

# 千里香杂合度PCR-RFLP快速评估方法的建立

王博铖<sup>1,2</sup>, 陈梓媛<sup>2</sup>, 华中一<sup>2</sup>, 田慧<sup>1</sup>, 谢文波<sup>3</sup>, 袁媛<sup>2\*</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200;

2. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700;

3. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518029)

**[摘要]** 目的:建立一种快速评估千里香种质材料杂合度的方法,为制定千里香的优异种质繁育策略和促进种质创新提供依据。方法:以65株千里香重测序数据为基础,检测并筛选单核苷酸多态性(SNPs),利用其中20个SNP位点,通过自编脚本将其转化为限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)标记;采用聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性(PCR-RFLP)法对12份千里香种质的20个RFLP标记进行检测,根据RFLP标记位点酶切片段数目计算千里香种质的杂合度;采用pLink软件计算12份千里香种质的全基因组杂合度,并比较不同种质杂合度评估方法得到的结果。结果:PCR-RFLP法和基因组重测序法计算的杂合度间差异无统计学意义。利用PCR-RFLP法筛选获得了8份杂合度<30%的种质材料,利用基因组重测序法筛选获得9份杂合度<30%的种质材料,2种方法计算杂合度均<30%的种质材料共7份。结论:该文建立了千里香种质杂合度评估的PCR-RFLP法,其精确度为87.5%,准确率为77.8%,该法可为其他药用植物种质杂合度评估方法研究提供借鉴。

**[关键词]** 千里香; 聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性(PCR-RFLP); 单核苷酸多态性(SNPs); 杂合度; 全基因组重测序

**[中图分类号]** R284.2;R285;R289;R287;R22;R2-031;R33;R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2024)04-0029-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20231512

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20231103.0954.002>

**[网络出版日期]** 2023-11-03 14:16:56

## A Rapid PCR-RFLP Method for Assessing Heterozygosity of *Murraya paniculata* Germplasm

WANG Bocheng<sup>1,2</sup>, CHEN Ziyuan<sup>2</sup>, HUA Zhongyi<sup>2</sup>, TIAN Hui<sup>1</sup>, XIE Wenbo<sup>3</sup>, YUAN Yuan<sup>2\*</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a rapid method for evaluating the heterozygosity of *Murraya paniculata* germplasm materials and provide as a foundation for developing germplasm breeding and innovation measures for *M. paniculata*. **Method:** Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were screened from the genome resequencing data of 65 plants of *M. paniculata*. A self-written script was used to transform 20 SNPs into restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was employed to detect the 20 RFLP markers in 12 *M. paniculata* germplasm accessions, and the heterozygosity of *M. paniculata* germplasm accessions was calculated based on

**[收稿日期]** 2023-08-02

**[基金项目]** 国家科技性基础资源调查项目(2018FY100800);中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(C12021A041);青年岐黄学者项目;中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZXT202001)

**[第一作者]** 王博铖,在读硕士,从事中药鉴定学研究,E-mail: bertrandwong@outlook.com

**[通信作者]** \*袁媛,研究员,博士生导师,从事中药鉴定与分子生药学研究,Tel: 010-64087649,E-mail: y\_yuan0732@163.com

the number of enzyme-cutting bands at the 20 RFLP marker sites. Plink was used to calculate the whole genome heterozygosity of 12 *M. paniculata* germplasm accessions, and the results obtained with different methods were compared. **Result:** There was no significant difference in the heterozygosity calculated by the PCR-RFLP method and the genome resequencing method. The PCR-RFLP and genome resequencing methods identified 8 and 9 germplasm accessions, respectively, with a heterozygosity level less than 30%. Seven germplasm accessions with heterozygosity less than 30.00% were calculated by both methods. **Conclusion:** The PCR-RFLP method established in this study for evaluating the heterozygosity of *M. paniculata* germplasm demonstrates the precision of 87.5% and the accuracy of 77.8%. This method serves as a reference for developing heterozygosity evaluation methods in other medicinal plant germplasm resources.

**[Keywords]** *Murraya paniculata*; polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); single nucleotide polymorphisms (SNPs); heterozygosity; whole genome resequencing

千里香 *Murraya paniculata* 是芸香科九里香属植物,是一种常绿灌木,主要分布在我国广东、海南、云南等地。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收载其与同属植物九里香 *M. exotica* 为中药九里香基原,以叶和带叶嫩枝为入药部位,全年均可采收<sup>[1-2]</sup>。千里香,味辛、微苦,性微温,具有行气止痛,活血散瘀的功效,其主要活性成分为多甲氧基黄酮类物质,药效学研究表明其具有抗炎、镇痛、促胃肠活血及化瘀等作用<sup>[3-4]</sup>。在现代临床中,千里香常用于治疗各种痛症、慢性胃炎等疾病,是中成药“三九胃泰”的主要原料之一<sup>[5-6]</sup>。

随着临床上对千里香需求的不断增加,千里香资源正逐渐从以野生采收为主向人工种植转变,部分千里香种植基地已成规模。千里香种植基地收集引种的种质表型之间存在较大差异,课题组前期利用数量分类方法对千里香种质的叶片表型性状进行聚类分析,结果表明千里香具有丰富的遗传多样性和复杂的遗传背景<sup>[7]</sup>。现代育种的一个重要目标是选育优良新品种,目前常用的育种技术包括系统育种、杂交育种、诱变育种、倍性育种、生物育种等,但获得可稳定遗传的纯系亲本是新品种培育的前提<sup>[8]</sup>。以杂交育种为例<sup>[9]</sup>,其可将亲本双方的优良性状尽可能地集中到杂交后代中,如果利用高杂合度种质进行杂交,会导致后代的遗传特性不稳定,进而导致药材性状、成分及其临床疗效的不稳定。因此对药用植物的杂合度进行评估,以期获得群体中的低杂合度个体,可为后续新品种创制奠定基础。

单核苷酸多态性(SNP)标记法是评估基因组杂合度的重要手段,其通过检测 SNP 位点的多态性来测定基因组杂合度,具有精度高、分辨率高、效率高、高通量等优点。目前开发 SNP 的方法主要有高

通量测序、基因芯片检测等技术,其中高通量测序技术是最常用的检测手段,但其成本较高,且对于具有高杂合度的物种,其基因组测序和组装难度较大。将 SNP 标记转化成其他标记,可快速、低廉、有效地进行药用植物种质杂合度评估,其中聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(RFLP)标记是最早得到应用的分子标记<sup>[10]</sup>。本文对原有技术进行了改进,利用 65 株千里香群体重测序数据筛选获得的单核苷酸多态性 SNP 位点开发 RFLP 标记,并建立了一种千里香种质杂合度聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性(PCR-RFLP)评估方法,为千里香种质创新研究奠定基础。

## 1 材料

**1.1 植物样品** 千里香种质材料收集自广东省云浮市岭南中药材种子种苗繁育基地(112°8'20"E, 22°48'41"N),采集的样本为 2 年生千里香成熟叶,单株取样,用硅胶保存。采集样本均栽于阳坡,株行距为 1.5 m×1.2 m, 2 m×1.2 m,共采集样本 107 份(编号 001-107)。本试验采取随机抽样进行测试,抽取种质编号为 003、005、016、020、030、039、052、067、086、089、100、104,重新编号为 1-12,材料保存于中国中医科学院中药资源中心。

**1.2 试剂** Plant Genomic DNA Kit 植物基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号 X0420], Trans2K DNA Marker、6×loading buffer(北京全式金生物技术有限公司,批号 R30523、R10201), 2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix(北京聚合美生物科技有限公司,批号 23FB0801), *EcoR* I 酶[New England Biolabs (Beijing) Ltd., 批号 10164309], GelRed 核酸染料(北京兰博利德公司,批号 R001020831), 琼脂粉(西班牙 Biowest 公司,批号 111860)。

**1.3 仪器** Wonbio-48P型高通量植物组织研磨仪(上海万柏生物科技有限公司), VORTEX-2 GENIE型漩涡振荡仪(美国Scientific Industries公司), Eppendorf 5424型离心机(德国Eppendorf公司), Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪(美国Thermo Scientific公司), VeritiPro™型PCR仪(美国Applied Biosystem公司), PowerPac™型电泳仪, 凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 RFLP标记位点筛选** 基于65个千里香种质材料重测序数据, 使用分析软件Genome Analysis Toolkit对千里香重测序数据进行SNP检测并筛选。

**2.1.1 SNP筛选** 以下3种情况下的SNP需要剔除: ①SNP上下游的5 bp以内存在其他插入或缺失变异位点; ②缺失率>30%; ③最小等位基因频率不足5%的SNP。

**2.1.2 杂合度计算** 通过上述限制条件共筛选获得4 609 185个SNP位点, 利用这些SNP位点计算65个千里香种质的杂合度及SNP位点的杂合度。

种质杂合度计算公式为 $1 - \text{纯合位点数} / \text{总位点数} \times 100\%$ , 通过plink软件的“-het”功能计算出每个样本的纯合位点数及总位点数, 换算为杂合度; SNP位点杂合度的计算公式为 $1 - \text{纯合位点数} / \text{总位点数} \times 100\%$ , 可以通过plink软件的“-hardy”功能计算出每个SNP位点的纯合样本数, 再换算为杂合度。

**2.1.3 分组** 将不同杂合度的SNP位点进行分组, 设置2%作为步长, 设置10%作为区间长度。

**2.1.4 评估** 首先利用自编脚本从各组中随机抽取20个SNP位点进行不同种质材料杂合度的评估, 计算在每10%区间鉴定结果与使用各种质材料全部SNP位点评估的杂合度一致的样本比例, 以上过程使用自展法(bootstrap)自助抽样1 000次。

**2.1.5 确定酶切位点** 根据自编脚本通过Biopython软件包中的Restriction功能分析SNP位点及其侧翼序列的限制性内切酶识别位点存在情况, 排除SNP位点上下游具有同一特异性酶切位点的情况。当SNP位点位于限制性内切酶识别位点中, 且其侧翼序列不存在相同的限制性内切酶识别位点, 则该SNP位点可作为候选RFLP标记。本文检测了EcoR I、Hind III、Xba I、Xho I、Sal I等限制性内切酶的识别位点。

**2.2 基因组DNA提取** 使用经75%乙醇擦拭的镊子取样品适量, 取千里香成熟叶样品, 放入200 mL离心管内, 加入无菌氧化锆珠, 用高通量组织研磨

仪进行千里香叶片的研磨, 取粉末30 mg, 利用Plant Genomic DNA Kit植物基因组DNA提取试剂盒说明书进行DNA提取。用Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪测定其DNA浓度, 并根据吸光度 $A_{260 \text{ nm}/280 \text{ nm}}$ 和 $A_{260 \text{ nm}/230 \text{ nm}}$ 判断DNA质量。

**2.3 PCR扩增** 使用特异性引物对12份样品DNA进行PCR扩增。PCR反应体系为25  $\mu\text{L}$ , 其中包含2 $\times$ M5 Supper FastTaq PCR MasterMix 12.5  $\mu\text{L}$ , 正向引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 反向引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA模板1  $\mu\text{L}$ , 加无菌水补足至25  $\mu\text{L}$ , 反应条件为95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 59  $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s, 35个循环; 产物末端72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。PCR反应结束后, 取反应产物5  $\mu\text{L}$ , 加入6 $\times$ Loading Buffer 1  $\mu\text{L}$ , 混匀后于GelRed核酸染料染色的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统观察、成像, 拍照保存。

**2.4 PCR产物酶切** 取PCR产物进行RFLP分析, 将产物置于200  $\mu\text{L}$  PCR管中, 进行酶切反应, 反应体系为25  $\mu\text{L}$ , 包含10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , PCR产物15  $\mu\text{L}$ , 限制性内切酶(10  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 加无菌水补足至25  $\mu\text{L}$ , 同法另取无菌双蒸水, 作为阴性对照, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应2 h。酶切反应结束后, 取酶切产物5  $\mu\text{L}$ , 加入6 $\times$ Loading Buffer 1  $\mu\text{L}$ , 混匀后于GelRed核酸染料染色的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统观测、成像, 拍照保存。

**2.5 千里香种质杂合度评估** 对于基因组重测序法, 基于已获得的SNP和基因型信息, 使用plink软件中的“-het”功能计算每个种质材料的总位点数和纯合位点数, 计算杂合度, 计算公式: 杂合度=1-纯合位点数/总位点数 $\times 100\%$ ; 对于PCR-RFLP法, 杂合度为同一种质上不同RFLP位点出现3个片段数量的百分比, 计算公式:  $He = n/m \times 100\%$ ;  $He$ 为杂合度;  $n$ 为凝胶电泳出现3个片段的RFLP位点数量;  $m$ 为总RFLP位点数量, 本试验 $m=20$ 。

## 3 结果

**3.1 RFLP标记筛选** 对千里香群体重测序数据进行分析, 使用杂合度0~10%的SNP位点评估千里香种质材料纯合度正确率最高。随机挑选20个杂合度为0~10%的SNP位点对千里香种质材料纯合度进行鉴定, 鉴定准确率为75%。在上述SNP位点两侧序列中查找酶切位点EcoR I、Hind III、Sal I、Xba I、Xho I, 发现1 553个具有酶切位点的SNP, 可开发为RFLP标记, 其中284个位于EcoR I酶切位点上。从中随机挑选了20个位点进行标记开发,

使用Premier Primer 3.0设计PCR扩增引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

本试验选择通过EcoR I酶切产物多态性计算千里香种质的杂合度。

表1 20个PCR-RFLP标记的引物序列及其产物长度

Table 1 Sequence of 20 RFLP marker primers and length of their products

编号	上游5'-3'	下游5'-3'	PCR产物长度/bp	酶切产物长度/bp
E-1	TGCTTCACCCATGTCTTCAT	CATAGGCTGCAAATGGGTCC	561	404 157
E-2	TTCCATCGTCGTTACCACCG	TACTAAACTGCCCTCGCGTC	509	323 186
E-3	AACCTTCTTCTACGCATCGT	ATGTCATCTAGAGGCCAGAAT	660	445 215
E-4	GTCCTAGTGCCACCATGTG	CGGACGTAGGCAATTTGTTTG	700	437 263
E-5	AGTGCTGTATGCCTTGGTT	GCCATTGCTGGTGATCCTGT	571	147 424
E-6	CGGCAAGGAAGACTACTGTC	TCGCTTGTCTCGAGATCAG	700	491 209
E-7	GTGCTCGGCCACCTATTCTT	ACCCGAAATGCAAGATCCGT	664	432 232
E-8	CCACATGGATCATGGGCCAT	CACAACATAGCCATTAGCCACC	500	188 312
E-9	GGCCTCTGCAGGAGAACATT	AACTAGTAAACCACGTGTTTGA	603	474 129
E-10	TATGCGTTGGCCCTTTGTTG	TGCCAGGACCACAGTCAAAA	641	214 427
E-11	ACTCTAGAACGCGTGCTTGT	CAAGCCAATGTTGCTTCTCCA	607	439 168
E-12	CGATGACCACCCAGGTAAC	TGCCTCTCGATCCCTTCTCT	601	182 419
E-13	GACGGCAGTCAGGTAACGAT	AGGCTCTAGCAACGTCACCTG	618	123 495
E-14	CACGGCTTCTAGTCACTGCT	GGTCAGGTGCCTGTGGAAAT	610	421 189
E-15	CATTTGTGCTGTGGGGATGC	ATGACTGCAGAGATTGAAAGCA	666	471 195
E-16	TGACTATGCGGAATGTGATCC	AGCTACTACTCCCAATCCAA	531	421 110
E-17	TCGTCCACGAAAGCCTTACG	CGGAGCCAAGTGAGGATACC	545	377 168
E-18	CTAGTTCGAGCTTCTGGCCG	GTCTACTGTTACCGGACGCA	680	226 454
E-19	CAACTACTGGTTGCACTTCGA	GATCAACTGGGTGTGTTGTGA	575	376 199
E-20	CTTCCACCACCAGGATGCAA	ACACATGAGTCGATGATCCGA	576	97 479

注:限制性内切酶均为EcoR I

**3.2 RFLP标记检测** 使用表1中20对引物对12份千里香种质材料进行特异性PCR扩增及EcoR I限制性内切酶酶切反应。EcoR I的特异性识别序列为5'-GAATTC-3',其互补序列为5'-CTTAAG-3',在G和A之间可将这段序列切开,使得不同种质的PCR-RFLP电泳图谱可能出现1、2、3个片段的情况:即①如果种质在识别序列上存在纯合突变,则无法发生酶切反应,电泳图谱上只出现1个PCR扩增产物片段;②如果种质在识别序列上不存在突变,则酶切反应正常,电泳图谱上出现2个酶切产物片段;③如果种质在识别序列上存在杂合突变,其中的纯合序列可发生酶切反应,而杂合序列不发生酶切反应,电泳图谱上显示PCR扩增与酶切产物的3个DNA片段。

当出现1个或2个片段,代表种质材料在该标记位点是纯合的;当出现3个片段,代表种质材料在该标记位点是杂合的。12个千里香种质20个标记

PCR-RFLP多态性统计见表2,电泳结果见图1。

**3.3 千里香种质杂合度评估** 采用PCR-RFLP法计算杂合度,12份千里香种质杂合度在25%~30%,其中有8份种质杂合度<30%,种质编号为1、3、6、7、8、9、11、12;其中4份种质杂合度≥30%,种质编号为2、4、5、10。采用基因组重测序法计算杂合度,12份种质的杂合度在26.45%~30.38%,其中9份种质杂合度<30%,种质编号为1、3、6、7、9、10、11、12;其中3份种质的杂合度≥30%,种质编号为2、4、8。综上,利用两种方法计算杂合度均<30%的种质材料共7份,分别是种质1、3、6、7、9、11、12,见表3。

利用SPSS(IBM SPSS Statistics 25)软件对两种方法计算的杂合度进行比较,S-W正态性检验结果显示,两方法计算的杂合度绝对差值服从正态分布;成对样本T检验结果显示,两方法计算的杂合度间无显著性差异。

表2 12份千里香的酶切产物多态性统计

Table 2 Polymorphism statistics of digestion products of 12 *M. paniculata* samples

引物 编号	种质编号											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E-1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
E-2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
E-3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
E-4	2	3	2	3	3	2	2	2	2	3	2	2
E-5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
E-6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
E-7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-9	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-10	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-11	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-12	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-13	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-15	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2
E-16	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-17	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-18	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-19	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E-20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

表3 12份千里香种质的杂合度

Table 3 Heterozygosity rate of 12 *Murraya paniculata* samples %

种质 编号	RFLP 评估	基因组重 测序评估	绝对差	种质 编号	RFLP 评估	基因组重 测序评估	绝对差
1	25.00	28.75	3.75	7	25.00	29.17	4.17
2	30.00	30.37	0.37	8	25.00	30.38	5.38
3	25.00	29.54	4.54	9	25.00	29.83	4.83
4	30.00	30.35	0.35	10	30.00	29.93	0.07
5	30.00	29.50	0.50	11	25.00	26.45	1.45
6	25.00	26.60	1.60	12	25.00	27.58	2.58

度是影响新品种形成的关键因素之一,由于杂合位点具有诱导突变率升高的作用<sup>[13]</sup>,使得高杂合度种质具有双重特点,一方面有益于产生优异性状,另一方面不利于保持稳定的性状。因此,在种质资源收集过程中,应充分利用高杂合度诱导形成的突变材料;在优异种质繁育过程中,应充分考虑杂合度对遗传稳定性的影响。

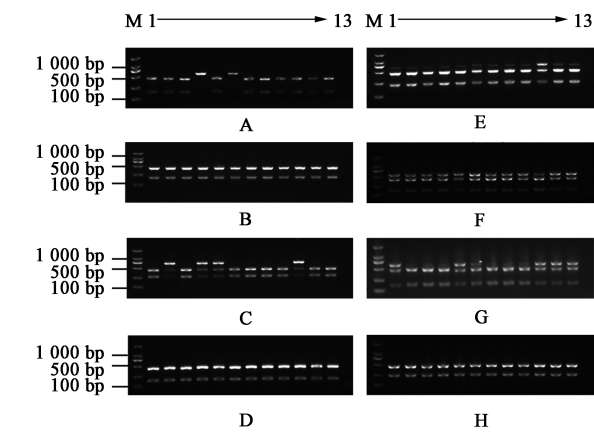
PCR-RFLP技术具有稳定性好、特异性高、操作简单等优点,在中药材的鉴别中得到了广泛应用,如天南星与半夏的真伪鉴别<sup>[14]</sup>、虻虫与其混伪品鉴别<sup>[15]</sup>、红乌天麻及其杂交天麻的鉴别<sup>[16]</sup>、梅花鹿茸与马鹿茸鉴别<sup>[17]</sup>、天麻杂合度鉴别等<sup>[10]</sup>。本研究利用20个RFLP标记建立了可用于千里香杂合度评估的PCR方法,以基因组重测序评估结果为对照,该方法精确度为87.5%,准确率为77.8%。相较于课题组前期建立的天麻快速筛选高纯合度种质的方法<sup>[10]</sup>,本法仅通过*EcoR* I酶切产物多态性即可计算千里香种质的杂合度,降低了成本,且更为快速简便,具有良好的应用价值。

当杂合度>0.8%或重复序列占比大于60%时,即被定义为复杂基因组<sup>[18]</sup>,经评估,千里香种质的基因组杂合度在26.45%~30.37%,属于复杂基因组,也显著高于葡萄(1.55%~1.58%)<sup>[19]</sup>、生姜(3.6%)<sup>[20]</sup>等园艺作物。为保障生物学性状稳定、药用成分可控稳定性,应采用无性繁殖的方式进行优异种质繁育;同时应加强千里香种质的自交繁育研究,以期作为纯系选择奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 陈梓媛,赵玉洋,谢旭桃,等. 多基原九里香药材的多重点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,



注:A.E-15;B.E-14;C.E-4;D.E-11;E.E-3;F.E-1;G.E-5;H.E-7;编号1~12.12份不同千里香种质材料;编号13.空白(ddH<sub>2</sub>O为模板);M.Trans 2K DNA Marker

图1 8对PCR引物的*EcoR* I酶切

Fig. 1 *EcoR* I digestion results of 8 PCR primers

4 讨论

我国药用植物种质资源遗传多样性丰富<sup>[11]</sup>,采用选择育种法从混杂群体中选出优良种质是目前中药材新品种选育的主要方式<sup>[12]</sup>。基因组的杂合

- 2022,28(17):106-112.
- [3] 鹿梦秋,梁海珍,屠鹏飞,等. 中药九里香两种不同基原植物的药效学比较研究[J]. 中国药学:英文版, 2021,30(1):49-57.
- [4] 王茹茹,张珊珊,许红涛,等. 千里香化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2023,35(5):787-797.
- [5] YU G, ZHANG T, XU H, et al. Investigating the active substance and mechanism of San-Jiu-Wei-Tai granules via UPLC-QE-Orbitrap-MS and network pharmacology [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022:1487903.
- [6] 杨熙,李瑞,周美,等. 千里香药学研究概况[J]. 安徽农业科学,2013,41(33):12978-12979.
- [7] 谢旭桃,华中一,李晓琳,等. 千里香叶片性状的数量分类与内源激素含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(21):167-173.
- [8] 许玲,何秋伶,梁宗锁. 药用植物育种现状、存在的问题及对策[J]. 科技通报,2021,37(8):1-7.
- [9] 孙莹莹,罗睿,杜禹珊,等. 药用植物杂交育种技术研究进展[J]. 中药材,2016,39(2):442-446.
- [10] 谢莹,华中一,赵玉洋,等. 快速筛选高纯度天麻PCR-RFLP鉴定方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(17):113-118.
- [11] 黄璐琦,王继永. 中药材种业发展与产业化实践[M]. 北京:科学出版社出版,2022.
- [12] 王洁,陈江,鲜彬,等. 中药品种选育与“中药品质育种”研究思路[J]. 中草药,2023,54(6):2012-2020.
- [13] 黄驹. 杂合度和胁迫条件对植物突变和重组的影响[D]. 南京:南京大学,2017.
- [14] 肖建才,闫滨滨,杨健,等. 天南星、半夏的PCR-RFLP鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(6):194-201.
- [15] 蒋超,李军德,袁媛,等. 虻虫的PCR-RFLP鉴别研究[J]. 中国现代中药,2017,19(1):16-20.
- [16] 李慧,钱润,田娜,等. 红天麻、乌天麻及其杂交天麻的PCR鉴别[J]. 中国中药杂志,2020,45(15):3666-3671.
- [17] 徐岩,邵博宇,徐宁,等. 应用PCR-RFLP方法鉴定梅花鹿茸与马鹿茸[J]. 中国药学杂志,2020,55(24):2021-2028.
- [18] 高胜寒,禹海英,吴双阳,等. 复杂基因组测序技术研究进展[J]. 遗传,2018,40(11):944-963.
- [19] PARK M, VERA D, KAMBRIANDA D, et al. Chromosome-level genome sequence assembly and genome-wide association study of *Muscadinia rotundifolia* reveal the genetics of 12 berry-related traits [J]. Horticulture Res, 2022, 9: uhab011.
- [20] LI H L, WU L, DONG Z, et al. Haplotype-resolved genome of diploid ginger (*Zingiber officinale*) and its unique gingerol biosynthetic pathway [J]. Horticulture Res, 2021, 8(1):189.

[责任编辑 顾雪竹]