢阳姣等^[4]的方法进行, 每个群体各随机选择 60 个单株, 分成 2 组, 每组分别提取 DNA 后, 等量混合用于 PCR 扩增, 每个群体种植 3 年, 计 3 个年度重复, 等位基因统计时为 3 个重复的总等位基因数。采用 CTAB 法提取 DNA, 提取产物取 2~3 μL 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其余置于 -20°C 保存备用。

SSR 采用毛细管电泳荧光检测法进行检测。PCR 扩增中 SSR 荧光引物体系 (共 20 μL): ddH₂O 14.8 μL , dNTP 0.4 μL , Buffer 2 μL , 正向引物 0.3 μL (20 $\mu\text{mol/L}$), 反向引物 0.3 μL (20 $\mu\text{mol/L}$), DNA 模板 2 μL , Taq 0.2 μL 。扩增程序见表 2。扩增后 SSR 采用毛细管电泳方法检测, 将甲酰胺与相对分子质量内标按 100:1 的体积比混匀后, 取 9 μL 加入上样板中, 再加入 1 μL 稀释 10 倍的 PCR 产物。然后使用 3730XL 测序仪进行毛细管电泳, 利用 Genemarker 中的 Fragment (Plant) 片段分析软件对测序仪得到的原始数据进行分析, 将各泳道内内标的位置与各样品峰值的位置做比较分析, 得到片段大小。

表 2 PCR 扩增程序
Table 2 PCR amplification procedure

循环	温度/℃	阶段	时间	循环数
C1	94	预变性	5 min	35
C2	94	变性	30 s	
C3	54	复性	35 s	
C4	72	延伸	40 s	
C5	72	延伸	3 min	

2.3 数据分析

一个引物为一个等位基因位点,将每个样品在各个等位基因位点的片段大小,即表现型,按照 Convert 1.31 软件要求的格式录入到 Excel 中,然后用 Convert 1.31 软件转化成 POPGENE 软件所要求格式。使用 POPGENE 32 软件对 SSR 位点及苦玄参种群遗传多样性相关参数观察等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、多态位点百分率 (P)、Shannon 信息指数 (I)、观测杂合度 (Obs_Het)、预期杂合度 (Exp_Het)、基因多样性指数 (Nei)、平均杂合度 (Ave_Het) 等进行统计分析。

通过 POPGENE 32 计算出群体的基因型频率,再通过多态信息含量 (PIC) 小软件计算 PIC; 用 Nei 的遗传一致度 (genetic identity, I) 和遗传距离 (genetic distance, D) 来衡量各种群之间的遗传分化大小。基于遗传距离,采用 UPGMA 法对种群进行聚类分析,构建系统发育树。

表 4 部分引物 PCR 读带结果
Table 4 PCR reading results of partial primer

样品编号	引物读带长度/bp													
	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7	
1	264	273	98	98	116	122	116	122	252	256	171	179	189	195
2	273	273	94	96	116	122	116	122	252	256	171	179	189	195
3	264	264	94	96	116	122	116	116	252	256	171	179	189	195
4	262	262	96	96	116	116	124	124	256	256	171	171	195	195

3.2 SSR 位点遗传多样性

20 个 SSR 位点的遗传多样性和杂合性统计结果见表 6。结果显示,20 个 SSR 位点中,所有位点均扩增出有效产物,其中扩增的总等位基因数 71 个,每对引物可扩增 1~8 个等位基因,平均每个位点观测等位基因 3.55 个,平均 N_e 为 2.14 个, N_a 最多的为 P69,计 8 个;最低的为 P7,仅 1 个。各引物间 P 变化范围比较大,为 0~40.7%,

3 结果与分析

3.1 引物筛选

从苦玄参转录组序列中挖掘 SSR 标记共 12 886 个,其中以复合状态存在的标记 830 个,单碱基重复最多,计 7 414 个;双碱基 2 488 个;随着碱基数的增加,SSR 标记数减少(表 3)。从具有多态性、2~6 碱基重复且 90%以上样品有分布的标记位点中,筛选出 100 个 SSR 标记,根据 SSR 标记位点两端的保守序列,设计引物。并利用 4 个样品对 100 对引物进行扩增及检测,部分条带读取结果见表 4。对扩增结果进行统计显示,100 对引物均有扩增,其中具有多态性的引物有 48 对,多态率为 48%。从 48 对引物中随机选择 20 对,用于群体遗传多样性分析实验,入选引物序列 NCBI 登录号为 SRR5942165,引物具体信息见表 5。

表 3 不同类型 SSR 的密度分布

Table 3 Density distribution of different types of SSR

标记类型	数量/个
复合形式	830
单碱基重复	7 414
双碱基	2 488
三碱基重复	1 941
四碱基重复	161
五碱基重复	50
六碱基重复	2
总标记	12 886

平均 P 为 19.9%,多态率最高的为 P77 (40.7%); P7 位点仅有 1 个等位基因。PIC 为 0~0.794 1,平均 0.397 67; Nei 为 0~0.819 0,平均 0.451 5; I 为 0~1.814 3,平均 0.808 4。以上指标最高的为 P69,最低的为 P7。从表 6 还可以看出,20 个位点 Obs_Het 为 0~0.442 3,平均 0.212 7; Exp_Het 为 0~0.826 9,平均 0.455 8。所有位点 Obs_Het 均低于 Exp_Het,种群内存在一定程度的近交率。

表5 20对SSR引物信息
Table 5 Information of 20 pairs of SSR primers

引物编号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	重复单元	目的片段长度/bp
P4	TTCCAGATTCCATTTCTCTGC	TTGGAGCAACTTTTCGATTGG	(TC) ₇	264
P7	CGGGCCACCTTTAGACAATA	TCGAATTCAAATCTCCCCTG	(CAG) ₅	221
P11	TTTAGGCTAATGCCGCTGTT	CAGATCCCCAAACCTCTTCA	(GCT) ₃	272
P21	AACTCTTCACGGAGCGTTA	GGACGAGGAAAGACATGGAA	(CTG) ₇	100
P34	CCAATTTGGTTGTCCCAATC	TAACCTCATGGGGGATCAGG	(TATT) ₅	185
P36	TTGTCTGCAAACGAAGGTTG	TTCCTCCTTCACCTTCCTCG	(TG) ₁₁	229
P39	TGTTTCGGGCTTTTTATTGC	TGAAAGGGCTGATTACCGAG	(TTC) ₆	154
P43	AGGGAGAGATGGCTCATTCA	GAACAGCACCCTGCGATTA	(AG) ₇	120
P45	TGAATCACTCGCTCTTCACG	GGTGGGACTTTGGTTTGAGA	(AG) ₉	120
P52	GAGGTCCCTGACCTTGTTGA	TCAACAGCAGCAGCAGATTT	(TGC) ₉	224
P59	ACCCGATTGACACCCATTTT	TGAGACTTTTGGTGGGGAG	(ACG) ₅	246
P60	GCACTGAATGGAACAGCAGA	CCAGAGCTTCTTCCCAACTG	(ATG) ₁₀	144
P61	GCAAGCAAAGAGTCACTCCC	ACATGTGGGTACTTGTGGCA	(ACA) ₆	170
P65	TTCTAATAGCAAGGAGGACGAA	GCTGCCTGCAAAAATCTACC	(TACC) ₅	169
P69	TCTCGCTTTTCTGTTTGGGT	GCAGGAACTGACCTTTGAGC	(AT) ₆	189
P72	CGAGGTTGGTCGAAACAAAT	GATCACTACCAGTGC GGAT	(TA) ₈	118
P74	CTTCCACAGCTCAACAACCA	TCTCGGTATCTCCGGTCAAC	(CGC) ₇	154
P77	CCGTCATGTTAAACGGGTC	GAGGTTGCGAATGATTGGAT	(ATC) ₅	166
P84	ACGCCACACATCCTACACAG	GGGAGATAAGCCAACACGAA	(CAT) ₆	189
P93	TGCGTTTTTGGTTTCATGTG	TCTCATTGCTGTCAAATCTTGC	(AC) ₉	185

表6 20个SSR位点遗传变异和杂合性
Table 6 Genetic variation and heterozygous of 20 SSR sites

基因位点	样本量	N_a	N_e	$P/\%$	PIC	I	Obs_Het	Exp_Het	Nei	Ave_Het
P4	108	5	2.460 8	27.8	0.516 1	1.080 0	0.283 0	0.599 3	0.593 6	0.348 3
P7	108	1	1.000 0	0	0	0	0	0	0	0
P11	108	2	1.683 0	31.5	0.323 5	0.595 8	0.301 9	0.409 7	0.405 8	0.188 6
P21	108	4	3.071 6	31.5	0.617 3	1.222 9	0.377 4	0.680 9	0.674 4	0.344 3
P34	108	3	2.002 1	7.4	0.392 8	0.755 4	0.075 5	0.505 3	0.500 5	0.128 9
P36	108	5	2.810 4	7.4	0.575 1	1.173 7	0.075 5	0.650 3	0.644 2	0.275 5
P39	108	3	1.256 8	14.8	0.189 8	0.404 2	0.150 9	0.206 3	0.204 3	0.121 4
P43	108	3	1.598 3	25.9	0.341 4	0.684 7	0.264 2	0.377 9	0.374 3	0.213 5
P45	108	3	1.460 4	20.4	0.280 3	0.564 1	0.226 4	0.318 2	0.315 2	0.187 2
P52	108	4	2.574 7	14.8	0.535 0	1.078 8	0.188 7	0.617 4	0.611 6	0.341 5
P59	108	7	3.068 3	13.0	0.625 8	1.393 4	0.132 1	0.680 5	0.674 1	0.328 1
P60	108	3	2.498 0	18.5	0.514 1	0.979 8	0.188 7	0.605 4	0.599 7	0.278 5
P61	108	4	2.109 7	20.4	0.473 1	0.948 6	0.245 3	0.531 0	0.526 0	0.245 9
P65	108	2	1.563 6	9.3	0.295 5	0.546 2	0.094 3	0.363 9	0.360 4	0.081 6
P69	106	8	5.524 0	39.6	0.794 1	1.814 3	0.442 3	0.826 9	0.819 0	0.524 7
P72	108	4	1.435 0	25.9	0.271 8	0.566 4	0.264 2	0.306 0	0.303 1	0.128 9
P74	108	4	2.269 9	24.1	0.502 5	1.019 8	0.245 3	0.564 8	0.559 5	0.202 3
P77	108	2	1.902 5	40.7	0.361 9	0.667 3	0.434 0	0.478 9	0.474 4	0.363 1
P84	108	2	1.392 7	16.7	0.242 2	0.455 6	0.188 7	0.284 6	0.282 0	0.152 5
P93	108	2	1.119 6	7.4	0.101 1	0.217 5	0.075 5	0.107 8	0.106 8	0.034 5
总量		71	42.801 4							
平均值	108	3.55	2.140 1	19.9	0.397 7	0.808 4	0.212 7	0.455 8	0.451 5	0.224 5
RSD/%		1.731	1.016 1	2.6	0.045 7	0.426 8	0.120 8	0.210 9	0.208 8	0.128 5

3.3 F 统计值和基因流

通过使用 POPGENE 32 对 SSR 位点进行 F 统计量分析 (表 7), 种群内近交系数 (F_{is}) 为 $-0.095\ 3\sim 0.663\ 9$, 平均 $0.159\ 2$, 总群体内亚群间的近交系数 (F_{it}) 值为 $0.062\ 6\sim 0.858\ 7$, 平均 $0.537\ 2$;

遗传分化系数 (F_{st}) 为 $0\sim 0.686$, 平均 $0.449\ 6$, 表明 18 个群体内存在一定程度的近交。基因流 (N_m) 在 $0.114\ 4\sim 0.759\ 4$, 平均 $0.306\ 1$, 群体间存在一定的基因流, 但基因流较小, 种群遗传分化较大。

表 7 20 个 SSR 位点 F 统计值和基因流

Table 7 F statistics and gene flow of 20 SSR sites

基因位点	样本量	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
P4	108	0.162 6	0.477 0	0.375 4	0.415 9
P7	108	0	0	0	0
P11	108	-0.101 3	0.331 9	0.393 3	0.385 6
P21	108	0.026 0	0.492 1	0.478 5	0.272 5
P34	108	0.353 3	0.796 9	0.686 0	0.114 4
P36	108	0.663 9	0.858 7	0.579 5	0.181 4
P39	108	-0.095 3	0.233 9	0.300 6	0.581 8
P43	108	-0.019 0	0.423 6	0.434 3	0.325 6
P45	108	0.067 1	0.340 8	0.293 4	0.602 1
P52	108	0.349 3	0.633 7	0.437 0	0.322 0
P59	108	0.647 3	0.809 8	0.460 7	0.292 7
P60	108	0.169 0	0.606 1	0.526 0	0.225 3
P61	108	0.284 7	0.643 1	0.501 1	0.248 9
P65	108	0.262 4	0.737 3	0.643 8	0.138 3
P69	106	0.253 3	0.501 8	0.332 8	0.501 1
P72	108	-0.324 1	0.112 5	0.329 7	0.508 3
P74	108	0.074 6	0.561 0	0.525 6	0.225 6
P77	108	-0.246 0	0.062 6	0.247 7	0.759 4
P84	108	0.106 6	0.390 9	0.318 3	0.535 5
P93	108	-0.474 9	0.326 4	0.543 3	0.210 1
平均值	108	0.159 2	0.537 2	0.449 6	0.306 1

3.4 群体遗传多态性及亲缘关系

从群体遗传多态信息分析结果 (表 8) 可知, 各群体平均观测等位基因数在 $1\sim 2.2$, 平均有效等位基因数在 $1\sim 1.870\ 5$, 等位基因数最多的为广西梧州和龙州, 均为栽培种, 最低的为云南普洱龙潭乡。各群体间多态位点百分率变化范围较大 ($0\sim 85\%$), 多态率最高的为广西梧州 (85%); 最低的为云南普洱龙潭乡, 多态位点百分率为 0 。

研究中 18 个群体的相似系数和遗传距离分布范围较广, 相似系数为 $0.381\ 4\sim 0.968\ 6$, 遗传距离为 $0.031\ 9\sim 0.963\ 8$ 。其中, 云南景洪勐龙镇和云南景洪景哈乡相似系数最高, 为 $0.968\ 6$, 遗传距离最小, 仅 $0.031\ 9$; 广西龙州和云南勐海县打洛镇相似系数最小, 为 $0.381\ 4$; 遗传距离最大, 为 $0.963\ 8$ 。依据遗传距离进行聚类分析 (图 1),

在遗传距离 $0.177\ 7$ 处, 可将 18 个种群分为 5 大群体, 其中群体 1 包括广西梧州、龙州种, 2 个均为栽培种; 群体 2 为广西凭祥野生种; 群体 3 为云南勐腊县的勐满镇和勐伦镇及云南勐海县的勐遮镇的野生种质; 群体 4 为云南勐海县勐宋乡野生种质; 其余种群归入第 5 个群体。在遗传距离 $0.321\ 3$ 处, 可将 18 个种群分成 4 个群体, 其中广西 3 个种群归入同一群体, 另 3 个群体的划分与前面一致。

4 讨论

4.1 EST-SSR 引物开发

引物开发是 SSR 分子标记研究的前提, 对于基因组数据有限的物种, 或遗传背景信息匮乏的物种, 或相关分子遗传与分子生物学研究刚起步的物种, 可选用文库法、富集法、省略筛库法等实验方

表8 群体遗传多态信息

Table 8 Genetic diversity of population

居群	样本量	N_a	N_e	多态位点数	总数	P/%
1	6	2.15	1.870 5	17	20	85
2	4	2.15	1.801 8	16	20	80
3	6	1.75	1.289 0	11	20	55
4	6	2.10	1.837 0	16	20	80
5	6	1.55	1.458 6	10	20	50
6	6	2.20	1.913 4	16	20	80
7	6	1.35	1.247 0	6	20	30
8	6	1.85	1.700 0	14	20	70
9	6	1.50	1.423 3	9	20	45
10	6	1.25	1.210 0	5	20	25
11	6	1.30	1.223 3	5	20	25
12	6	1.40	1.303 3	7	20	35
13	6	1.30	1.219 2	6	20	30
14	6	1.35	1.233 3	6	20	30
15	6	2.15	1.641 6	16	20	80
16	6	1.65	1.590 0	13	20	65
17	6	1.50	1.326 9	8	20	40
18	6	1.00	1.000 0	0	20	0

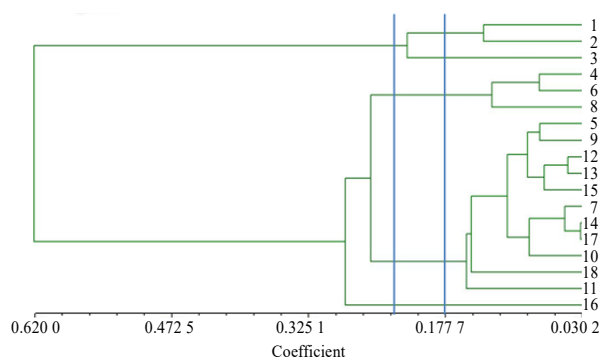


图1 群体聚类分析结果

Fig. 1 Clustering analysis result of population

法开发 SSR 引物^[9], 但均存在费时耗力成本高实验复杂等问题。对于已知多数基因序列的物种, SSR 引物开发可以基于生物信息学手段进行, 即利用在 DNA 数据库中已存在的大量基因组序列及序列数据, 先通过搜索软件获得 SSR 位点信息, 然后根据 SSR 位点两侧的核酸序列信息, 利用软件设计相应的引物^[14], 由于不需构建基因文库和无需测序等, SSR 引物开发的成本大大降低, 而开发效率则提高。随着目前数据库中 EST 序列的增加, 通过该法开发 EST-SSR 引物进而用于研究 SSR 分子标记的报道

越来越多^[15-16]。目前, 高通量测序手段越来越普遍, 成本大幅度降低, 开发效率提高, 已突破了没有基因库不能开发 EST-SSR 引物的瓶颈, 成为目前引物开发最经济有效的方法^[17-19]。实验通过转录组测序挖掘 SSR 标记, 并基于标记两端保守序列开发引物, 从 100 对引物中筛选得到 48 对多态引物, 既快速有效, 开发经费也大大减少, 表明采用测序方法筛选 EST-SSR 引物是有效和可行的。

4.2 苦玄参 SSR 位点遗传多样性

遗传多样性指种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和。种内的多样性是物种遗传水平多样性的重要来源, 也是一个物种对人为干扰进行成功反应的决定因素, 是对种质资源进行评价的重要指标。本实验对来源于广西和云南的 18 个苦玄参种群的 SSR 遗传多样性进行分析, 从其中 20 个 SSR 位点扩增结果来看, 每个位点可扩增的 N_a 为 1~8 个不等, 差异较大; 各位点 P 、 PIC 、 Nei 、 I 、 Obs_Het 、 Exp_Het 等均存在较大的差异, 说明各位点在种群中的遗传变异具有较大的差异, 该差异对于苦玄参种质资源评价具有重要的意义。

从本实验结果还可发现, 所有位点 Obs_Het 均低于 Exp_Het , 且 F_{st} 达 0.449 6, N_m 仅为 0.306 1, 说明种群内存在一定的近交, 纯合性较高; 种群间 N_m 较小, 种群间遗传分化较大。对于整个物种来说, 纯合性高容易引起物种退化和灭绝, 不利于其可持续发展, 但从育种角度来看, 高纯合性可为杂交育种提供更多的优良材料, 是优良种质选育和繁育的重要基础。

4.3 群体遗传结构和亲缘关系

苦玄参主要分布在广东、广西、贵州和云南南部等区域, 适宜亚热带季风气候。受地理及环境条件影响, 不同地理来源的苦玄参种质及各表型性状均存在很大差异^[5]。苦玄参药用质量差异对于苦玄参资源开发及临床用药带来不利影响, 而质量差异主要受种质的影响。分析不同地理来源苦玄参种质的遗传差异, 可为优良苦玄参种质的选育、适宜产地环境条件选择及苦玄参资源的开发利用提供基础。本实验结果显示, 苦玄参不同种群间其等位基因数及多态位点百分数、多态信息含量均存在较大差异, 其中等位基因数及多态信息含量最高的为广西梧州和龙州, 均为栽培种, 说明人工栽培对苦玄参的遗传变异产生了较大的影响。从 18 个种群的相似系数和遗传距离来看, 苦玄参种群间遗传距离

分布范围较广。基于遗传距离的聚类分析结果显示,在遗传距离 0.321 3 处,可将 18 个种群分成 4 个群体,其中广西 3 个种群归入同一群体,另 3 个群体同前面的划分。从聚类分析结果来看,地理位置相近或者生态环境类似的种群,更趋向于划分入同一群体,表明苦玄参种质分化受地理距离及环境条件影响较大。

18 个苦玄参种群的 Nei、I、P 及 Ave_Het 均具有明显的差异,其中栽培种广西梧州和龙州的遗传变异及杂合性较高,野生资源的纯合性较高。种群间基因流较小,群体基因交换不大;群体内存在一定的近交率。群体间遗传距离分布范围较广,群体划分受地理位置及环境条件影响较大。

参考文献

- [1] 吴建璋,文永新,黄永林,等.苦玄参提取物对小鼠的抗炎及镇痛作用[J].中国医院药学杂志,2012,32(16): 1303-1304.
- [2] 陈君,甄汉深,韦建华.苦玄参叶抗炎药理作用研究[J].海峡药学,2013,25(2): 23-15.
- [3] 王力生,马学敏,郭亚健,等.苦玄参的化学成分研究[J].中国中药杂志,2004,29(2): 149-152.
- [4] 谢阳姣,何志鹏,闫国跃,等.苦玄参40个株系表型性状遗传多样性分析[J].广西植物,2017,37(3): 348-355.
- [5] 谢阳姣,何志鹏,李耀燕,等.苦玄参药材中苦玄参苷 IA 和 IB 差异积累的影响因素分析[J].作物杂志,2016(3): 89-93.
- [6] 解新明,云锦凤.植物遗传多样性及其检测方法[J].中国草地,2000(6): 51-59.
- [7] 陈怀琼,隋春,魏建和.植物 SSR 引物开发策略简述[J].分子植物育种,2009,7(4): 845-851.
- [8] 张羽.分子标记技术的产生与引物设计[J].江苏农业科学,2014,42(6): 47-51.
- [9] 敖日格乐,贾晓,葛台明.SSR 分子标记的开发策略概述[J].湖北民族学院学报:自然科学版,2009,27(4): 462-467.
- [10] 刘果,张党权,谢耀坚,等.39 种按树微卫星序列的遗传多样性分析[J].分子植物育种,2017,15(9): 3767-3779.
- [11] 谢阳姣,李耀燕,闫国跃,等.苦玄参种材料遗传多样性 SSR 分析[J].南方农业学报,2017,48(1): 20-25.
- [12] 苏一钧,王娇,戴习彬,等.303 份甘薯地方种 SSR 遗传多样性与群体结构分析[J].植物遗传资源学报,2018,19(2): 202-210.
- [13] Simon S A, Zhai J X, Nandety R S, et al. Short-read sequencing technologies transcriptional analyses [J]. Annu Rev Plant Biol, 2009, 60: 305-333.
- [14] 孙英新,白孝明,王丹丹.蓝莓种质资源遗传多样性的 EST-SSR 分析[J].辽东学院学报:自然科学版,2018,25(1): 31-35.
- [15] 尚卫琼,段志芬,杨毅坚,等.基于 EST-SSR 标记的云南大叶茶资源遗传多样性分析[J].山东农业科学,2018,50(1): 16-22.
- [16] 徐敏.中国马铃薯审定品种系谱分析及遗传多样性研究[D].北京:中国农业科学院,2007.
- [17] 张华丽,丛日晨,王茂良,等.基于万寿菊转录组测序的 SSR 标记开发[J].园艺学报,2018,45(1): 159-167.
- [18] 陈春林,田易萍,陈林波,等.基于荧光标记的紫娟茶树转录组 EST-SSR 标记开发[J].江苏农业学报,2018,34(4): 747-753.
- [19] 逢洪波,解元坤,张璐,等.基于转录组测序的鬼针草 SSR 标记开发及其应用[J].分子植物育种,2018,16(16): 5359-5368.