

瓜蒌 SSR 标记开发及遗传多样性分析

何庆元¹, 周芯雨¹, 孙武², 徐荣华¹, 朱军军², 王传文³, 何克勤¹, 周成¹, 李正鹏^{1*}

1. 安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100

2. 潜山市农业科学研究所, 安徽 潜山 246300

3. 潜山市传文瓜子有限公司, 安徽 潜山 246300

摘要: 目的 开发 SSR 分子标记, 分析不同产地瓜蒌 *Trichosanthis Fructus* 药材的遗传结构和进化及不同种质资源的遗传多样性。方法 提取瓜蒌 RNA, 反转录获得 cDNA, PCR 富集得到 cDNA 文库, 经高通量测序, 组装后, 获得高质量 Unigene 后, 用 MISA (MicroSatellite identification tool) 鉴定简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 设计两端引物, 从中选取 64 对引物对 13 个来源于 3 个地理居群的瓜蒌资源进行群体结构和遗传多样性分析。结果 所开发的 SSR 标记具有良好的功效, 在选用的整个群体中, 其多态性信息含量 (polymorphic information content, PIC)、观察等位基因数 (number of observed alleles, N_a)、有效等位基因数 (number of effective alleles, N_e)、香农信息指数 (Shannon information index, I) 和 Nei 遗传距离 (Nei genetic distance, GD) 依次为 0.758 7、3.531 2、2.588 3、1.000 6 和 0.559 2, 3 个自然群体之间, 合肥和潜山自然群体的遗传相似性高, 达到 0.941 7, 与其他野生资源之间存在较大的遗传差异。经聚类分析, 将 13 个品种资源分成 2 个亚群, 其中 2 个长萼瓜蒌资源单独组成 1 个亚群, 其余 11 个双边瓜蒌 *Trichosanthes rosthornii* 资源被分为另外 1 个亚群, 而双边瓜蒌又被分为 2 个亚群, 并且 4 个合肥育成品种分别在不同的亚群中, 表明合肥育成品种来源较丰富。其他地区瓜蒌种质资源与安徽原产地瓜蒌遗传差异较大, 能够为安徽瓜蒌育种拓宽种质资源基础。

关键词: 瓜蒌; 双边栝楼; 长萼瓜蒌; SSR; 标记开发; 遗传多样性

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-5991-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.025

Development of SSR markers and analysis on genetic diversity of *Trichosanthis Fructus*

HE Qingyuan¹, ZHOU Xinyu¹, SUN Wu², XU Ronghua¹, ZHU Junjun², WANG Chuanwen³, HE Keqin¹, ZHOU Cheng¹, LI Zhengpeng¹

1. Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

2. Qianshan Agricultural Science Research Institute, Qianshan 246300, China

3. Qianshan Chuanwen melon seeds Co., Ltd., Qianshan 246300, China

Abstract: Objective To elucidate the genetic structure and evolution of Gualou (*Trichosanthis Fructus*) originating from diverse regions and the genetic diversity of various germplasm resources, SSR molecular markers were designed and utilized. **Methods** RNA of *Trichosanthis Fructus* was extracted, reversed transcription to obtain cDNA, and enriched to obtain cDNA library with PCR reaction. High-quality Unigenes were obtained using high-throughput sequencing and assembly. Simple sequence repeats (SSRs) were identified using MicroSatellite identification tool (MISA), and primers were designed at both ends of the SSR. 64 pairs of primers were selected to analyze the population structure and genetic diversity of 13 resources from three natural populations. **Results** The developed SSR markers have good efficacy. The polymorphic information content (PIC), number of observed alleles (N_a), number of effective alleles (N_e), Shannon information index (I) and genetic distance (H) of the whole population were 0.758 7, 3.512 0, 2.588 3, 1.000 6 and 0.559 2, respectively. The genetic similarity between Qianshan and Hefei natural groups was highest, reaching 0.941 7 between the three natural populations. 13 resources were divided into two subgroups through cluster analysis. Among them, two resources of *Trichosanthes laceribractea* clustered into one subgroup separately, and the other eleven *Trichosanthes uniflora* resources were clustered into another subgroup. 11 *T. uniflora* resources had been further divided into two subgroups. The distribution of four varieties from Hefei in different subgroups indicated that the genetic basis of Hefei varieties was relatively richness. There are significant genetic differences between *Trichosanthis Fructus* germplasm resources in other and Anhui ecoregions, which could broaden the germplasm resource foundation for breeding.

收稿日期: 2023-11-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32101704); 安徽省教育厅重大项目 (KJ2023); 安庆市创新创业团队 (安庆市组办字[2023]71 号); 农作物品质改良安徽省重点实验室开放课题 (2024ZW001); 大学生创新课题 (202310879093)

作者简介: 何庆元 (1978—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: heqingyuan1@163.com

*通信作者: 李正鹏, 男, 教授, 研究方向为遗传学。E-mail: lizhengpeng71@126.com

Key words: *Trichosanthis Fructus*; *Trichosanthes rosthornii* Harms; *Trichosanthes laceribractea* Hayata; simple sequence repeats; markers development; genetic diversity

瓜蒌 *Trichosanthes kirilowii* Maxim 别名栝楼，为葫芦科栝楼属多年生攀缘性草本植物。瓜蒌籽是良好的保健休闲食品，瓜蒌根又称天花粉，是我国传统的常用中药材，用于治疗心血管、消化系统和风湿等相关疾病，还具有增强免疫力的能力^[1-2]。其主要分布于东亚及大洋洲北部，我国各地均有分布和种植，以黄淮海地区和长江中下游地区分布野生种最多^[3]。瓜蒌属植物有 80 余种，我国有 40 多种^[4]，其染色体基数都为 $X=11$ ，但有 2、4、6、8 倍不同倍性（22、44、66 和 88），当前瓜蒌栽培种多为 4 倍体（44）。

由于瓜蒌是雌雄不同株的异花授粉植物，因此具有较多的杂合位点，遗传基础较为复杂^[5-6]。先前虽然有从形态、细胞和生化同工酶水平等方面对瓜蒌的遗传分类研究，但这些研究受到环境条件影响较大。从 DNA 水平上选用一种高效的分子标记技术对瓜蒌的种质资源进行系统的遗传进化研究，能够为瓜蒌遗传改良和杂交育种等应用奠定良好的基础。虽然目前应用了，包括随机引物扩增多态性（random amplified polymorphim DNA, RAPD）^[7]和间隔简单重复多态性（inter-simple sequence repeat, ISSR）^[8]、内部转录间隔区（internal transcribed spacer, ITS）序列^[9]和相关序列扩增多态性（sequence-related amplified polymorphism, SRAP）^[10-11]等分子标记作为工具对瓜蒌遗传多样性评价进行了研究，但这些标记大多为显性标记，无法评估瓜蒌的杂合位点和真实的遗传信息。

简单重复序列（simple sequence repeat, SSR）标记，不同遗传材料重复次数的可变性，导致了 SSR

长度的高度变异性，这一变异性正是 SSR 标记产生的基础。SSR 标记的具有数量丰富、可广泛分布于整个基因组、有较多的等位性变异、显性标记、可鉴别出杂合子和纯合子、实验重复性好、结果可靠等优点。已被大量的实验证明是基于 PCR 扩增中最为高效可靠，是应用最为广泛的分子标记，是研究遗传多样性和遗传图谱构建最有力的工具之一^[12]。然而，标记的创建需要知道重复序列两端的序列信息，先前标记的开发大多数通过 cDNA 或者基因组测序进行。随高通量测序的飞速发展，RNA 测序已成为转录分析的常用和便捷工具，无需了解物种信息，大规模发现新的转录本。可以用于非编码区域功能研究、基因表达水平研究，也可以用于 SSR 标记的开发等^[13]。

由于瓜蒌雌雄异株，以无性繁殖为主，品种退化和混杂严重，当前大多数品种由野生品种驯化而来，但不同品种之间遗传关系不清，亲本的选择和品种选育水平有限。通过加强瓜蒌品种的遗传关系的研究，能为瓜蒌品种选育奠定良好的基础。本研究选用不同来源的 13 个瓜蒌品种资源，通过 RNA 测序开发了瓜蒌全基因组的 SSR 标记，利用 SSR 标记研究不同资源之间的遗传关系，为明确不同品种之间的遗传关系，促进瓜蒌合理引种及育种利用提供依据。

1 材料

13 个瓜蒌品种为安徽育成品种及相关野生资源，经安徽科技学院何庆元教授鉴定为双边栝楼 *T. rosthornii* Harms 和长萼栝楼 *T. laceribractea* Hayata，来源和类群见表 1。

表 1 瓜蒌品种及产地和类群

Table 1 Varieties, origin and populations of *Trichosanthis Fructus*

编号	品种名	产地来源	种类	类群
TB2	天宝 2 号雌	安徽潜山	双边瓜蒌	潜山
TB2X	天宝 2 号雄	安徽潜山	双边瓜蒌	潜山
QSW	潜山野生	安徽潜山	双边瓜蒌	潜山
WL9	皖筊 9 号	安徽合肥	双边瓜蒌	合肥
WL17	皖筊 17 号	安徽合肥	双边瓜蒌	合肥
WL18	皖筊 18 号	安徽潜山	双边瓜蒌	潜山
WL20	皖筊 20	安徽合肥	双边瓜蒌	合肥
WL18	皖筊 18 号籽生	安徽潜山	双边瓜蒌	潜山
SCW	四川野	四川广元	双边瓜蒌	其他野生
FJW	福建野生	福建三明	双边瓜蒌	其他野生
WL9S	皖筊 9 号籽生	安徽合肥	双边瓜蒌	合肥
TGX	吊瓜小粒	安徽凤阳	长萼栝楼	其他野生
TGD	吊瓜大粒	安徽凤阳	长萼栝楼	其他野生

2 方法

2.1 RNA 的提取、检测和 mRNA 富集

总 RNA 用天根生化科技有限公司 RNApure Pure RNA 试剂盒(北京)提取,用 NanoPhotometer® 的试剂盒(IMPLENCA, 美国)纯化 RNA, 用 Agilent2100 检测 RNA 的完整性,用 Oligo (dT) 磁珠富集 mRNA。

2.2 mRNA 片段化、cDNA 合成、纯化与文库构建

mRNA 用 Fragmentation Buffer 随机打断,用六碱基随机引物合成第 1 条 cDNA 链,然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第 2 条 cDNA 链,利用 AMPure XP beads 纯化 cDNA; 纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后用 AMPure XP beads 进行片段大小选择;最后通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。

2.3 cDNA 测序与 SSR 开发

使用 Qubit2.0 进行初步定量,使用 Agilent 2100 对文库的插入大小进行检测,符合预期大小的片段,进行 qPCR 定量文库的有效浓度(文库有效浓度 > 2 nmol/L)。用 Nova seq6000 平台进行测序,测序读长为 PE150。

测序结果组装后,用 MISA (MicroSatellite identification tool) 通过对 Unigene 序列的分析,筛选得到 1 kb 以上的 Unigene 做 SSR 分析,鉴定出 6 种类型的 SSR,并利用上下游序列设计 SSR 标记引物。

2.4 DNA 提取、PCR 扩增与凝胶电泳检测

取瓜蒌幼叶,经液氮研磨成粉末,用改良 CTAB 法提取瓜蒌基因组总 DNA^[14],琼脂糖凝胶电泳检测,获得清晰条带,-20 °C 保存备用。

10 μL 的 PCR 体系中含有 25 ng 的 DNA, 0.6 U 的 Taq 酶, 3 pmol 上下游引物, 0.6 mmol 的 dNTPs, 20 pmol 的 MgCl₂ 和 1 μL 的 10×buffer。PCR 反应程序按 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 40 s、55 °C 退火 40 s、72 °C 延伸 50 s、循环 35 次,最后 72 °C 后延伸 8 min, 12 °C 保存。

PCR 产物用 8% 非变性丙烯酰胺凝胶 200 V 电泳约 1.2 h, 电泳结束后凝胶进行银染显色。

2.5 数据获取与分析

2.5.1 居群内遗传多样性分析 将 13 个瓜蒌资源上扩增的条带经人工校正统计带型,对 13 个材料进行基因分型。计算总群和 3 个亚群的总等位点数目 (total number of alleles, TNB)、多态性位点数

(number of polymorphic loci, NPB)、多态性标记位点百分比 (percentage of polymorphic alleles, PPB)。用软件 Popgene version1.31 软件^[15]计算观察总变异位点数 (observing the number of alleles, N_a)、有效变异位点数 (effective number of alleles, N_e)、多态性信息含量 (polymorphic information content, PIC)、香农信息指数 (Shannon information index, I) 和 Nei 遗传距离 (Nei genetic distance, GD)。

2.5.2 居群间遗传变异, 基因漂移分析 用 Popgene32 软件经 1 000 次自举,计算不同群体之间的 GD 和遗传一致度 (genetic identity, GI)、基因流 (gene flow, N_m)、群间分化系数 (fixation index, F_{st}) 以及居群之间的遗传相关性,并用 MEGA4.0.2 转化为遗传树状图。

2.5.3 品种资源的遗传结构分析 利用 PowerMarkerV3.25 软件^[16],以 Nei1972 距离进行相似性分析,并利用非加权组平均法 (unweighted pair group with mathematic average, UPGMA) 对供试 13 瓜蒌资源进行聚类分析,构建不同资源亲缘关系树状图。

3 结果与分析

3.1 RNA 测序分析

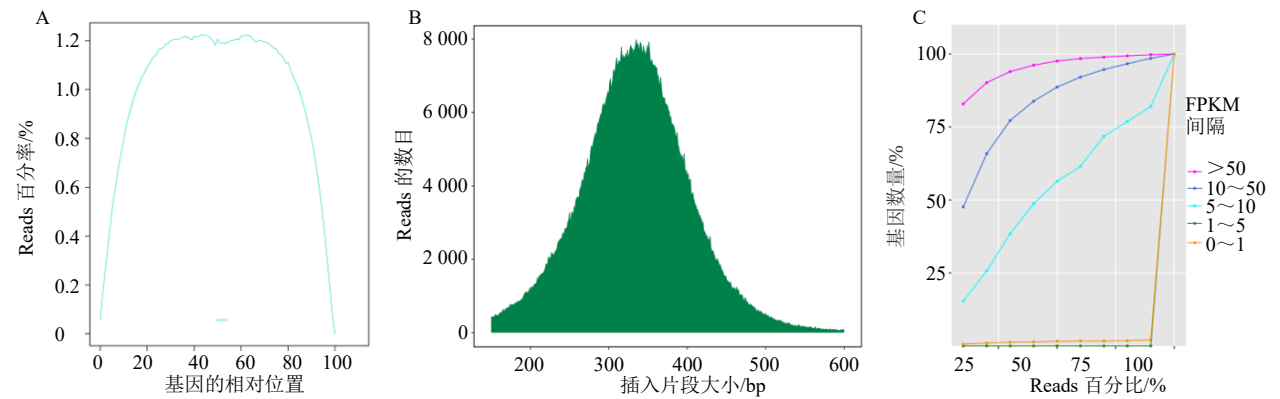
测序后,过滤掉低质量数据,共获得 24.48 百万个有效 Reads,平均长度 300 bp,共 7.34 Gb 的转录组净数据,错误概率小于 1% 占 96.92%,错误概率小于 0.1% 的数据占 91.91%,说明测序所获得的数据质量高,GC 含量为 43.90%。

从 mRNA 降解情况,插入片段的离散程度和测序饱和度来看, mRNA 片段化的随机程度中间的斜率很小 (图 1-A);说明 mRNA 降解程度很低。插入片段主峰落在 280~400 bp 附近,没有偏离目标区域,且峰型较窄,说明插入片段长度离散程度较小,插入片段大小选择正常 (图 1-B);测序数据量与基因数目之间的关系分析表明,当数据量增加到全部数据时,各类表达的基因都达到饱和程度 (图 1-C)。全部数据进行分析表达时,各类表达的基因数据达到饱和程度 (图 1-C)。说明 RNA 测序的数据降解少,分布是随机的,并且测序数据表达的基因接近饱和,说明测序的数据质量高。组装共得到 91 424 条转录本和 31 861 条 Unigene,转录本和 Unigene 的 N_{50} 分别为 2 133 和 2 005,组装完整性较高。Unigene 总长度 32.17 Mb。

3.2 SSR 标记的开发、分布及重复类型和频率特征

经 MISA (MicroSatellite identification tool) 鉴定 SSR, 分为 8 种类型: 串联不嵌入复杂重复、串联嵌入复杂重复、单碱基、双碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基重复 SSR。筛选出 1 kb 以上的

Unigene 上的 SSR 标记, 共筛选得到 8 887 个 SSR 位点, 最多的是单碱基重复 SSR 有 4 705 个, 占了 52.94%, 最少的是六碱基重复, 仅有 15 个, 在 Unigene 上平均每 Mb 有 276.25 个 SSR 标记 (表 2, 图 2-A)。



A-Mapped_reads 在 mRNA 上的位置分布; B-插入片段大小分布; C-转录组测序数据饱和度模拟图。

A-mapped reads on mRNA distribution; B-insert fragment size distribution; C-saturation simulation diagram of transcriptome sequencing data.

图 1 RNA 测序的质量

Fig. 1 Quality of RNA sequencing

表 2 瓜蒌 SSR 的类型、数量及分布特征

Table 2 Type, quantity and distribution characteristics of SSR in *Trichosanthis Fructus*

重复单元	重复次数							合计	占比/%	密度个/Mb
	5	6	7	8	9	10	>10			
串联不嵌入复杂重复	0	0	0	0	0	0	814	814	9.16	25.30
串联嵌入复杂重复	0	0	0	0	0	0	46	46	0.52	1.43
单核苷酸	0	0	0	0	0	1 877	2 828	4 705	52.94	146.25
双核苷酸	0	594	278	223	154	102	298	1 649	18.56	51.26
三核苷酸	827	380	154	108	14	20	56	1 559	17.54	48.46
四核苷酸	61	9	3	4	0	0	0	77	0.87	2.39
五核苷酸	18	2	1	1	0	0	0	22	0.25	0.68
六核苷酸	5	3	3	2	2	0	0	15	0.17	0.47
合计	911	988	439	338	170	1 999	4 042	8 887	100.00	276.25

3.3 PCR 扩增结果分析

从设计的引物序列中, 挑选出 64 对不同重复数目的标记进行引物设计验证, 其分别在皖蒌 9 号和 17 号上进行扩增筛选, 结果表明扩增效果良好, 都有条带 (图 2-B), 可以用于遗传多样性分析。64 对引物在 13 份瓜蒌 DNA 样品中共扩增出了 213 个带型, 每对引物平均扩增出了 3.35 个带型。其中 GL029 扩增的带型最多, 能产生 7 种带型, 而 GL040 和 GL049 只能扩增出纯合的 1 条带。GL018、GL053 和 GL059 只能扩增出 2 条相同的杂合带型, 其他引

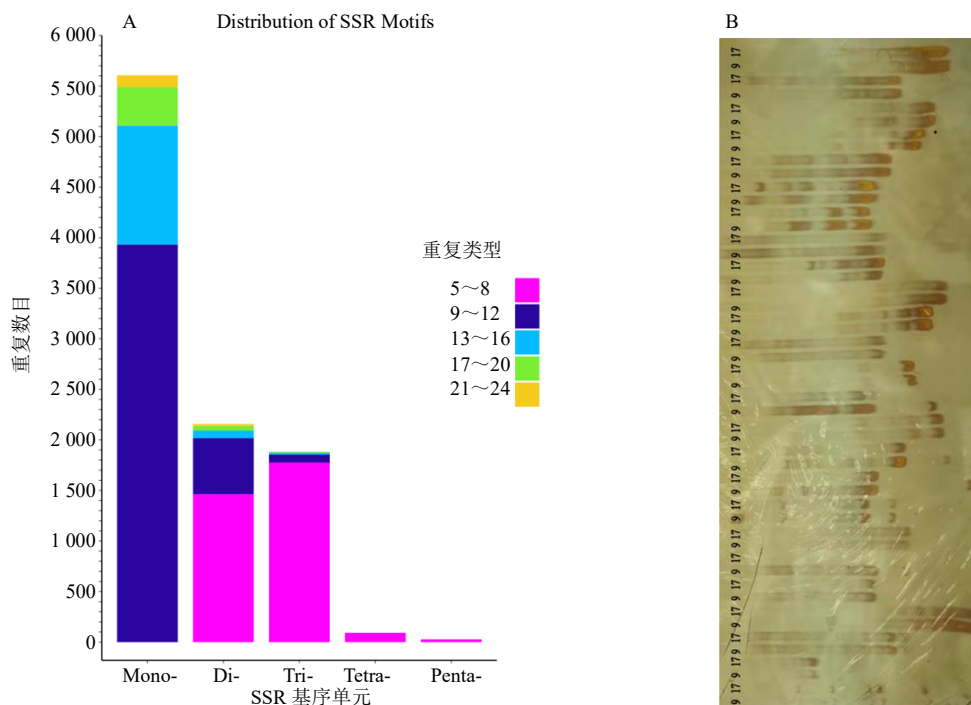
物都有多态性, 多态性引物占比 92.19%。

3.4 类群间多样性分析

将 13 个品种分为 3 类群, 从表 3 中看出整个群体多态性很高, 等位位点的 PPB 达到 92.19%, PIC、 N_a 、 N_e 、 I 和 H 依次为 0.758 7、3.531 2、2.588 3、1.000 6 和 0.559 2。在亚群内, 野生型类群的 PIC 最高, 为 0.763 7; 但合肥亚群内的 PPB、 N_a 、 N_e 、 I 和 GD 都最大。

3.5 类群间的遗传结构和基因漂移分析

从表 4 可以看出, 类群间具有较高的遗传一致



A-不同重复类型 SSR 基序的分布; B-部分引物筛选的电泳图。

A-Distribution of SSR motifs repeat type; B-A part of SSR primer screening electrophoretogram.

图 2 瓜蒌的不同重复基元的重复数目分布及部分引物筛选电泳图

Fig. 2 Distribution of SSR motifs in *Trichosanthis Fructus* and part of SSR primer screening electrophoretogram

表 3 瓜蒌类群内遗传多样性指标

Table 3 Indicators of genetic diversity in *Trichosanthis Fructus*

群体代号	样本数	NPB	PPB/%	PIC	N_a	N_e	I	GD
QS	5	53	82.81	0.759 9	2.375 0	1.997 0	0.682 6	0.421 6
HF	4	58	90.62	0.751 2	2.625 0	2.260 1	0.804 1	0.487 8
OW	4	57	89.06	0.763 7	2.500 0	2.196 7	0.780 1	0.485 7
整体	13	59	92.19	0.758 7	3.531 2	2.588 3	1.000 6	0.559 2

表 4 类群间的 GI 和 GD

Table 4 *Nei's* genetic identity and genetic distance between populations

群体代号	潜山	合肥	其他野生
潜山	****	0.941 7	0.616 2
合肥	0.060 1	****	0.760 5
其他野生型	0.484 2	0.273 7	****

Nei's 遗传一致度 (上三角) 和遗传距离 (下三角)

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

度 ($GI \geq 0.6162$), 类群间 GD 差异较大, 最小的潜山和合肥群之间只有 0.060 1, 最大的潜山和其他野生群之间达到 0.484 2; 说明不同亚群间从进化来源具有一定的差异, 所选用的瓜蒌不同群体间遗传差

异较大, 安徽合肥和潜山的类群遗传相似性达到 0.941 7。从表 4 和聚类图 (图 3) 可知, 潜山和合肥育成品种之间的遗传一致性很高, 遗传距离较近, 说明安徽当前选育栽培瓜蒌品种遗传基础狭窄。而其他野生型瓜蒌和安徽地区瓜蒌遗传距离较远, 遗传差异较大, 利用其他野生种质资源能够拓宽安徽瓜蒌育种的遗传基础, 具有较高的利用价值。

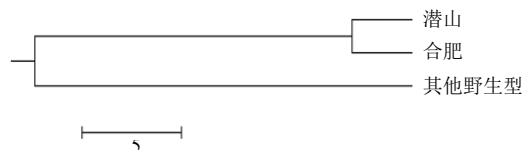


图 3 基于 *Nei's* 遗传距离类群聚类

Fig. 3 Clustering based on *Nei's* genetic distance

从类群之间的基因流和基因分化来看, 群体间的平均 F_{st} 为 0.171 8, 不同位点间看最大为 0.454 5, 最小为 0, 说明不同群体间存基因交流频率不高。类群间 N_m 平均为 1.204 8, 位点之间最大为 15.562 5, 最小为 0.300 0。可以看到瓜蒌类群遗传分化系数较大, 存在较大的生殖隔离, 不同地区育种上交换的基因并不是很多, 并且不同位点间差异很大。分子变异分析表明, 群体内变异占了 72%, 群体间变异占 12%, 个体间变异占 16%。

3.6 品种资源的遗传结构分析

13 个瓜蒌种质资源依据 Nei 氏遗传距离的聚类分析所构建的进化树见图 4, 从中可以看出, 13 个种质资源被分成 2 个群, 2 个吊瓜资源被聚为 1 个群, 其余 11 个资源被聚为另外 1 个群, 并且 2 个籽粒大小不同的吊瓜品种遗传相似系数较高, 遗传距离仅仅为 0.167, 而与其他瓜蒌资源遗传距离都超过了 0.621。在其余 11 个资源中, 又被分为 2 个亚群, WL20, WL9S 和福建以及四川野生 4 个资源被分为 1 个亚群, 其余 7 个被分为另外 1 个亚群, 其中遗传距离最小的是 WL9 和 WL17, 它们遗传距离仅仅只有 0.148, 并且他们与潜山野生型瓜蒌之间的遗传距

离也很小, WL9 与潜山野生型之间的遗传距离只有 0.161, 这 2 个品种都是从潜山野生型中选育而来, 遗传差异很小。福建和四川野生型的瓜蒌遗传距离并不大, 并且 WL9S 与福建和四川野生型资源遗传距离很近, 说明其通过杂交已渗入一定的外来基因, WL20 有可能也掺入了一定的外来基因。这也说明安徽的瓜蒌品种具有丰富的遗传多样性, 其育种中也在不断引入外来种质资源, 其遗传变异涵盖的范围较广泛。不同瓜蒌资源之间的遗传距离见表 5。

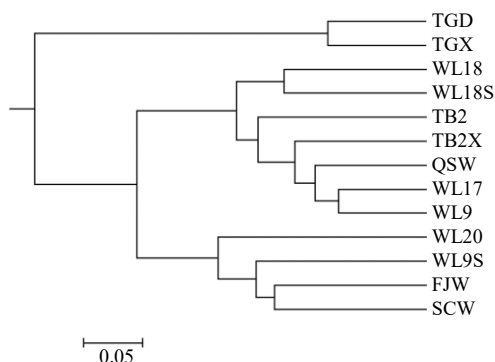


图 4 13 个瓜蒌品种资源的 SSR 分析聚类树状图

Fig. 4 SSR clustering of 13 cultivars of *Trichosanthis Fructus*

表 5 不同瓜蒌资源之间的 GD

Table 5 Genetic distance between different *Trichosanthis Fructus* resources

品种	GD												
	FJW	QSW	SCW	TB2	TB2X	TGD	TGX	WL17	WL18	WL18S	WL20	WL9	WL9S
FJW	0.000												
QSW	0.516	0.000											
SCW	0.258	0.452	0.000										
TB2	0.565	0.292	0.548	0.000									
TB2X	0.539	0.218	0.500	0.258	0.000								
TGD	0.636	0.679	0.664	0.717	0.682	0.000							
TGX	0.621	0.643	0.621	0.714	0.664	0.167	0.000						
WL17	0.555	0.218	0.500	0.315	0.266	0.664	0.681	0.000					
WL18	0.445	0.347	0.383	0.355	0.383	0.709	0.655	0.281	0.000				
WL18S	0.524	0.350	0.484	0.367	0.371	0.689	0.714	0.194	0.242	0.000			
WL20	0.375	0.395	0.266	0.492	0.438	0.673	0.586	0.438	0.313	0.435	0.000		
WL9	0.570	0.161	0.484	0.282	0.188	0.682	0.672	0.148	0.313	0.274	0.438	0.000	
WL9S	0.258	0.508	0.320	0.621	0.563	0.664	0.647	0.523	0.531	0.508	0.422	0.547	0.000

4 讨论

4.1 SSR 用于瓜蒌遗传分析适用性

由于 SSR 分子标记具有分布广、较多的等位性变异、共显性标记、重复性高、结果可靠等优点已经被广泛应用于遗传多样性分析、基因/QTLs 定位和分子标记辅助选择, 包括绝大多数大田和园艺作物的国家或行业标准的分子图谱鉴定都利用 SSR 分子

标记^[17-20]。但 SSR 标记的开发需要序列信息, 瓜蒌由于研究较少, 基因组序列信息未知, 迄今还未见瓜蒌相关的 SSR 报道。本研究通过 RNA 测序, 开发了 8 887 个 SSR 位点, 并设计了相关引物, 进一步从中选取了 64 对引物在 13 个瓜蒌品种上进行了验证, 结果表明所获得的标记在瓜蒌上扩增效果良好, 具有较强的多态性, 可以应用于瓜蒌遗传多样性和相关研究。

4.2 瓜蒌 SSR 遗传多样性

瓜蒌是异化授粉,雌雄异株植物,当前的育种方法多采用集团选择,选育而成的品种具有高度的杂合性,通过无性繁殖保持品种的一致性。但不同单株间还是存在一定的差异,本研究通过每个品种资源上随机选取 3 个单株进行混合取样,建立 DNA 样品池,确保所用基因组能够代表品种资源的群体基因型。

先前关于瓜蒌的遗传多样性研究不多,先后有 RAPD^[7]、ISSR^[8]、ITS^[9]和 SRAP^[10-11]分子标记对瓜蒌遗传多样性做了少部分工作,但这些标记大多为显性标记或者需要进行测序,其难以鉴定不同品种或资源的纯合度、并且稳定性相对 SSR 要差。本研究通过 RNA 测序,开发了 SSR 标记,选取 64 对标记对 13 个品种资源的瓜蒌进行遗传多样性分析,其整体多态性位点达到 92.19%,说明 SSR 标记能够用来区分不同瓜蒌品种及资源。3 个自然群之间合肥自然群和潜山自然群之间一致性很高,但这两个自然群体与其他野生型群体差异较大,这说明当前安徽所选育的瓜蒌品种其来源遗传基础还比较狭窄,而其他野生型与这两个自然群之间具有较高的遗传差异,可以通过引入其他来源的野生种质资源拓宽安徽瓜蒌种质资源遗传多样性,获得更大的杂种优势。

从品种资源的遗传聚类结果看,潜山地区来源的 5 个品种资源都聚集在 1 个亚群,并且合肥地区选育的皖蒌 9 号和 17 号也聚集在同 1 个亚群;而合肥育成的另外 2 个品种与福建和四川野生资源聚为另 1 个亚群,这表明合肥育成的品种其遗传基础来源于不同地方种质资源,而潜山育成的品种主要以当地资源为背景。但 11 个双边瓜蒌品种资源与 2 个长萼瓜蒌(TGX 和 TGD)之间存在较大的遗传差异,2 个种间存在一定的生殖障碍,因此遗传距离较大。当前瓜蒌的基因型与表型之间的关系研究还很少,利用基因分型能够为瓜蒌杂交育种时亲本选配提供指导,是加快瓜蒌育种的一条重要举措。进一步对其进行研究,构建作图群体,利用标记获得相关遗传图谱,进行相关性状的 QTL 定位和关联定位,获得紧密连锁的标记,通过分子标记辅助选择也是未来瓜蒌育种的重要方向^[21]。

4.3 瓜蒌种质资源保护和育种利用

当前对瓜蒌的种质资源的保护还不够,潜山被称为瓜蒌之乡,安徽省农业农村厅在当地设置了瓜

蒌种质资源圃,但其表型和遗传评价工作开展的不不够,今后有必要进一步加强其表型,特别是利用分子标记对其基因型分型和遗传多样性研究具有十分重要的意义。先前的育种实践表明,异交作物(如玉米)通过自交和近交,淘汰不利等位基因,获得优良的纯合自交或近交系,再进行杂交,是产量、抗性和品质提高的重要手段,从而获得良好增益^[22]。

然而,当前瓜蒌育种的水平和技术手段还处于集团选择,还没有进行系统的系谱选育。通过分子标记鉴定不同瓜蒌种质资源的亲缘关系,开展不同瓜蒌品种的近交系选育,可能是提高瓜蒌产量最重要的手段,SSR 标记作为共显性标记,能够加速近交纯合基因型的选育。本研究鉴定的不同类群瓜蒌种质资源能够为开展相关纯化体制创制奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张黄琴,刘培,董玲,等. 梧楼植物不同部位资源化利用策略与途径 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(1): 45-53.
- [2] 孙志,张媛媛,周胜楠,等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 和生物信息学探讨瓜蒌薤白汤治疗冠心病的潜在药效物质基础和作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5613-5624.
- [3] 刘鹏,马丽,章艺,等. 铝胁迫下根系分泌物对栝楼光合特性及耐铝性的影响 [J]. 水土保持学报, 2016, 30(4): 288-295.
- [4] 何家庆,何禾. 中国栝楼 [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 56.
- [5] 黄璐琦,乐崇熙,李懋学. 栝楼属 8 种植物的染色体数目 [J]. 云南植物研究, 1994, 16(1): 95-96.
- [6] 吴玉香,杨福红,赵晓明,等. 秋水仙碱诱导栝楼四倍体 [J]. 核农学报, 2009, 23(3): 418-422.
- [7] 孙稚颖,周凤琴. 山东产瓜蒌不同农家品种的 RAPD 研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 426-429.
- [8] 高燕会,李慧慧,朱玉球,等. 基于 ISSR 的栝楼遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 363-366.
- [9] 吕泽芳,于杰. 基于 ITS2 序列片段的药用植物栝楼及混淆品分子鉴定研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2017, 39(9): 1-6.
- [10] 曹亮,黄艳宁,谢进,等. 籽用栝楼遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4316-4322.
- [11] 何庆元,刘丽,孙武,等. 栝楼 SRAP 引物筛选及遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 6813-6818.
- [12] Holland J B, Helland S J, Sharopova N, et al. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat [J]. *Genome*, 2001, 44(6):

- 1065-1076.
- [13] 蒋路园, 吴文丽, 张恺恺, 等. 南方红豆杉转录组 SSR 位点分析及其分子标记开发 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 928-93.
- [14] 何庆元. 野生大豆染色体片段代换系群体 SojaCSSL 的改进及其在野生性状基因(QTL)/片段定位中的应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [15] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. Popgene version 1.31 quick user guide [M]. Canada: University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999: 1-27.
- [16] Liu K J, Muse S V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 2128-2129.
- [17] 何庆元, 向仕华, 杨华伟, 等. 川渝地区地方和育成大豆品种 SSR 标记多样性分析 [J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(3): 326-334.
- [18] 张红瑞, 李鑫, 陈振夏, 等. 基于 SSR 分子标记的裸花紫珠种质资源遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 3971-3982.
- [19] 余孟娟, 赵博宇, 董诚明, 等. 不同产区艾叶 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4306-4311.
- [20] 邓绍勇, 祝必琴, 李康琴, 等. 基于 EST-SSR 标记的栀子品种亲缘关系分析及指纹图谱构建 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2795-2802.
- [21] 陈和明, 蔡文杰, 吕复兵, 等. 兰科植物遗传图谱与 QTL 定位研究进展 [J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(6): 63-72.
- [22] 胡俏强, 谢本寿, 潘玖琴, 等. 浅述优良鲜食甜玉米自交系的选育及杂交种组配方法 [J]. 农业科技通讯, 2022, 10: 163-166.

[责任编辑 时圣明]