

基于 SSR 荧光标记的不同品种（系）当归遗传关系分析及分子身份证构建

朱田田^{1,2,3}, 张明惠¹, 王富胜⁴, 王圆圆^{1,2}, 栗孟飞⁵, 晋玲^{1,2*}

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000
2. 西北中藏药省部共建协同创新中心, 甘肃 兰州 730000
3. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000
4. 定西市农业科学研究院, 甘肃 定西 743000
5. 甘肃农业大学 干旱生境作物学重点实验室, 甘肃 兰州 730070

摘要: 目的 利用荧光 SSR 分子标记对甘肃省 11 个当归 *Angelica sinensis* 品种(系) 194 份当归样品进行遗传多样性和遗传结构分析, 并构建其分子身份证, 为当归新品种(系) 选育提供科学依据。方法 采用课题组前期筛选出 10 对 SSR 荧光引物对供试材料进行 PCR 扩增, 利用 Popgen 软件进行遗传参数的计算, 利用 Structure 软件进行群体结构分析, 利用 NTSYS 软件构建各居群的 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类图, 利用 GenALEX 软件进行分子方差分析; 对扩增带型进行数字加字母编码, 构建当归分子身份证。结果 10 对 SSR 荧光引物共获得观测等位位点 57 个, 平均每对引物 5.7 个, 当归群体的观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和 Nei 期望杂合度 (Nei) 分别为 0.341 4、0.407 0 和 0.385 5; Structure 分析将 194 份当归样品分成 5 个类群; 当归品种(系) 居群间的分化系数 FST 为 0.147 7; 分子方差分析显示居群内的变异百分比达到 78%; 最终利用 10 对 SSR 荧光引物, 构建了 10 位字符的分子身份证, 可以区分 11 个当归品种(系)。结论 栽培当归在物种水平上遗传多样性较高, 各品种(系) 间遗传分化系数较低, 基因交流频繁, 遗传变异主要存在于居群内; 构建的分子身份证可以区分不同当归品种(系)。

关键词: 当归; SSR 荧光标记; 亲缘关系; 分子身份证; 遗传多样性

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)12-3774-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.024

Genetic relationship analysis and molecular ID codes construction of different cultivars (lines) of *Angelica sinensis* based on fluorescent labeled SSR markers

ZHU Tian-tian^{1,2,3}, ZHANG Ming-hui¹, WANG Fu-sheng⁴, WANG Yuan-yuan^{1,2}, LI Meng-fei⁵, JIN Ling^{1,2}

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China
2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Gansu Province & MOE of PRC, Lanzhou 730000, China
3. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of the University of Gansu Province, Lanzhou 730000, China
4. Dingxi Academy of Agricultural Sciences, Dingxi 743000, China
5. Key Lab of Aridland Crop Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective The genetic structure of 194 *Angelica sinensis* samples from 11 *A. sinensis* cultivars (lines) in Gansu Province was studied by simple sequence repeat marker (SSR), and construct molecular identity cards, which provided a scientific reference for the breeding of new *A. sinensis* cultivars (lines), and laid a foundation for further research on *A. sinensis* provenance identification, genetic diversity and excellent trait markers. **Methods** The tested materials were amplified by PCR with 10 pairs of SSR primers, and the genetic

收稿日期: 2021-12-06

基金项目: 甘肃省科技厅创新基地和人才计划项目(20JR5RA182); 国家自然科学基金资助项目(32160083); 国家自然科学基金资助项目(81360615); 甘肃省教育厅“双一流”科研重点项目(GSSYLXM-05); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(zzy-2019-04); 甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2021KCZD-4)

作者简介: 朱田田, 副教授, 博士研究生, 主要从事中药资源评价与分子生药学研究。Tel: (0931)5161169 E-mail: ztt0935@163.com

*通信作者: 晋玲, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源开发与质量综合评价研究。Tel: (0931)5161161 E-mail: zyxyjl@163.com

parameters were calculated by Popgen software. The group structure was calculated by Structure software. The Nei's genetic distance coefficient UPGMA cluster map of each population was constructed by NTSYS software. Analysis of molecular variance was performed by GenALEX software. Digits and letters were used to code amplified tapes, and constructed DNA molecular ID cards of *A. sinensis*. **Results** A total of 57 observed alleles were obtained from 10 pairs of SSR primers, with an average of 5.7 primers per pair. The observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and Nei expected heterozygosity (Nei) of *A. sinensis* populations were 0.341 4, 0.407 0 and 0.385 5 respectively. A total of 194 *A. sinensis* samples were divided into five groups by structure analysis. The differentiation coefficient F_{ST} of *A. sinensis* populations was 0.147 7. Analysis of molecular variance showed that the percentage of variation in the population reached 78%. Finally, 10 pairs of SSR fluorescent primers were used to construct a 10-character molecular ID card, which could distinguish 11 *A. sinensis* cultivars (lines). **Conclusion** At the species level, cultivated *A. sinensis* had a high genetic diversity, and the differentiation coefficient of each cultivar (line) was low, with frequent gene exchange, and the genetic variation mainly existed in the populations. The constructed molecular ID codes can separate different cultivars (lines) of *A. sinensis*.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels.; SSR fluorescent labeling; genetic relationship; molecular ID; genetic diversity

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 具有补血活血、调经止痛、润燥滑肠之功效^[1], 是甘肃省主产地药材之一, 具有悠久的人工栽培历史。目前, 甘肃省大面积栽培的当归品种主要通过系统选育获得, 由于在育种过程中所使用的材料仅集中在少数优良品种(系)上, 使得所选育的新品种(系)在外观形态上极为相似, 仅依靠表型特征研究其遗传差异准确性较低, 因此, 利用分子生物学方法鉴别当归不同品种(系)间的遗传关系十分必要。

对于当归种内不同品种(系)的鉴别, 盛丽等^[2]采用 RAPD 分子标记对甘肃省当归种质资源进行研究, 张宏意等^[3]对当归种质资源遗传多样性进行 AFLP 分析, 严明春等^[4]应用 ISSR-PCR 分析法鉴别当归不同品种。SSR 分子标记因其共显性, 稳定性高、特异性强等优势, 已经广泛的被运用于农作物的种质伪和纯度检测, 也有研究者用该方法鉴别当归与其他物种的亲缘关系^[5-6]。刘新星等^[7]利用 SSR 标记鉴定当归的真实性, 结果显示当归与近缘属种间的遗传距离最小值明显大于 4 个产地的当归种内遗传距离最大值, 因此认为 SSR 标记可有效地区分当归与其它近缘属药材, 但应用 SSR 分子标记对当归不同品种(系)的研究未见报道。因此, 本研究建立了适用于当归的 SSR-PCR 反应体系, 旨在对不同当归品种(系)间的遗传关系进行研究, 构建不同当归品种(系)的分子身份证, 为当归新品种(系)选育提供科学依据, 也为深入开展当归种质纯度鉴定、遗传图谱构建、优良性状标记等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料收集

2019年7月采集甘肃省定西市渭源县当归育苗

基地(2322 m; 35°5'9.3"N, 103°58'32.15"E)所有当归品种(系)样本, 共有 11 个品种(系) 194 份样本, 具体样本信息见表 1。所有样品经甘肃中医药大学中药资源学教研室晋玲教授鉴定为伞形科当归属当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels 的叶片。取样时挑选健康、无病虫害的新鲜叶片, 每个居群随机选取 3~30 个样本, 部分材料因受自然灾害缺失, 故样本数量较少。采集后装入含硅胶的密封袋中快速干燥, 根据品种(系)名称进行编号, 带回实验室后存放于阴凉干燥处保存。

表 1 当归样品信息

Table 1 Samples information of *A. sinensis*

序号	品种(系)	样本编号	样本数
1	岷归 1 号 (M1)	1-1~1-24	24
2	岷归 2 号 (M2)	2-25~2-43	19
3	岷归 3 号 (M3)	3-192~3-194	3
4	岷归 4 号 (M4)	4-44~4-65	22
5	岷归 5 号 (M5)	5-66~5-91	26
6	岷归 6 号 (M6)	6-66~6-116	25
7	新品系 D42017-01 (N1)	7-117~7-146	30
8	新品系(半紫半绿茎) (N2)	8-147~8-174	28
9	10G 辐照 (10G)	9-175~9-178	4
10	20G 辐照 (20G)	10-179~10-186	8
11	30G 辐照 (30G)	11-187~11-191	5

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 利用试剂盒法(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)提取所有当归样品总 DNA, 提取方法参照课题组前期研究中的试验方法^[8]。

1.2.2 PCR 扩增 采用的 10 对 SSR 引物, 引物参照 Lu 等^[9]筛选出的引物序列。为了便于进行标记的

检测, 每对引物中的正向引物 5'端含有荧光标记 FAM (blue)、HEX (green), TAMRA (yellow), ROX (red), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 反应总体积为 25 μ L, 10 \times Taq buffer 2.5 μ L, BSA 牛血清蛋白 0.5 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, dNTPs 1.0 μ L, Taq DNA 酶 0.5 μ L, ddH₂O 16.5 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 40 s 退火; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 保存结束 4 $^{\circ}$ C。扩增产物通过 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 在凝胶成像仪中观察结果, 将条带清晰明亮、无拖尾现象且排列整齐的扩增产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行毛细管电泳检测和 STR 分型。

1.2.3 数据统计与分析 利用 Popgen version 1.31 软件^[10]计算各个当归品种(系)的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Nei 期望杂合度(Nei)等。采用 Structure version 2.3.4 软件^[11]进行群体遗传结构分析[参数设置: Burnin 设为 100000; MCMC 重抽样设为 1 100 000; 分组数(K)设为 2~11, 均重复 10 次], 利用在线工具 Structure Harvester 并根据 Evanno 等^[12]的算法计算 ΔK , 确定最合适的分组数, 利用 CLUMPP Version 1.1.2 软件^[13]进行重复抽样分析, 并运用 Distruct 1.1 软件^[14]进行结构分析的图形化显示。应用 NTSYS 软件^[15]构建各品种(系)的 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类树状图。应用 GenALEX^[16]软件进行 AMOVA (analysis of molecular variance) 分析 (排列检验 999 次)。

1.2.4 DNA 分子身份证的构建 采用 SSR 荧光标记毛细管电泳技术, 获得 194 个当归样品 SSR 扩增片段的精确相对分子质量, 并进行数字加英文字母编码。将每对引物扩增所有样品的不同带型, 按当归样品编号顺序用数字 1~9 依次表示, 超出 9 的用英文字母 A~Z 依次表示, 构建字符串形式的 DNA 分子身份证。去除重复身份证号后, 按品种(系)分类, 得到不同品种(系)当归的分子身份证。将对应字符串导入在线条码生成器 (http://barcode.cnaidc.com/html/BCG_code128b.php), 生成可供扫描的条形码 DNA 分子身份证; 将不同品种(系)的育种方式、形态特征特性、品质特性及 DNA 分子身份证代码等文本信息输入在线二维码生成器 (<https://cli.im/>), 生成可扫描的二维码 DNA 分子身份证^[17]。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

由表 2 可知, 11 个品种(系)中, 平均 N_a 、 N_e 、 I 、 H_o 、 H_e 、Nei 最大值分别为 3.500 0、2.175 8、0.812 2、0.436 7、0.465 1、0.458 3, 最小值分别为 1.523 9、0.878 1、0.480 2、0.225 0、0.360 0、0.304 2, 平均值为 2.738 5、1.864 9、0.653 4、0.341 4、0.407 0、0.385 5。

2.2 亲缘关系分析

基于 10 对 SSR 引物数据, 利用 popgene 软件计算出当归不同品种(系)的 Nei's 遗传距离 (表 3), 其遗传距离在 0.026 2~0.281 7, 平均遗传距离为 0.127 5, 遗传距离最远的是新品系 D42017-01 (N1) 和 10G 辐照品系 (10G), 遗传距离最近的是岷归 2 号 (M2) 和岷归 4 号 (M4)。

表 2 11 个当归品种(系)的遗传信息参数

Table 2 Genetic information of *A. sinensis* cultivars (lines)

名称	N_a	N_e	I	H_o	H_e	Nei
M1	1.523 9	0.878 1	0.480 2	0.338 6	0.414 6	0.406 0
M2	2.900 0	1.950 8	0.650 4	0.312 0	0.364 0	0.354 4
M3	1.900 0	1.611 2	0.475 9	0.316 7	0.370 0	0.304 2
M4	3.500 0	2.175 8	0.806 2	0.368 2	0.450 4	0.440 2
M5	3.400 0	2.034 1	0.687 1	0.371 7	0.378 8	0.371 4
M6	3.400 0	2.164 2	0.785 4	0.363 8	0.433 1	0.424 3
N1	3.500 0	2.069 0	0.793 8	0.436 7	0.466 1	0.458 3
N2	3.300 0	2.150 3	0.812 2	0.418 7	0.465 1	0.456 7
10G	2.200 0	1.918 0	0.576 8	0.225 0	0.396 4	0.346 9
20G	2.400 0	1.813 7	0.590 7	0.364 3	0.378 6	0.354 5
30G	2.100 0	1.748 5	0.528 7	0.240 0	0.360 0	0.324 0
平均值	2.738 5	1.864 9	0.653 4	0.341 4	0.407 0	0.385 5

表 3 当归各品种 (系) 间 Nei's 遗传距离
Table 3 Nei's genetic distance in *A. sinensis* cultivars (lines)

品种 (系) 名称	M1	M2	M3	M4	M5	M6	N1	N2	10G	20G	30G
M1	0										
M2	0.050 1	0									
M3	0.191 4	0.131 8	0								
M4	0.040 5	0.026 2	0.140 0	0							
M5	0.030 7	0.021 3	0.158 9	0.032 0	0						
M6	0.068 0	0.059 9	0.151 9	0.059 3	0.058 3	0					
N1	0.068 3	0.125 1	0.266 3	0.069 9	0.100 0	0.078 8	0				
N2	0.092 6	0.154 3	0.241 3	0.131 2	0.126 7	0.114 2	0.062 8	0			
10G	0.208 6	0.159 0	0.192 2	0.195 8	0.150 8	0.205 1	0.281 7	0.181 7	0		
20G	0.146 0	0.106 7	0.132 3	0.131 2	0.104 2	0.160 2	0.224 2	0.115 5	0.080 8	0	
30G	0.167 0	0.078 7	0.126 8	0.100 1	0.098 5	0.163 3	0.228 2	0.219 5	0.125 2	0.076 9	0

为了进一步分析当归品种 (系) 间的亲缘关系, 利用 NTSYS 软件构建 11 个当归居群的遗传距离 UPGMA 聚类图 (图 1)。由图 1 可知, 在遗传距离 0.17 处, 11 个当归品种 (系) 分为 2 类, 在第 1 大类中又分为 2 小类, 岷归 1 号 (M1)、岷归 2 号 (M2)、岷归 5 号 (M5)、岷归 4 号 (M4) 和岷归 6 号 (M6) 亲缘关系较近聚为一类, 新品系 D42017-01 (N1) 和新品系 (半紫半绿茎) (N2) 亲缘关系较近聚为一类。

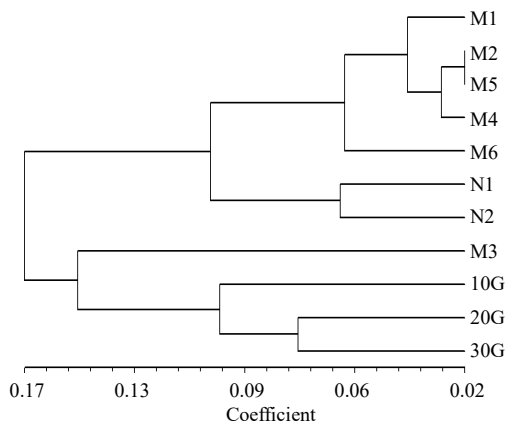


图 1 当归遗传距离 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of *A. sinensis* based on Nei's genetic distance

2.3 居群遗传结构分析

基于 10 个 SSR 标记对当归进行了 Structure 群体结构分析, 当 $K=5$ 时, ΔK 值最大 (图 2), 当归样本被分为了 5 个小群 (图 3 和表 4), 结合图和表可以看出, 参试当归样本没有按照居群分类, 每份资源都由 5 种颜色组成, 资源的杂合度较高。岷归

1 号以绿色为主; 岷归 2 号以绿色和蓝色为主; 岷归 3 号、10G 辐射、20G 辐射及 30G 辐射遗传结构类似, 均以蓝色为主; 岷归 4 号和岷归 5 号遗传结构类似, 以绿色和黄色为主, 岷归 6 号以黄色为主, 新品系 D42017-01 (N1) 和新品系 (半紫半绿) (N2) 遗传结构类似, 以红色为主。AMOVA 分析结果见表 5, 居群内的变异百分比达到 78%, 不同品系当归的遗传变异主要存在于居群内。

2.4 分子身份证的构建

利用 10 对引物对 194 个当归样本进行 SSR 荧光标记毛细管电泳, GeneMapper 读取相对分子质量数据, 表 6 为各引物序列、5'端标记的荧光基团、退火温度、扩增得到的多态性条带总数、多态性片段大小及编码汇总。利用毛细管电泳多态性片段及编码信息构建 DNA 分子身份证。对毛细管电泳结果按表 6 进行数字加英文字母编码, 将 C25、C32、C34、C03、C019、C023、C024、C027、C028、P9 这 10 对引物按上述顺序将该 10 对引物对应的编码组合, 构成应用当归不同品种 (系)

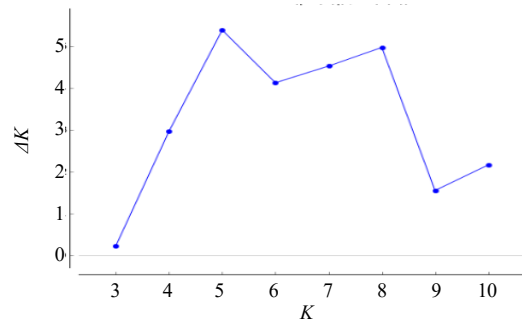


图 2 不同分组数的 ΔK 值

Fig. 2 ΔK of different clusters

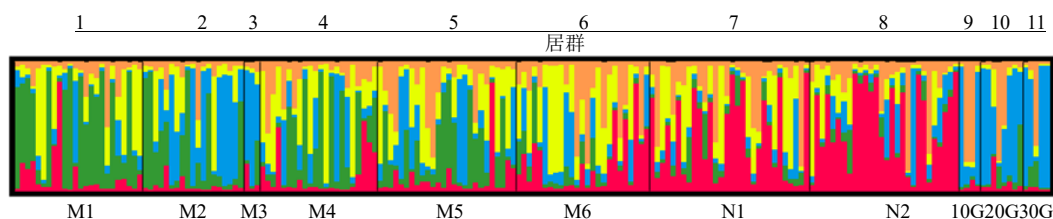


图3 基于10个SSR位点的当归群体结构(K=5)

Fig. 3 Population structure of *A. sinensis* using STRUCTURE based on 10 SSR loci (K=5)

表4 基于10个SSR位点的当归群体结构(K=5)

Table 4 Population structure of *A. sinensis* using STRUCTURE based on 10 SSR locus (K=5)

品种(系)	含量/%				
	红色	绿色	蓝色	黄色	橘色
M1	11.56	48.26	8.34	22.93	8.91
M2	3.92	32.01	39.44	17.22	7.41
M3	9.29	13.18	66.86	5.33	5.35
M4	11.68	30.57	17.12	27.26	13.37
M5	9.93	26.98	21.01	25.55	16.54
M6	20.71	8.99	17.05	32.04	21.21
N1	40.68	7.92	7.39	24.89	19.12
N2	53.38	5.66	13.60	13.64	13.71
10G	4.41	2.14	50.08	3.56	39.81
20G	6.56	10.36	58.21	6.60	18.27
30G	2.28	8.21	70.17	4.07	15.27

表5 基于10个SSR位点的当归群体分子方差分析

Table 5 AMOVA analysis of *A. sinensis* populations based on 10 SSR locus

变异来源	自由度	平方和 SS	变异组成	变异百分比/%
群体间	10	93.624	0.202	9
群体间个体内	183	451.394	0.312	13
居群内	194	357.500	1.843	78

DNA分子身份证,即字符串DNA分子身份证(表7)。如岷归1号(M1)的一种DNA分子身份证编码为1111111111,对照表2,第1个数字1表示引物C25在岷归1号某一份样品中的扩增片段,在其多态性片段梯度中排第1位,第2个数字1表示引物C32在该样品扩增的片段,在其多态性片段梯度中排第1位,其余代码依次类推(表7)。图4为引物C028荧光毛细管电泳检测到的5种特征带型,对应的片段大小分别为268/268、266/266、268/272、266/268、264/264 bp;图5为引物P9荧

光毛细管电泳检测到的13种特征带型,对应的片段大小分别为139/139、135/137、137/137、125/125、125/137、135/135、137/139、125/139、125/135、135/139、133/135、127/127、123/135 bp。将DNA分子身份证编码导入在线条码生成器,生成条形码DNA分子身份证。将当归11个品种(系)的主要描述和DNA分子身份证编码导入二维码生成软件,生成二维码DNA分子身份证。基于字符串、条形码、二维码3种形式,成功构建出当归11个不同品种(系)的DNA分子身份证,图6为构建的部分条形码DNA分子身份证示例和岷归1号至6号的二维码DNA分子身份证示例。

3 讨论

SSR是存在于真核生物基因组非编码区的一段简单重复序列,在物种进化过程中呈现较为保守的特性,因此常用于DNA指纹图谱的构建和物种鉴别。SSR序列也被称为微卫星序列(microsatellites)^[18]

表 6 10 对引物信息、毛细管电泳结果及带型编码

Table 6 Information of 10 pairs of SSR primes and amplification results and code of primers detected with capillary electrophoresis

引物名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	荧光基团	退火温度/℃	毛细管电泳多态性位点	毛细管电泳多态性片段大小/bp 编码
C25	CTTGGTTTGTCTTG- TCTCCGTT	CTTTGTAAGCCC- AGTAGTATGCT	FAM	54	12	253/266 (1)、251/266 (2)、255/266 (3)、245/268 (4)、253/253 (5)、266/266 (6)、253/268 (7)、247/247 (8)、243/266 (9)、243/264 (A)、264/264 (B)、268/268 (C)
C32	AGCTCTTCTTCTTG- AACGTCGT	CACTCAATCACT- TACCTCCCC	HEX	55	8	256/256 (1)、258/258 (2)、252/256 (3)、252/252 (4)、250/250 (5)、256/260 (6)、251/251 (7)、252/258 (8)
C34	AGTAGAGGAGAAA- TGATACAAAGCA	CAACTTCGATCAT- TGTTCCGCA	TAM	53	19	209/209 (1)、203/203 (2)、201/201 (3)、201/203 (4)、190/203 (5)、190/201 (6)、190/209 (7)、199/199 (8)、190/199 (9)、199/209 (A)、190/190 (B)、199/201 (C)、201/207 (D)、190/207 (E)、199/207 (F)、201/209 (G)、203/209 (H)、191/209 (I)、190/205 (J)
C03	AGCCAAACAGCTC- CTTAAAGAGA	TGCAACAACAAT- ATCAAATAAGGCC	ROX	53	7	242/242 (1)、240/240 (2)、242/244 (3)、244/244 (4)、240/242 (5)、238/240 (6)、238/238 (7)
C019	ATGCCAAGTAGCT- CCAATCACT	CATTAACGAGC- ACTGCAGAAC	FAM	54	13	190/190 (1)、190/195 (2)、190/193 (3)、195/195 (4)、180/190 (5)、187/190 (6)、187/187 (7)、187/195 (8)、190/192 (9)、192/195 (A)、190/180 (B)、195/180 (C)、180/180 (D)
C023	CCGCCTTCTCAC- CTCTTTACT	TTAAATTGGCGA- CTGCAATGCT	HEX	53	2	156/156 (1)、158/158 (2)
C024	ACCCGTCGTCAAAA- TATCTTTCTCT	CAAGTCCAAGTC- TTACCGACCA	ROX	54	9	249/253 (1)、247/247 (2)、252/252 (3)、249/252 (4)、247/253 (5)、249/249 (6)、241/253 (7)、248/252 (8)、250/252 (9)
C027	AGTTAGCAATCTC- CTTCGCCAA	CCGCCAGACCTG- TATGACTAAA	FAM	54	8	180/180 (1)、180/182 (2)、182/182 (3)、178/180 (4)、184/184 (5)、178/184 (6)、178/178 (7)、178/182 (8)
C028	AATAACTTCGCTC- GTGGTCACT	AGTGTGTGCCGA- AACAATTGAA	HEX	52	5	268/268 (1)、266/266 (2)、268/272 (3)、266/268 (4)、264/264 (5)
P9	ATGTAGTAACCTT- TCCGCGGTT	TGTAACGAGAGC- GATACTGATGA	ROX	53	13	139/139 (1)、135/137 (2)、137/137 (3)、125/125 (4)、125/137 (5)、135/135 (6)、137/139 (7)、125/139 (8)、125/135 (9)、135/139 (A)、133/135 (B)、127/127 (C)、123/135 (D)

和短串联重复序列 (short tandem repeat, STR), 通常由 2~6 个重复的核苷酸构成^[19]。本研究利用 10 对 SSR 引物分析了 11 个当归品种 (系) 的遗传多样性, *I* 和 *Nei* 的平均值分别为 0.653 4 和 0.385 5。这说明当归在物种水平上遗传多样性较高, 与课题组前期用 ISSR 分子标记得到的结果一致^[20]。与同样栽培历史悠久的人参、地黄及同属的药用植物杭白芷相比, 当归具有更高的遗传多样性^[21-23]。当归 11 个品种 (系) H_o 低于 H_e , 说明存在自交现象^[24], 符合人们从已有的当归植物中选育当归新品 (系) 种的事实。

FIS 为种群内近交系数, 表示亚群中个体间由于非随机交配而导致的亚群内杂合度的缺失状况, 总近交系数 FIT 则反映总群体中杂合度的缺失程

度, 其值均在 -1~1, 近交系数 >0 表示杂合子缺失, 近交系数 <0 表示杂合子过剩^[25]。FST 表示种群间的分化程度, Wright^[26]认为 $FST \leq 0.05$ 时, 种群间分化很小或几乎无分化; FST 在 0.05~0.15 间时, 中等程度分化, 在 0.15~0.25 明显分化, 当 $FST > 0.25$ 时, 种群间极度分化。*F* 检验表明, 当归群体的 FIS、FIT 均为正值 (FIS=0.136, FIT=0.218), 说明当归的各个品种 (系) 间存在近交现象, 各品种 (系) 以纯合子为主。 FST 为 0.086, 说明当归品种 (系) 中存在中等程度分化。基因流 N_m 是影响种群分化的一个重要因素, 当 $N_m < 1$ 时, 说明各种群间的基因交流水平低, 种群可能由于遗传漂变产生了分化^[25]。当归不同品种 (系) 间的基因流 N_m 为 2.667, 说明当归品种 (系) 间存在着较为频繁的

表 7 11 个当归品种 (系) 的分子身份证

Table 7 Molecular ID codes of 11 *A. sinensis* cultivars (lines)

品种 (系)	分子身份证 (ID)
M1	111111111, 122111112, 133211113, 113321112, 114211113, 215211113, 116321112, 217411114, 245221115, 115231116, 214111114, 316241114, 114101117, 224111114, 142411123, 243111213, 114111114, 412211114, 113211114, 216221115, 115241118, 236121124, 118211113, 115211114
M2	114211116, 2194111314, 114511114, 113211129, 215221113, 116211111, 51621111A, 116141116, 113211114, 118211116, 113251214, 11A211116, 118211118, 11B111113, 115261116, 116261111, 11A2112136, 117261113, 1172011146
M3	61C5213116, 11C2014129, 6182111125
M4	241211116, 113221112, 21D2212344, 1131411213, 21E2711216, 113261116, 113231124, 216271115, 113251129, 118261113, 217261113, 116121121, 72312111A, 317211111, 11F18111B, 118211119, 117211113, 113121115, 259291115, 233211147, 118141112
M5	118211142, 216251131, 1122111333, 16G121116, 11C271114, 11E111116, 21G11111B, 11E111119, 61D111114, 216111146, 22E211112, 11E21111A, 236211114, 213511212, 11E011114, 11E211119, 117211112, 217211112, 117211115, 11321111A, 246111110, 113511115, 11H2115114, 216111112, 31E111116
M6	23G2115143, 23E2211119, 21D2215111, 237521114, 237211143, 21721111A, 11A511115, 219211119, 11F211117, 21A211141, 119211113, 21E212115C, 23E212119, 8182126114, 608211125, 11E211113, 21C2112144, 230212119, 143211114, 243211219, 95B211123, 219211113, 243212113, A782211215, 219541114
N1	24E2111214, 2232111414, 1362111213, 24E521113, 21B2411516, 24B541115, 23E5117213, 1162111215, 2462111143, 246541111D, 2162211613, 6365211143, 2152A11713, 1352111213, 25E1111313, 2435211115, 2464411112, 2565411115, 1165111144, 21I2211815, 25J541114, 2835411144, 1532111215, 2162211415, 243511114, 1132111213, 2132111815, 118211113, 1532111315, 2435211145
N2	2162116515, 1562411115, 24E2111315, 145511115, 636511114, 63B1111315, 636221112, 1152111245, 2455411143, 6451211115, 2451111145, 1462118114, 1452418115, 2162418614, 1185118215, 14B5419114, 13E2118215, 1535118145, B566218114, 6192118114, 6535218115, 6365118115, B152118214, 2062118215, 63E2118214, 6463218116, 14E4218115, 2431218114
10G	1182118116, C1C1118216, B497118116, 2132118114
20G	2162118116, 6181118214, 11E1218114, 6660118149, 11E5B08118, 11F2B18116, 1132C18116
30G	11F2B11116, 1162B11116, 1131111314, 6182B18116, 6182D13106

0 表示未扩增出带型

The unamplified band type was indicated by 0

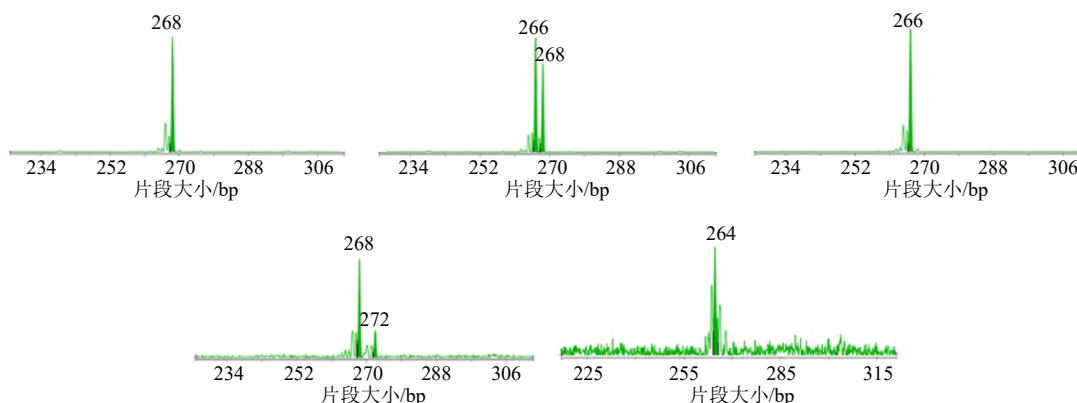


图 4 C028 毛细管电泳荧光检测的特征带型

Fig. 4 Characteristic band features of the primer of C028 detected by capillary electrophoresis

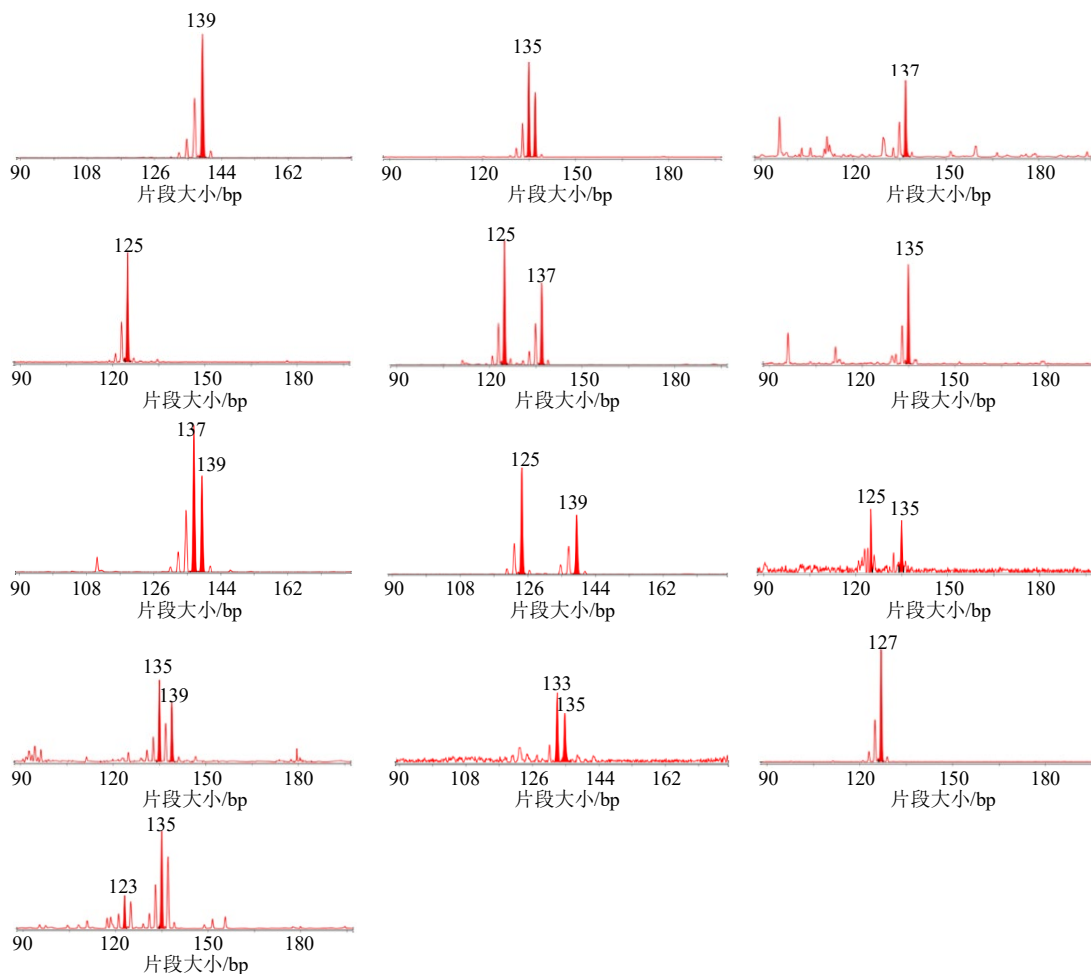
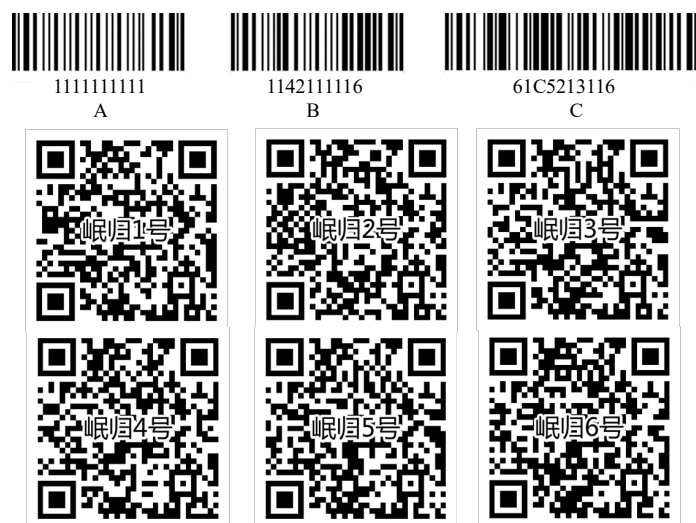


图5 P9毛细管电泳荧光检测的特征带型

Fig. 5 Characteristic band features of primer of P9 detected by capillary electrophoresis



A-峨眉1号条形码 DNA 分子身份证 B-峨眉2号条形码 DNA 分子身份证 C-峨眉3号条形码 DNA 分子身份证

A-bar code DNA molecular identification of M1 B-bar code DNA molecular identification of M2 C-bar code DNA molecular identification of M3

图6 当归条形码 DNA 分子身份证和峨眉1~6号二维码 DNA 分子身份证示例

Fig. 6 Examples of Danggui barcode DNA molecular ID card and mingui No. 1—6 QR code DNA molecular ID card

基因交流。当归品种初始选育就是对人工栽培种选择提纯复壮的过程^[27]，对不同品种（系）当归进行了 Structure 群体结构分析，根据 Evanno 等^[12]的算法计算 ΔK ，确定最合适的分组数为 5，并没有按品种（系）划分，且各个品种（系）都由 5 种颜色组成，资源的杂合度较高，与较低的遗传分化系数和较高的基因流均说明，目前当归选育工作还需要对现有的品种（系）继续进行纯化。

DNA 分子身份证是证实和区分不同材料的有效证明，具有唯一性、可鉴别性等特点，如今二维码技术的运用有效地容纳了数字、文字、字母、图片等信息，且能够迅速被电脑、手机等电子设备全方位识别，大大增加了其使用范围^[17]。分子身份证已被广泛应用于农作物和果蔬的种质研究中，而在中药材领域还处于刚刚起步的阶段^[27]，一个重要的原因是农作物和果蔬往往有几十到几百种的种质资源^[28-29]，且不同种质资源选育时间较长，纯度较高，品种间差异较大。而中药材如当归，虽然有 1700 多年的人工栽培种植历史，但其新品种选育工作始于 20 世纪 90 年代，随着当归 3 年栽培模式下早期抽薹问题以及随着当归种植年限延长，连作障碍凸显、病虫害逐年加重，已成为限制当归产业可持续发展的瓶颈。当归不同品种（系）间遗传分化程度较低，基因交流频繁，植物鉴别中常用的 ITS2 条形码对不同产地（不同来源）的当归的不能进行有效区分^[30]。本研究采用 SSR 荧光标记毛细管电泳技术，获得 194 个当归样品 SSR 扩增片段的精确分子量，通过构建不同品种（系）当归的分子身份证，同时又生成条形码和二维码 2 种分子身份证形式，有效区分了 11 个当归品种（系），为当归新品种选育工作提供科学依据，具有一定的实践指导意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 139.
- [2] 盛丽, 王蒂, 司怀军. 甘肃省当归种质资源的 RAPD 分析 [J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(4): 60-64.
- [3] 张宏意, 廖文波. 当归种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中药材, 2014, 37(4): 572-575.
- [4] 严明春, 晋玲, 朱田田, 等. 应用 ISSR-PCR 分析法鉴别当归品种的研究 [J]. 中药材, 2014, 37(2): 236-239.
- [5] Park S I, Lee Y, Hwangbo K, *et al.* Determination of the origin of *Angelica* roots using *Angelica gigas* chloroplast based SSR markers [J]. *Korean J Med Crop Sci*, 2017, 25(6): 361-366.
- [6] Park S I, Kim S, Gil J, *et al.* Development of chloroplast DNA-based simple sequence repeat markers for *Angelica* species differentiation [J]. *Korean Soc Med Crop Sci*, 2016, 24(4): 317-322.
- [7] 刘新星, 欧巧明, 罗俊杰, 等. 利用 SSR 标记鉴定当归的真实性 [J]. 甘肃农业科技, 2020(7): 43-48.
- [8] 朱田田, 晋玲, 张裴斯, 等. 基于 ISSR 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3549-3557.
- [9] Lu Y Y, Cheng T, Zhu T T, *et al.* Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite markers for the "Female Ginseng" *Angelica sinensis* (Apiaceae) and cross-species amplification [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 61: 488-492.
- [10] Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) [EB/OL]. [2021-12-6]. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>.
- [11] Earl D A, vonHoldt B M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method [J]. *Conserv Genet Resour*, 2012, 4(2): 359-361.
- [12] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [13] Jakobsson M, Rosenberg N A. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(14): 1801-1806.
- [14] Rosenberg N A. Distruct: A program for the graphical display of population structure [J]. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4(1): 137-138.
- [15] Rohlf F, Rohlf F. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1: Owner manual [D]. New York: Seauket, 1992.
- [16] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: An update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [17] 郭艳春, 张力岚, 陈思远, 等. 黄麻应用核心种质的 DNA 分子身份证构建 [J]. 作物学报, 2021, 47(1): 80-93.
- [18] Vogt P. Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin folding code" [J]. *Hum Genet*, 1990, 84(4): 301-336.
- [19] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics* [M]. New York: Columbia University Press, 1987: 159-164.

- [20] 朱田田, 晋玲, 黄得栋, 等. 野生与栽培当归遗传多样性比较 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 211-218.
- [21] Jang W, Jang Y, Kim N H, *et al.* Genetic diversity among cultivated and wild *Panax ginseng* populations revealed by high-resolution microsatellite markers [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(4): 637-643.
- [22] 李翠翠, 胡赛文, 夏至. 基于 ISSR 的地黄栽培品种与野生群体遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 6054-6061.
- [23] 刘倩倩, 叶浩婷, 李放, 等. 杭白芷种质资源遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(3): 418-423.
- [24] Levene H. On a matching problem arising in genetics [J]. *Ann Math Statist*, 1949, 20(1): 91-94.
- [25] Nagylaki T. Fixation indices in subdivided populations [J]. *Genetics*, 1998, 148(3): 1325-1332.
- [26] Wright S. Evolution and the genetics of populations. A treatise in four volumes. Volume 4. Variability within and among natural populations [J]. *J Biosocial Sci*, 1972, 4(2): 253-256.
- [27] 周骏辉, 袁媛, 黄璐琦. SSR 标记在中药材分子身份证体系构建中的应用 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(10): 1233-1236.
- [28] 关利平, 王玲玲, 曹珂, 等. 桃品种鉴定的 SSR 核心引物筛选及其应用 [J]. 中国果树, 2021(6): 33-38.
- [29] 武志江, 邓海燕, 梁桂东, 等. 利用荧光标记 SSR 构建火龙果种质资源分子身份证 [J]. 中国南方果树, 2020, 49(4): 20-28.
- [30] 刘新星, 欧巧明, 石有太, 等. 基于 ITS2 序列鉴别道地药材岷县当归及其混伪品 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4877-4883.

[责任编辑 时圣明]