

凉粉草基因组 SSR 分子标记开发与种质遗传多样性分析

李静纯^{1,2}, 全昌乾¹, 徐梅华¹, 韦 范¹, 黄莎莎¹, 汤丹峰^{1,2*}

1. 广西壮族自治区药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023

2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

摘要: 目的 开发凉粉草 (*Platostoma palustre*) SSR 分子标记, 分析其种质资源的遗传多样性, 为凉粉草种质资源保护与优良品种选育提供理论支撑。方法 基于凉粉草全基因组序列, 挖掘并分析简单重复序列 (simple sequence repeats, SSRs) 的分布特征, 开发多态性 SSR 引物, 为凉粉草遗传多样性评价和群体结构解析提供理论依据。结果 凉粉草基因组中共鉴定出 122 699 个 SSR 位点, 基因组 SSR 密度为 96.91 个/Mb, 位点发生频率为 10.32 kb/SSR, 其中二核苷酸重复基序为优势类型, 占总重复基序的 68.3%。经过多态性筛选, 获得 15 对多态性较好的 SSR 引物, 其多态性信息指数 (polymorphism information content, PIC) 介于 0.197~0.736, 平均值为 0.425。对 40 份凉粉草种质的遗传多样性分析显示, 15 个 SSR 位点的等位基因数高于有效等位基因数, 等位基因分布呈不均匀分布特征; 各位点杂合度存在差异, 平均观测杂合度高于平均期望杂合度, 二者平均值存在一定差距, 表明供试群体偏离了哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE), 存在遗传变异, 整体遗传多样性较好, 且群体内部分基因型频率发生改变。固定指数 (F) 分析结果表明, 3 个位点的 $F > 0$, 12 个位点的 $F < 0$, 说明种群内杂合个体数量多于纯合个体。香农指数 (I) 的数值范围为 0.449 (TDF191)~1.628 (TDF166), 平均值为 0.887。基于 UPGMA 法, 利用 Phylip 软件构建 40 份凉粉草种质的系统发育树, 可将其划分为 2 个亚群; 通过数字赋值编码, 成功构建“0/1”型 DNA 指纹图谱。结论 获得的大量 SSR 位点信息, 可为凉粉草全基因组 SSR 标记开发、分子标记辅助育种以及遗传多样性研究提供重要的理论与技术支撑。

关键词: 凉粉草; SSR; 种质资源; 遗传多样性; 指纹图谱

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)06-2278-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.06.022

Identification and development of SSR molecular markers in the *Platostoma palustre* genome and analysis of germplasm genetic diversity

LI Jingchun^{1,2}, QUAN Changqian¹, XU Meihua¹, WEI Fan¹, HUANG Shasha¹, TANG Danfeng¹

1. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

2. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective This study aimed to develop SSR molecular markers for *Platostoma palustre* and analyze the genetic diversity of its germplasm resources, so as to provide theoretical support for the conservation of *P. palustre* germplasm resources and the breeding of elite varieties. **Methods** Based on the whole-genome sequence of *P. palustre*, the distribution characteristics of simple sequence repeats (SSRs) were mined and analyzed, and polymorphic SSR primers were developed to provide a theoretical basis for the evaluation of genetic diversity and analysis of population structure in *P. palustre*. **Results** A total of 122,699 SSR loci were identified in the *P. palustre* genome, with a genomic SSR density of 96.91 loci/Mb and a locus occurrence frequency of 10.32 kb/SSR. Dinucleotide repeat motifs were the dominant type, accounting for 68.3% of all repeat motifs. After polymorphism screening, 15 pairs of SSR primers with good polymorphism were obtained. Their polymorphism information content (PIC) ranged from 0.197 to 0.736, with an average value

收稿日期: 2025-11-03

基金项目: 广西重点研发计划 (桂科 AB24010015); 国家自然科学基金资助项目 (82460754); 国家自然科学基金资助项目 (82260750); 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室自主课题 (KL2025ZZ05)

作者简介: 李静纯 (2001—), 女, 广东普宁人, 硕士研究生, 主要从事中药质量评价与资源开发方面研究。E-mail: 2476598059@qq.com

*通信作者: 汤丹峰 (1986—), 男, 湖北孝感人, 研究员, 主要从事药用植物栽培学与分子生物学方面研究。

E-mail: tdfmanuscript@163.com

of 0.425. Genetic diversity analysis of 40 *P. palustre* germplasms showed that the number of alleles at the 15 SSR loci was higher than the number of effective alleles, and the alleles were unevenly distributed. There were differences in heterozygosity among different loci; the average observed heterozygosity was higher than the average expected heterozygosity with a certain gap between them, indicating that the tested population deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), with genetic variation and favorable overall genetic diversity, and the genotype frequencies of some loci in the population changed. Fixation index (F) analysis showed that $F > 0$ at 3 loci and $F < 0$ at 12 loci, indicating that the number of heterozygous individuals was higher than that of homozygous individuals in the population. The Shannon's information index (I) ranged from 0.449 (TDF191) to 1.628 (TDF166), with an average of 0.887. A phylogenetic tree of the 40 *P. palustre* germplasms was constructed using Phylip software based on the UPGMA method, which divided the germplasms into two subgroups. A "0/1" DNA fingerprint was successfully constructed by digital assignment coding.

Conclusion The abundant SSR loci information obtained in this study can provide important theoretical and technical support for the development of whole-genome SSR markers, molecular marker-assisted breeding, and genetic diversity research of *P. palustre*.

Key words: *Platostoma palustre* (Blume) A. J. Paton; SSR; germplasm resources; genetic diversity; DNA fingerprinting

凉粉草 *Platostoma palustre* (Blume) A. J. Paton 又被称为仙草,为唇形科逐风草属一年生草本植物,主要产于广西、广东、台湾、浙江、江西等地,是我国重要的药食两用植物之一^[1-3]。它含有丰富的多糖、黄酮、萜类、酚类、挥发性成分、有机酸等,具有抗氧化、降血糖、调血脂、降血压、抗病毒等生物活性^[4-6]。凉粉草种植和食用历史悠久,通常被用来制作成凉茶和凉粉,在国内以其为原料生产制作的相关产品(王老吉、加多宝、和其正凉茶以及龟苓膏等)非常受欢迎。近年来,凉粉草相关研究日益受到关注,逐渐成为热点研究植物之一。

凉粉草作为药食两用植物,在食品、医药及生态农业领域具有重要价值。但在实际生产种植中,因长期采用无性繁殖方式,且单一品种(系)连续多年复种,导致其遗传多样性逐渐降低、种质种植混乱、品质参差不齐^[7],严重制约了凉粉草产业的可持续发展。因此,开展凉粉草种质资源调查、收集与保存及其遗传多样性研究,具有重要的现实意义。

遗传多样性是生物多样性的核心组成部分之一,研究植物遗传多样性,可为植物资源的评价、选择、保存和利用提供理论依据^[8-9]。目前,关于凉粉草种质资源遗传多样性的研究报道相对较少。张桂芳等^[10]对 19 份凉粉草样品进行随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 指纹图谱构建与遗传相似性研究,证实种质间存在丰富的遗传多样性。陈菁瑛等^[11]采用随机扩增多态性 DNA (inter-simple sequence repeats, ISSR) 分子标记技术对 20 份不同种源的仙草进行遗传多样性及亲缘关系分析,结果表明种源间的遗传差异与地理

分布关系不密切,但与形态差异有一定联系。Zhang 等^[12]采用 RAPD 分子标记对来自于 19 个地区的凉粉草样品进行了聚类分析,结果显示,凉粉草种质间存在着丰富的遗传多样性,其地理分布与亲缘关系间有一定的相关性。李晓晖等^[13]研究表明,目标起始密码子多态性 (start codon targeted polymorphism, SCoT) 和 ISSR 两种分子标记均适用于凉粉草种质资源的遗传多样性研究,7 份凉粉草种质被分为 3 个类群。师玉华等^[14]对不同产地凉粉草的 26 条内部转录间隔区 2 (ITS2) 序列进行分析,结果表明该物种的种内遗传距离为 0。夏微^[15]采用特异位点扩增片段测序 (specific-locus amplified fragment sequencing, SLAF-seq) 技术,开发了凉粉草单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphisms, SNP) 分子标记,研究发现凉粉草在物种水平和居群水平上的遗传多样性都相对较低。兰秀等^[16]研究表明,25 份凉粉草种质材料的 Shannon-Wiener 多样性指数 (H') 变化范围为 1.219~2.111,表明其具有丰富的遗传多样性,种质可分为 3 个类群。本团队前期对 8 个凉粉草种质进行了形态学、细胞学以及表达序列标签-简单序列重复 (expressed sequence tag-simple sequence repeat, EST-SSR) 评价和鉴定^[17]。综上,研究者主要通过形态学观察及 ISSR、RAPD、SCoT、ITS2、SNP、EST-SSR 等分子标记技术,开展凉粉草遗传多样性研究。目前,基于凉粉草全基因组信息开发与筛选 SSR 分子标记,并进行凉粉草遗传多样性分析的研究还未见报道。

简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 分子标记技术因其多态性高、共显性遗传、重复性好等优势,已成为植物种质资源鉴定的核心技术工具。相较于从转录组或表达序列标签 (EST) 序列

开发 SSR, 全基因组 SSR 标记的基因组覆盖范围更广, 多态性更高, 可更科学、准确地反映物种的遗传多样性和群体遗传结构^[18]。基于 SSR 的 DNA 指纹图谱可唯一标识品种特性。例如, 吴仕蔓等^[19]在柚类研究中, 采用 4 对高多态性 SSR 引物 (如 CS5、CS7) 结合荧光毛细管电泳技术, 为 22 个柚类品种构建了分子身份证, 编码精度可达单碱基差异水平。

本研究基于本团队前期测序获得的凉粉草全基因组序列, 挖掘 SSR 位点并开展特征分析, 开发 SSR 分子标记; 同时利用筛选获得的多态性 SSR 引物, 结合前期研究的 EST-SSR 引物^[17], 对 40 份凉粉草种质资源开展遗传多样性分析。本研究通过解析凉粉草的遗传多样性水平与遗传背景, 有助于全

面解析凉粉草遗传多样性的特征及其生物学意义, 可为凉粉草种质资源的收集与保护、优良品种的选育与栽培提供重要的科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

本试验共选用 40 份凉粉草种质资源, 种质来源覆盖广西及区外多个区域, 编号依次为 PP1~PP40; 所有种质于 2024 年 6~10 月采集, 经定植繁育后种植于广西药用植物园, 经形态学鉴定, 确定为唇形科逐风草属凉粉草 *P. palustre* (Blume) A. J. Paton, 种质具体信息详见表 1。取样时, 每份种质随机选取 3 个单株, 采集每个单株顶端的幼嫩叶片, 随后立即用锡纸包裹, 置于冰盒低温暂存, 迅速带回实验室后转入 -80 °C 超低温冰箱冷冻保存, 备用。

表 1 试验所用凉粉草种质编号及来源

Table 1 Genetic resource codes and sources of *P. palustre* used in the experiment

编号	来源	编号	来源
PP1	广西浦北县	PP21	江西省
PP2	中国台湾省	PP22	广东省茂名市信宜市
PP3	广东省广州市增城区	PP23	广东省阳江市
PP4	广西壮族自治区钦州市浦北县	PP24	广东省茂名市高州市
PP5	广西壮族自治区玉林市博白县	PP25	福建省
PP6	广西壮族自治区钦州市浦北县	PP26	广东省茂名市信宜市
PP7	广西壮族自治区玉林市博白县	PP27	广东省茂名市化州市
PP8	广西壮族自治区玉林市博白县	PP28	广东省茂名市信宜市
PP9	广西壮族自治区玉林市博白县	PP29	广东省茂名市信宜市
PP10	广西壮族自治区玉林市博白县	PP30	广西壮族自治区贵港市桂平县
PP11	广西壮族自治区钦州市灵山县	PP31	江西省吉安市
PP12	广西壮族自治区钦州市浦北县	PP32	广东省云浮市
PP13	广西壮族自治区贺州市钟山县	PP33	江西省赣州市
PP14	广东省梅州市	PP34	江西省赣州市
PP15	广西壮族自治区玉林市博白县	PP35	福建省漳州市
PP16	广西壮族自治区玉林市北流市	PP36	江西省吉安市
PP17	广西壮族自治区玉林市博白县	PP37	江西省吉安市
PP18	广西壮族自治区玉林市北流市	PP38	广东省
PP19	广西壮族自治区桂林市阳朔县	PP39	中国台湾省
PP20	江西省赣州市会昌县	PP40	越南

1.2 试剂及仪器

基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 2×Taq PCR Master Mix 购自基因科技 (武汉) 有限公司; 主要仪器包括 CR4i 台式离心机、Nano Drop ONE 超微量紫外分光核酸测定仪、ABI 3730xl DNA 测序仪、Veriti 384well PCR 仪、DYY-6C 电泳仪、GelDocTMXR⁺型紫外分析仪。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

实验利用基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取 40 份凉粉草种质资源

叶片总 DNA。利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 采用 NanoDrop ONE 超微量紫外分光核酸测定仪测定 DNA 质量和浓度, 以 A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0 作参照, 不符合标准的样本重新提取, 并将最终获得的样品 DNA 稀释至 50 ng/μL, 于 -20 °C 冰箱中保存备用。

2.2 SSR 引物筛选与合成

根据本团队前期的凉粉草基因组测序结果, 通 MISA 在线软件 (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 分析凉粉草基因组信息, 得到 SSR 位点; 然后利用筛选得到的 15 对多态性良好的 SSR 引物, 对 40 个

凉粉草样品进行检测并分型。

2.3 PCR 扩增及毛细管电泳

2.3.1 PCR 扩增与荧光 PCR 扩增体系 本研究将 M13 通用接头序列 (TGTAACGACGGCCAGT) 加至每对引物正向引物 (F 引物) 的 5' 端, 选用 FAM、HEX、TAMRA 三种荧光标记, 完成携带不同荧光基团的 M13 接头引物合成。采用 PCR 仪进行基因组 DNA 扩增, 扩增产物后续通过 ABI 3730xl DNA 测序仪进行荧光毛细管电泳检测, 利用 GeneMarkerv2.2.0 软件对实验原始数据进行条带分型, 获得每个样品的等位基因数、峰图和基因型。

普通 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 62~52 °C 梯度退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 运行 10 个循环; 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 运行 25 个循环; 72 °C 延伸 20 min, 最后 4 °C 保存。

荧光 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 62~52 °C 梯度退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 运行 10 个循环, 每个循环下降 1 °C; 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 运行 25 个循环; 72 °C 延伸 20 min, 最终得到的 PCR 产物放置在 4 °C 冰箱保存。

SSR-PCR 扩增采用 10 μ L 反应体系: 5 μ L 2 \times Taq PCR Master Mix (Genetech), 1 μ L Mix primer, 1 μ L DNA Template (50~200 ng), 3 μ L ddH₂O 补足 10 μ L PCR 反应体系。

2.3.2 扩增产物鉴定 通过琼脂糖凝胶电泳对荧光 PCR 产物鉴定, 利用电泳结果检测 PCR 条带。由于琼脂糖凝胶电泳检测分辨率较低, SSR 扩增片段均较小, 该步骤默认为抽检。选择条带单一、无杂带且片段大小与预期相符的产物, 参照 DNA Marker 比对片段大小并完成浓度校准, 将所有产物稀释至相同的浓度范围后, 上机进行荧光毛细管电泳检测。

2.4 数据读取与处理

从 ABI 3730xl 仪器上导出 .fsa 格式原始数据, 按检测位点完成分类归档后, 导入到 GeneMarker 分析软件, 完成基因型数据读取, 并按位点名称分别导出 Excel 格式基因型原始数据和 PDF 格式分型峰图文件。

遗传多样性参数分析在 GenAlEx6.5 软件中完成, 计算指标包括等位基因数 (number of

alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、香农信息指数 (shannon-wiener diversity index, I)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、平均期望杂合度 (average expected heterozygosity, uH_e)、固定指数 (fixation index, F), 同时计算 F 统计量 (F-Statistics), 用于后续群体遗传分析。

聚类分析采用 Phylip 软件, 基于 UPGMA 法构建凉粉草种质系统发育树; 运用 Structure 2.3.4 软件完成群体遗传结构分析。

3 结果与分析

3.1 全基因组 SSR 位点发掘

本研究在凉粉草基因组中一共检测到 78 条序列, 包含 15 条染色体序列和 63 条 scaffold 序列。在这 78 条序列中一共检测到 122 699 个 SSR 位点。基因组 SSR 密度为 96.91 个/Mb, SSR 位点发生频率为 10.32 kb/SSR (表 2)。

从 SSR 类型来看, 在凉粉草基因组中共鉴定出 6 种类型的 SSR, 包括单核苷酸 (P1)、二核苷酸 (P2)、三核苷酸 (P3)、四核苷酸 (P4)、五核苷酸 (P5) 和六核苷酸 (P6)。它们的数量分别为 10 005、83 472、25 762、1 837、1 132 和 491。其中, 以二核苷酸 SSR 为主, 占总 SSR 数量的 68.03%, 其次是三核苷酸 SSR, 占比 21.00%, 六核苷酸 SSR 占比最小, 为 0.40% (图 1)。从 SSR 分布频率来看, AT/AT 类型是最多的重复基元, 共 23 267 个, 其次是 AG/CT 和 TA, 分别有 21 300 和 9 796 个, 其余重复基元类型均在 9 000 个以内 (图 2)。从 SSR 在染色体上的分布来看, 在第 1~15 条染色体上分别分布 6 174、6 921、5 492、7 875、7 939、7 062、9 627、7 400、10 546、6 154、7 610、5 091、5 764、8 265、6 550 个 SSR (图 3)。6 种 SSR 类型 (P1~P6) 在所有染色体上分布数量顺序为 P2>P3>P1>P4>P5>P6, 整体上 P2 类型的 SSR 数量最多, 其次是 P3 和 P1, P6 类型最少 (图 4)。

3.2 凉粉草 SSR 引物的筛选

根据本团队前期测序获得的凉粉草基因组序列信息, 利用 MISA 在线软件对凉粉草基因组进行分析, 得到 SSR 位点, 并通过 Primer Premier 5.0 软件设计 96 对 SSR 引物。按照 PIC 大小及琼脂糖凝胶电泳检测条带, 对引物质量进行评价, 推荐 6 对引物用于群体分型, 同时结合团队前期

开发的 9 对 EST-SSR 引物^[17]，一共 15 对引物用于群体分型（表 3）。

表 2 凉粉草基因组中 SSR 位点特性

Table 2 SSR site characteristics in the *P. palustre* genome

SSR搜索	基因组数值
检测的序列总数	78
检测序列的总长度（碱基对）	1 266 130 770
鉴定出的SSR总数	122 699
包含SSR的序列数量	78
包含至少1个SSR的序列数量	78
复合型SSR的数量	12 962
SSR的密度	96.91
SSR的频率	10.32

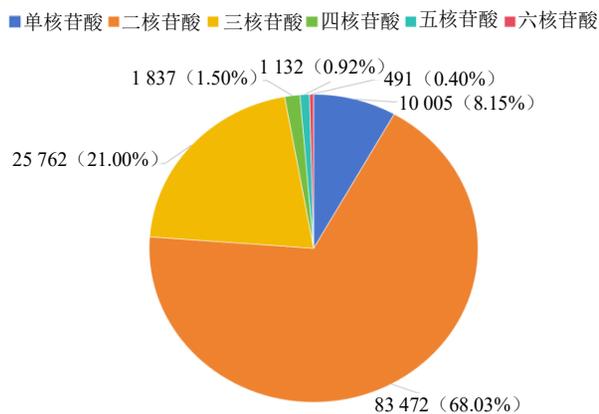


图 1 凉粉草基因组不同重复类型的 SSR 数量

Fig. 1 Statistical analysis of SSRs across different repeat types in the *P. palustre* genome

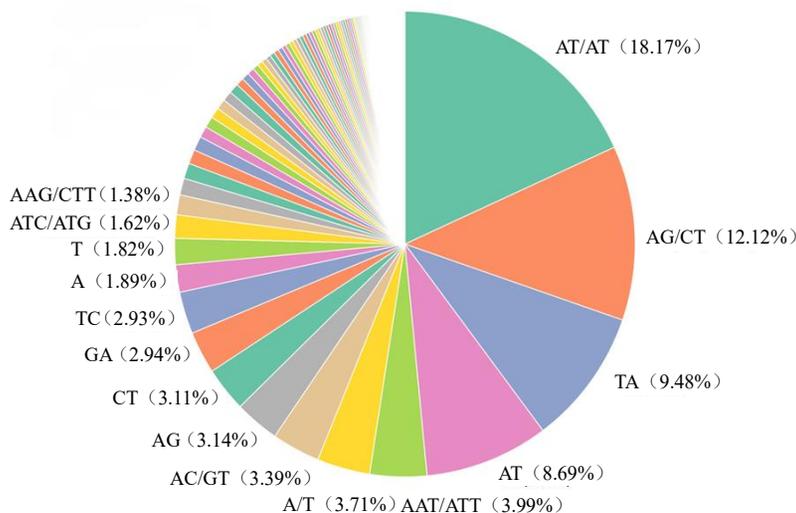


图 2 凉粉草基因组 SSR 重复基元类型及占比情况

Fig. 2 SSR repeat element types and proportions in the *P. palustre* genome

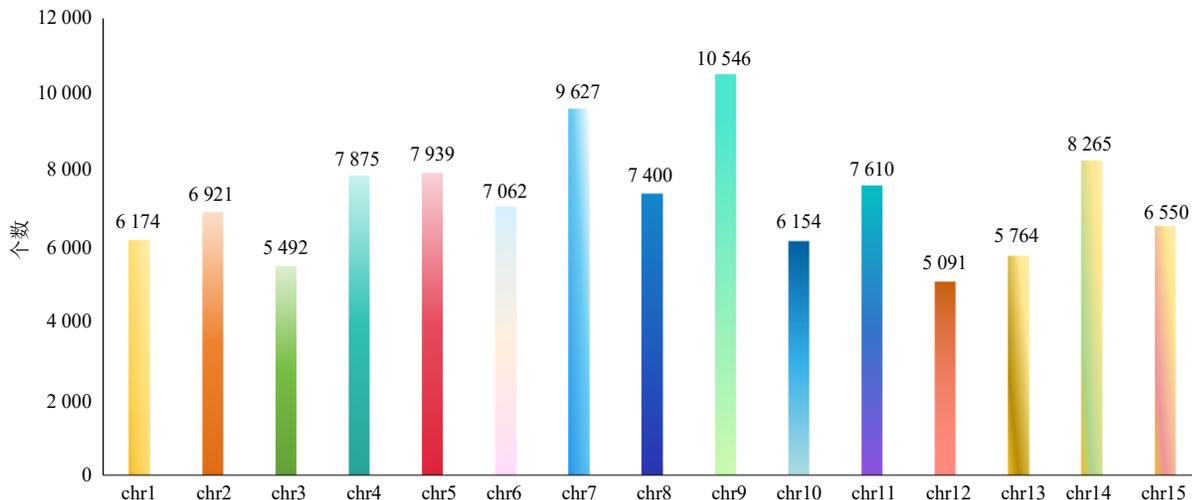


图 3 不同基因组染色体上 SSR 的分布统计情况

Fig. 3 Statistical distribution of SSRs across different genomic chromosomes

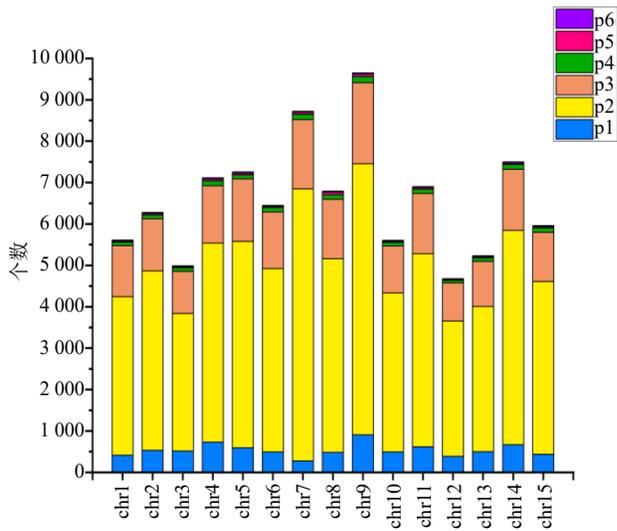


图4 不同类型SSR在不同基因组染色体上的分布情况

Fig. 4 Distribution of different types of SSRs across different genomic chromosomes

3.3 凉粉草基因组SSR位点的遗传多样性参数

经过 GenAEx version 6.501 等软件计算分析, 得到所有供试的凉粉草种质在 15 个 SSR 位点和群体的各项遗传多样性指标, 包括 N_a 、 N_e 、 I 、PIC、 H_o 、 H_e 。

40 份凉粉草种质在这 15 个位点中的扩增结果如表 4 所示。其中 N_a 共检测出 65 个, 变化范围为 3~7 个, 平均每个位点的等位基因数目为 4.333 个; N_e 总数为 31.601, 数值变化范围为 1.261 (TDF191)~4.347 (TDF166), 平均每个位点 N_e 为 2.107。 N_e 值越接近 N_a 的绝对值, 表明 N_a 在群体中分布越均匀^[20]。由表中数据可以发现, N_a 高于 N_e , 其中获得最多等位基因的位点是 TDF048 和 TDF166, 实验数据表明凉粉草基因组中 SSR 位点的等位基因分布不均匀。 I 的数值范围为 0.449 (TDF191)~1.628 (TDF166), 平均值 0.887。

表3 引物信息

Table 3 Primer information table

编号	引物名称	荧光标记	引物序列 (5'-3')
SA3909	SA3909_LFCG011_F	FAM	GTCACAACAAACCCACACGG
SA3910	SA3910_LRCG011_R		AGCGACTCAGGGTCTGATCT
SA3911	SA3911_LFCG030_F	FAM	CTCTCGCGAAAATGACCAG
SA3912	SA3912_LRCG030_R		ATGCTCACCCCAAACCAAA
SA3913	SA3913_LFCG049_F	FAM	TTCTGGCATCAAGGCTCTGG
SA3914	SA3914_LRCG049_R		AGATCGTAGCCTGTCATGCC
SA3915	SA3915_LFCG072_F	FAM	TTCGTTGGGTGAGATCTGCC
SA3916	SA3916_LRCG072_R		TCAGAGACCAGCAACACCAC
SA3917	SA3917_LFCG081_F	FAM	TCGATCTCAGATGGTCCCGA
SA3918	SA3918_LRCG081_R		AACAATTGCTGCTGCTGCTC
SA3919	SA3919_LFCG089_F	FAM	GTGCCTTAGAGTCGTCCCTG
SA3920	SA3920_LRCG089_R		ATCGATCGTGTGCACAATGG
SA3921	SA3921_TDF016_F	FAM	GACCAACCAATCATGTTCCC
SA3922	SA3922_TDR016_R		AAGAAGGTGTGGTTGTTGGC
SA3923	SA3923_TDF032_F	FAM	TTAGATGTTCCCTCGAACCCG
SA3924	SA3924_TDR032_R		GCATCCCGACGTGATAGACT
SA3925	SA3925_TDF048_F	FAM	GGAGCAATTCGCTTCAGTTC
SA3926	SA3926_TDR048_R		CATGTAGCCGATCCCAATTT
SA3927	SA3927_TDF050_F	FAM	AACTGAATCCCAATTGCAGC
SA3928	SA3928_TDR050_R		TGGGAAGCTGTCAACACTCA
SA3929	SA3929_TDF109_F	FAM	GGACTGAACTGGGAGTGGA
SA3930	SA3930_TDR109_R		GATCCAGCTTCATGGGAAGA
SA3931	SA3931_TDF139_F	FAM	TCCTCCGCTTTGTTTATTCT
SA3932	SA3932_TDR139_R		AGGTTGCGTACATCTGACCC
SA3933	SA3933_TDF166_F	FAM	CCCTCAATTCATCCCTCTCA
SA3934	SA3934_TDR166_R		ATTGATGAAGAGACTGCGGG
SA3935	SA3935_TDF172_F	FAM	AGCATCCTGCGACTCCTAAA
SA3936	SA3936_TDR172_R		CCGGAAATACGAATGCCTAA
SA3937	SA3937_TDF191_F	FAM	GTGGAAAGGGTGGAGGATTT
SA3938	SA3938_TDR191_R		TCCTCCTCCAGCACCCTAC

表4 凉粉草 15 个 SSR 位点遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters for 15 SSR loci of *P. palustre*

位点	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F	PIC	P 值
LFCG011	3	1.892	0.789	0.650	0.471	-0.379	0.404	0.026
LFCG030	4	1.802	0.810	0.486	0.445	-0.092	0.398	0.302
LFCG049	4	1.856	0.794	0.632	0.461	-0.369	0.395	0.231
LFCG072	3	1.754	0.695	0.590	0.430	-0.372	0.357	0.078
LFCG081	4	1.913	0.897	0.611	0.477	-0.280	0.437	0.324
LFCG089	5	1.541	0.753	0.324	0.351	0.076	0.333	0.239
TDF016	4	1.399	0.585	0.325	0.285	-0.140	0.267	0.959
TDF032	4	2.397	1.041	0.714	0.583	-0.225	0.515	0.039
TDF048	7	3.761	1.539	0.500	0.734	0.319	0.697	0.000
TDF050	4	2.025	0.880	0.625	0.506	-0.235	0.437	0.798
TDF109	3	1.682	0.732	0.500	0.405	-0.233	0.369	0.238
TDF139	3	1.558	0.643	0.282	0.358	0.212	0.321	0.000
TDF166	7	4.347	1.628	0.828	0.770	-0.075	0.736	0.055
TDF172	6	2.413	1.075	0.765	0.586	-0.306	0.506	0.847
TDF191	4	1.261	0.449	0.225	0.207	-0.088	0.197	0.996
平均值	4.333	2.107	0.887	0.537	0.471	-0.146	0.425	0.342
STDEV	1.345	0.859	0.325	0.182	0.152	0.211	0.144	0.367

杂合度是评估种群遗传多样性的重要指标之一，因为它根据每个等位基因的基因频率计算，不容易受样本量影响，从而更能准确反映种群的遗传多样性水平^[21]。在 15 个位点中， H_o 的变化范围为 0.225 (TDF191)~0.828 (TDF166)，平均值 0.537， H_e 的变化范围为 0.207 (TDF191)~0.77 (TDF166)，平均值 0.471。本研究中，不同位点的杂合度存在差异，在 15 个位点中，所有位点的平均 H_o 高于 H_e ，两者的平均值存在一定差距，说明群体偏离了哈迪-温伯格平衡 (HWE)，存在遗传变异，遗传多样性较好，群体内的基因型频率有部分发生改变。

根据 F 的定义，当种群中纯合体过量时， $F > 0$ ；反之，当杂合体过量时， $F < 0$ ^[22]。本研究中有 3 个位点的 F 大于 0，12 个位点的 F 小于 0，说明该种群中杂合体数目高于纯合体数目。

PIC < 0.25 时，为低度多态性；0.25 < PIC < 0.5 时，为中度多态性；PIC > 0.5 时，为高度多态性。在本研究的 15 个位点中，PIC 范围为 0.197~0.736，平均值是 0.425。其中，中度多态性的位点有 10 个，低度多态性的位点有 1 个，高度多态性的位点有 4 个。这些结果表明，本研究所选微卫星标记多态性分布较为丰富，能够对接下来的遗传多样性进行有效分析。

3.4 凉粉草种质资源群体遗传结构分析

基于 UPGMA 法，利用 Phylip 软件对本研究所有凉粉草种质构建系统发育树，结果如图 5 所示，40 份种质可分成 2 个亚群。此外，利用 15 个分子标记对 40 个样本的群体结构进行评估，根据似然值最大原则，判断最佳 K 值等于 2，即 40 个样本可划分为 2 个亚群 (图 6-A)，该结果与 UPGMA 聚类结果一致。如图 (图 6-B) 所示，所有供试种质有 2 个潜在的基因库，Structure 分析结果显示，来自福建省漳州市的种质 PP35 基因渗入程度最高，种质间基因交流最为频繁，而其余大部分凉粉草种质的基因交流程度较低，说明凉粉草种质间的基因交流只发生在少数个体中。

3.5 凉粉草种质资源指纹图谱分析

为建立凉粉草种质特异性 DNA 指纹图谱，本研究选用筛选得到的 15 对多态性引物，对供试 40 份种质进行扩增分型与聚类分析，各引物扩增对应的基因型对应编码信息见表 5。根据其扩增的基因型，利用 DATAtans 1.0 软件将各样本基因型数据转换为“0/1”矩阵 (在当前基因型有条带的记为“1”，对应色块填充黑色；无条带的基因型记为“0”，对应色块无填充颜色)，最终完成凉粉草种质 DNA 指纹图谱的构建 (图 7)。

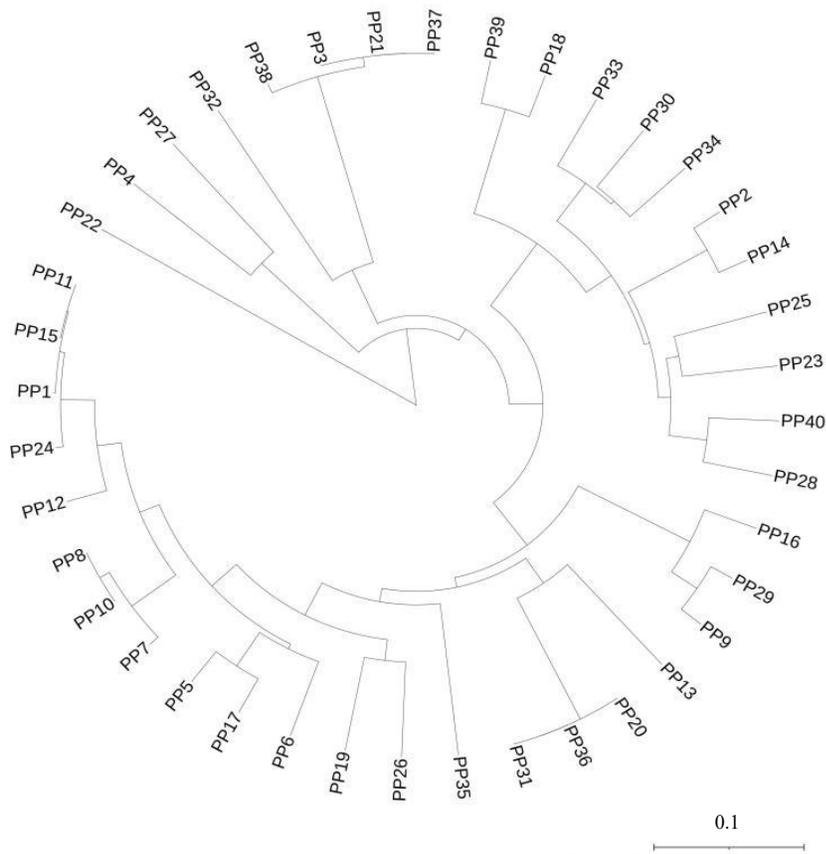
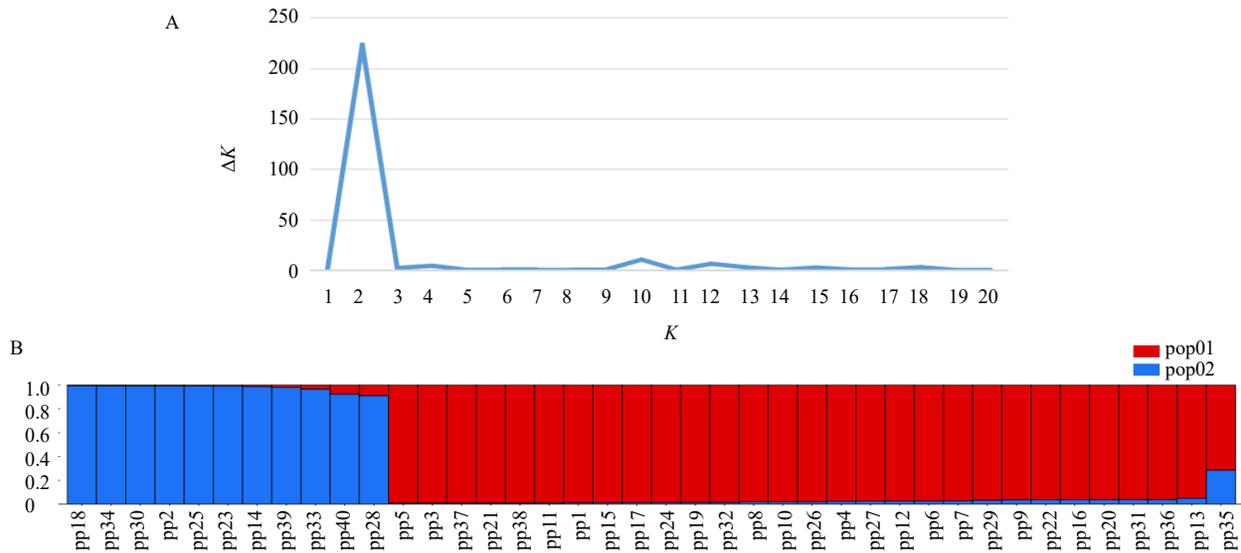


图5 40个凉粉草种质资源的UPGMA聚类结果

Fig. 5 UPGMA clustering results for 40 samples of *P. palustre*



A-Structure 分析的 ΔK 方法绘制的 K 值变动图; B- $K=2$ 时, 40 个凉粉草种质资源的 Structure 结果。不同的颜色表示不同的基因库。
A- K -value variation plot generated by the ΔK method in Structure analysis; B-Structure results for 40 samples of *P. palustre* when $K=2$. Different colors denote distinct gene pools. The horizontal axis labels indicate the germplasm accession numbers of *P. palustre* lobata, while the vertical axis represents the proportion of a given germplasm within a specific population.

图6 40个凉粉草种质资源的 Structure 分析

Fig. 6 Structure analysis of *P. palustre*

表 5 凉粉草种质标记扩增基因型与编码

Table 5 Genetic marker genotyping and encoding of *P. palustre*

序号	引物	各编码对应的基因型						
		1	2	3	4	5	6	7
1	LFCG011	147	151	154				
2	LFCG030	239	242	245	248			
3	LFCG049	213	218	221	232			
4	LFCG072	218	227	230				
5	LFCG081	199	201	208	214			
6	LFCG089	275	278	280	283	286		
7	TDF016	140	141	168	173			
8	TDF032	238	239	242	245			
9	TDF048	180	187	190	192	195	201	204
10	TDF050	120	127	129	132			
11	TDF109	317	332	335				
12	TDF139	185	191	198				
13	TDF166	182	189	195	201	207	213	220
14	TDF172	246	248	251	254	257	262	
15	TDF191	199	206	209	212			

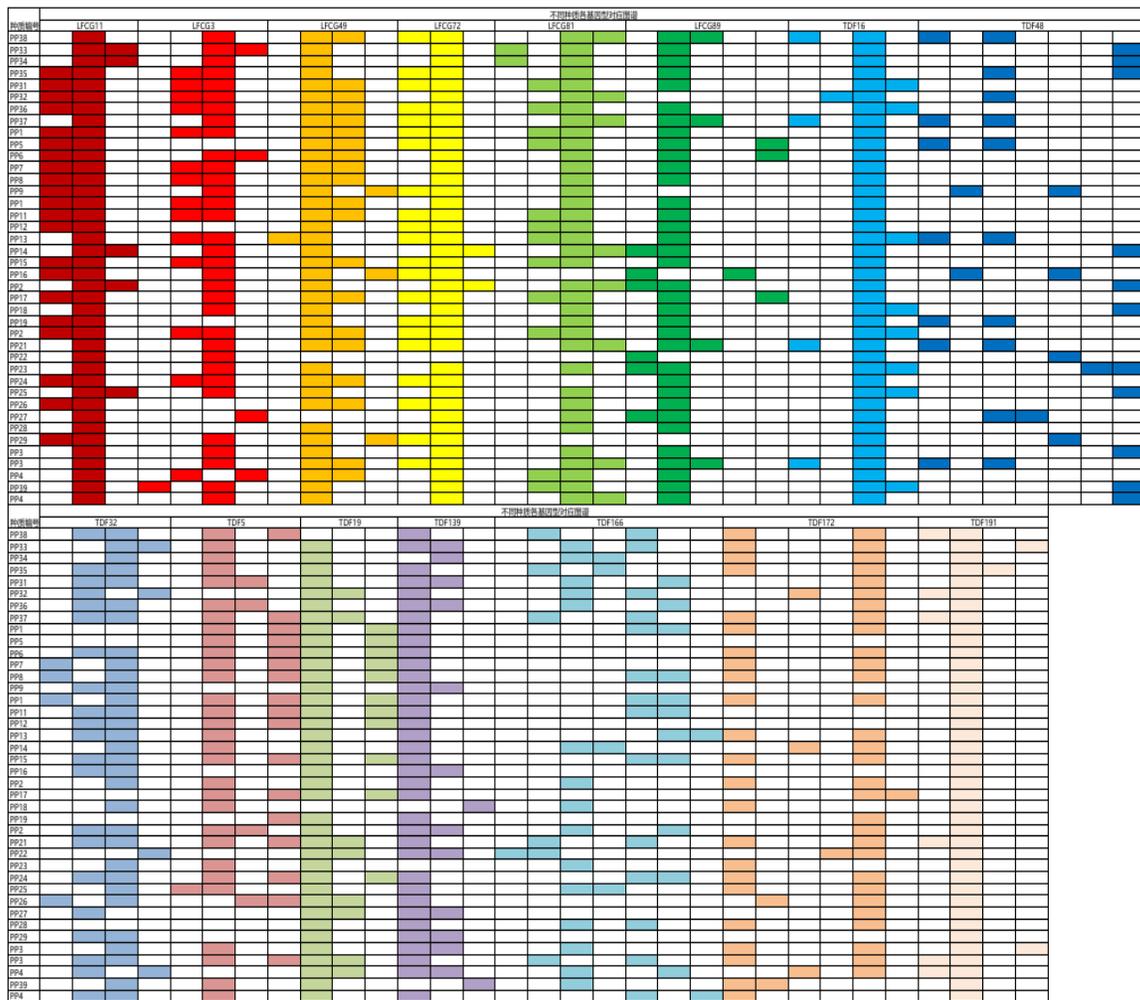


图 7 40 个凉粉草种质资源的 SSR 指纹图谱

Fig. 7 SSR fingerprint profiles of 40 *P. palustre*

4 讨论

SSR 分子标记技术通过高精度、高效率的遗传信息解析,为植物种质资源鉴定与育种提供了重要支撑。本研究基于凉粉草全基因组信息,挖掘并分析其 SSRs 的分布特征,开发多态性 SSR 引物,进行凉粉草遗传多样性评价和群体结构分析。

本研究在凉粉草全基因组范围内共鉴定出 122 699 个 SSR 位点,涵盖 6 种重复基元类型,其中二核苷酸重复基元占比达 68.30%。凉粉草作为传统药食两用植物,其基因组内高密度分布的 SSR 位点,为后续种质精准鉴定、功能基因定位及遗传图谱构建提供了丰富的标记资源。目前,基于 SSR 标记的遗传图谱构建已在百合^[23]、云南苦荞^[24]、苹果^[25]等植物中成功应用。二核苷酸 SSR 的高丰度可能与其较低的突变阈值和较高的基因组插入概率有关^[26]。本研究发现的 SSR 位点中,二核苷酸重复的高占比提示凉粉草基因组可能具有较高的遗传变异潜力,这可能与其广泛的地理分布和适应不同生境的能力相吻合。未来研究可结合转录组数据,筛选位于基因编码区或调控区的 SSR 位点,深入解析其与药用活性物质合成的关联机制。

本研究基于团队前期完成的凉粉草基因组测序数据,成功设计并筛选出 15 对 SSR 引物,并在 40 个种质样本中验证其多态性。结果显示,所选引物的 PIC 均值为 0.425,表明所选 SSR 位点具有中等偏上的多态性水平。根据 Botstein 等^[22]的分类标准, PIC 值介于 0.25~0.5 的标记属于中度多态性,可用于群体遗传结构和种质资源的初步分析。这一结果与凉粉草作为广泛分布物种的遗传多样性特征相吻合,但相较于其他药用植物,如黄缨菊^[27],其多态性略低。可能的原因包括:引物设计时筛选的 SSR 位点本身变异度有限,或优先选择了基因组中相对保守的区域;样本群体可能来源于遗传背景相近的栽培种或特定地理种群,导致遗传多样性被低估。

值得注意的是,SSR 标记的多态性与其在基因组中的位置密切相关。例如,位于基因编码区或调控区域的 SSR 可能因功能约束而呈现较低的变异率,而中性区域的 SSR 则更易积累突变^[28]。本研究未对 SSR 的基因组定位进行功能注释,后续可通过整合转录组数据进一步筛选与代谢通路相关的多态性标记,以提升其在性状关联分析中的价值。此外,40 个样本的规模虽能满足初步验证需求,但若

要全面评估凉粉草种群的遗传多样性,仍需扩大样本量并覆盖更广泛的地理分布区域。引物多态性的稳定性也需在不同实验条件下重复验证,以排除 PCR 扩增效率或电泳检测偏差的干扰。

本研究中 40 个凉粉草种质采集于广东、广西、江西等地,利用 UPGMA 法构建进化树,可将 40 份凉粉草样本分为 2 个亚群,其中来自广东省茂名市信宜市的种质 PP22 在分群时单一样品分为一类,说明该种质的遗传进化距离与其他 39 个种质距离较远;40 个凉粉草种质的遗传距离与地理距离的相关性并不绝对,如来自广西壮族自治区玉林市博白市的种质 PP9 与来自广东省茂名市信宜市的种质 PP29 遗传距离相近,而与其他同样来自广西壮族自治区玉林市博白市的种质 PP5、PP7、PP8、PP10、PP15、PP17 遗传距离较远,这与杨路存等^[29]对濒危植物宽叶羌活的研究结果一致,其居群间的遗传距离与地理距离之间无显著相关性,造成这一现象的原因可能与遗传漂流、人类引种有关。

综上所述,本研究从凉粉草基因组中分析得到了丰富的 SSR 位点信息并得到 15 对特异性高、多态性好的引物,利用 15 对引物对 40 个种质的凉粉草进行了种质遗传多样性分析,为评价凉粉草遗传多样性和群体结构提供理论依据。未来研究也可结合高通量测序技术,开发 SSR 与单核苷酸多态性的复合标记系统,从而弥补 SSR 在分辨率上的局限性。同时,通过比较不同 SSR 筛选工具(如 MISA、TRF 等)的结果差异,优化引物设计流程,进一步提高标记利用率,这些工作将推动凉粉草分子育种体系的完善,为其后续优良种质选育提供理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tang D F, Quan C Q, Huang S H, *et al.* Integrating LC-MS and HS-GC-MS for the metabolite characterization of the Chinese medicinal plant *Platostoma palustre* under different processing methods [J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1181942.
- [2] Huang S H, Chen Z N, Chen H, *et al.* Widely targeted metabolomics reveals the phytoconstituent changes in *Platostoma palustre* leaves and stems at different growth stages [J]. *Front Plant Sci*, 2024, 15: 1378881.
- [3] Li X F, Wei F, Quan C Q, *et al.* Identification of key modules and genes in response to high-temperature stress in *Platostoma palustre* based on WGCNA [J]. *BMC Plant Biol*, 2025, 25(1): 695.

- [4] 林丽华, 黄莉鑫, 谢建华. 凉粉草功能活性成分及其生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(20): 356-359.
- [5] 汤丹峰, 韦范, 谢锦祥, 等. 广西仙草保育关键技术与问题分析 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(3): 407-411.
- [6] 李博, 谢欢, 钟国跃, 等. 仙草质量控制的研究进展 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(5): 755-758.
- [7] Zhong L A, Zou X, Wu S Q, *et al.* Volatilome and flavor analyses based on e-nose combined with HS-GC-MS provide new insights into ploidy germplasm diversity in *Platostoma palustre* [J]. *Food Res Int*, 2024, 183: 114180.
- [8] Reed D H, Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity [J]. *Conserv Biol*, 2003, 17(1): 230-237.
- [9] Cruse-Sanders J M, Hamrick J L. Genetic diversity in harvested and protected populations of wild American ginseng, *Panax quinquefolius* L. (Araliaceae) [J]. *Am J Bot*, 2004, 91(4): 540-548.
- [10] 张桂芳, 关杰敏, 林吉, 等. 凉粉草 RAPD 指纹图谱的构建及遗传相似性研究 [A] // 2010 年中国药学会暨第十届中国药师周论文集 [C]. 北京: 中国药学会, 2010: 2046-2052.
- [11] 陈菁瑛, 刘萍, 黄颖桢, 等. 不同仙草种源间遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(5): 46-50.
- [12] Zhang G F, Guan J M, Lai X P, *et al.* RAPD fingerprint construction and genetic similarity of *Mesona chinensis* (Lamiaceae) in China [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(4): 3649-3657.
- [13] 李晓晖, 黎颖菁, 黄荣韶, 等. 凉粉草遗传多样性的 SCoT 和 ISSR 分析 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(5): 1834-1840.
- [14] 师玉华, 马定乾, 张景景, 等. 凉茶药材凉粉草与混伪品的 ITS2 条形码鉴定 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(15): 1282-1285.
- [15] 夏微. 基于 SLAF-seq 技术的凉粉草居群遗传多样性分析 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [16] 兰秀, 阮丽霞, 马仙花, 等. 基于主要农艺性状的 25 份凉粉草种质资源遗传多样性分析与综合评价 [J]. 山东农业科学, 2023, 55(11): 57-64.
- [17] Huang S H, Wei X M, Quan C Q, *et al.* Genetic diversity evaluation and germplasm identification of *Mesona chinensis* Benth from plant morphology, cytology, and EST-SSR molecular markers [J]. *Acta Physiol Plant*, 2024, 46(11): 98.
- [18] Parthiban S, Govindaraj P, Senthilkumar S. Comparison of relative efficiency of genomic SSR and EST-SSR markers in estimating genetic diversity in sugarcane [J]. *3 Biotech*, 2018, 8(3): 144.
- [19] 吴仕蔓, 娄兵海, 陈传武, 等. 应用 SSR 荧光标记法构建 22 个柚类品种的分子身份证 [J]. 果树学报, 2023, 40(4): 605-614.
- [20] Luo L T. Correlation analysis of microsatellite DNA markers with some substantial economic traits in high quality fine wool strain of Gansu alpine fine-wool sheep [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. 2009.
- [21] Qin Y, Sun D Q, Xu T J, *et al.* Genetic diversity and population genetic structure of the miiuy croaker, *Miichthys miiuy*, in the East China Sea by microsatellite markers [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(4): 10600-10606.
- [22] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-331.
- [23] 申屠圆玥, 吴昀, 周泓, 等. SSR 分子标记在百合中的研究现状与展望 [J]. 分子植物育种, 1-8 [2025-05-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20241101.1338.004.html>.
- [24] 李春花, 陈蕤坤, 王艳青, 等. 利用 SSR 标记构建云南苦荞种质资源分子身份证 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(5): 1575-1582.
- [25] 刘更森. 苹果 SSR 和 SNP 标记开发及在遗传图谱构建和品种鉴定中的应用 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.
- [26] Kalia R K, Rai M K, Kalia S, *et al.* Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants [J]. *Euphytica*, 2011, 177(3): 309-334.
- [27] 郑长远. 黄纓菊 SSR 分子标记开发及遗传多样性研究 [D]. 西宁: 青海师范大学, 2023.
- [28] Kalia R K, Rai M K, Kalia S, *et al.* Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants [J]. *Euphytica*, 2011, 177(3): 309-334.
- [29] 杨路存, 周国英, 聂学敏. 濒危植物宽叶羌活天然居群 cpDNA 非编码区多态性分析 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(8): 1535-1543.

[责任编辑 时圣明]