

· 资源与质量评价 ·

69 份苦玄参种质 SSR 遗传多样性及品质性状相关标记分析

闫国跃^{1,2,3}, 杨帆², 白燕远^{2,3,4}, 李耀燕^{2,3,4}, 吴梦丽², 高慧^{1,2},
张森⁵, 阿里穆斯^{1*}, 谢阳姣^{2,3,4*}

(1. 中央民族大学 民族医药教育部重点实验室, 药学院, 北京 100081;

2. 广西中医药大学 瑶医药学院, 南宁 530001;

3. 广西壮瑶医药与医养结合人才小高地, 南宁 530001;

4. 广西壮瑶药工程技术研究中心, 南宁 530200;

5. 广西壮瑶药重点实验室 (壮瑶药协同创新中心), 南宁 530200)

[摘要] 目的: 采用简单重复序列 (SSR) 分子标记技术对广西苦玄参主产区 69 份苦玄参种质样本进行遗传多样性及亲缘关系分析, 并筛选与苦玄参苷含量相关联的优良种质基因。为苦玄参种质资源评价、遗传进化分析及分子标记辅助育种等提供依据。**方法:** 基于转录组测序技术, 开发 20 对引物进行批量扩增。利用各标记位点的遗传多态信息, 分析 69 份苦玄参种质的遗传多样性及亲缘关系, 并通过一元线性和多元逐步回归分析, 筛选与苦玄参苷含量相关联的分子标记。**结果:** 20 对 SSR 引物共扩增出 76 个等位基因, 平均每个位点观测等位基因 3.8 个, 高于有效等位基因数 (1.969 2 个), 稀有等位基因率为 38.2%, 等位基因分布不均匀。等位基因多态率范围为 0~59%, 平均 38.24%, 各位点多态率差异较大。各位点多态信息含量 (PIC) 变化范围为 0~0.621 1, 平均 0.378 0; Shannon 多态性信息指数变化范围为 0~1.240 1, 平均 0.759 0; Nei's 基因多样性指数 (Nei) 变化范围为 0~0.682 3, 平均 0.440 9; 以上 3 个指标最高的为 P21, 最低为 P7, 各位点遗传多样性存在较大差异。各位点平均观测杂合度为 0.382 4, 低于平均期望杂合度 (0.442 5), 表现为杂合子缺失; 平均遗传分化系数 F_{st} 为 0.365 9; 基因流 N_m 平均值为 0.433 2, 种质遗传分化较大, 基因流较小。一元线性回归分析和多元逐步回归分析结果表明, 与苦玄参苷 IA 和 IB 相关的位点各有 5 个, 其中仅有 1 个位点与 2 个成分的含量均相关。**结论:** 20 个 SSR 标记位点遗传多样性存在较大的差异, 供试 69 份种质遗传分化大, 基因流较小; 从供试 20 个 SSR 标记中筛选出 9 个与苦玄参苷含量相关联的标记位点, 试验结果可为苦玄参遗传进化分析及良种选育和繁育等提供依据。

[关键词] 苦玄参; 简单重复序列 (SSR) 分子标记; 遗传多样性; 品质性状; 相关分析

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0174-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200414

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191106.1740.006.html>

[网络出版时间] 2019-11-07 10:15

SSR-based Analysis of Genetic Diversity and Quality Trait-related Markers of 69 *Picria felterrae* Germplasm Samples

YAN Guo-yue^{1,2,3}, YANG Fan², BAI Yan-yuan^{2,3,4}, LI Yao-yan^{2,3,4},
WU Meng-li², GAO Hui^{1,2}, ZHANG Miao⁵, BORJIGIDAI Almaz^{1*}, XIE Yang-jiao^{2,3,4*}

(1. Key Laboratory of Ethnomedicine, Ministry of Education, School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China;

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

[收稿日期] 20190720(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31460074,81573535);国家重点研发计划项目(2017YFC1704000);民族医药教育部重点实验室自主课题(KLEM-ZZ201805);广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号);壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号)

[第一作者] 闫国跃, 博士, 讲师, 从事民族医药资源保护与利用研究, E-mail: 419088316@qq.com

[通信作者] * 谢阳姣, 博士, 研究员, 从事民族医药资源保护与利用研究, E-mail: xieyangjiao@163.com;

* 阿里穆斯, 博士, 教授, 从事民族医药资源保护与利用研究, E-mail: almaz.b@hotmail.com

3. Guangxi Talent Highland for Zhuang and Yao Medicine and Combination of Medical Care and Elderly Care, Nanning 530001, China;

4. Guangxi Center for Zhuang and Yao Medicine Engineering and Technology Research, Nanning 530200, China; 5. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine Collaborative Innovation Center of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning 530200, China)

[**Abstract**] **Objective:** Sixty-nine germplasm samples of *Picria felterrae* collected from the main producing areas in Guangxi were subject to genetic diversity and genetic relationship analyses using the simple sequence repeat (SSR) molecular marker technology and good germplasm genes associated with the content of picfeltarraenins were screened so as to provide references for germplasm resource evaluation, phylogenetic analysis, and molecular mark assisted breeding of that species. **Method:** 20 pairs of randomly selected primers were amplified based on the transcriptome sequencing technology. The genetic diversity of and genetic relationship between the 69 samples were analyzed using the genetic polymorphic information for each marker locus, and one-variable linear regression and multiple stepwise regression analyses were performed to screen molecular markers associated with the content of picfeltarraenins. **Result:** The amplification using the 20 pairs of SSR primers produced 76 alleles, 3.8 alleles for each locus on average, higher than effective alleles (1.969 2), and the rare allele rate was 38.2%, suggesting that the alleles distributed unequally. The polymorphism rates of alleles varied between 0-59%, with an average of 38.24%, showing a great difference among loci. The polymorphic information content (PIC) varied between 0-0.621 1, with an average of 0.378 0. Shannon polymorphic information index varied between 0-1.240 1, with an average of 0.759. Nei's gene diversity index (Nei) varied between 0-0.682 3, with an average of 0.440 9. P21 had the highest level accompanied with the lowest P7 for the above three indexes, and significant genetic diversity differences were identified among the loci. For all loci, the mean observed heterozygosity was 0.382 4, lower than the average expected heterozygosity of 0.442 5, suggesting the loss of heterozygosity, the average genetic differentiation coefficient (Fst) was 0.365 9 and the average gene flow Nm was 0.433 2, suggesting a high genetic divergence and a low gene flow. The results of one-variable linear regression and multiple stepwise regression showed that there were 5 loci related to each of the picfeltarraenin IA and IB, and only 1 loci was associated with the content of both. **Conclusion:** There were significant differences in the genetic diversity of 20 SSR marker sites, and the 69 germplasm samples were greatly genetically differentiated and had low gene flow. From the selected 20 SSR markers 9 marker loci associated with the content of picfeltarraenin IA and IB were selected. The results can be used as a reference for phylogenetic analysis and selective breeding of *Picria felterrae*.

[**Key words**] *Picria felterrae*; simple sequence repeat (SSR) marker; genetic diversity; quality trait; correlation analysis

苦玄参属广西道地药材, 收载于历年《中国药典》。目前, 苦玄参的相关研究仍主要集中在含量测定、化学成分、复方机制等方面^[1-3], 相关种植也有一些报道^[4], 苦玄参生物遗传信息及种质资源的开发却研究较少。苦玄参生长力较弱; 以种子繁殖为主, 种子极细小, 出苗率和成苗率低; 加之气候和环境改变、生长空间不断缩小, 野生资源已无法满足企业用药需求。目前, 苦玄参主要以人工种植为主, 主产区为广西梧州和龙州。课题组前期研究发现, 同一栽培条件下, 苦玄参药材质量良莠不齐^[5], 排除环境条件的影响, 其差异主要来源于种质上的差异。药材质量上的差异给中医用药及企业制定药材

质量标准带来困难, 有必要选择优良种质, 统一栽培品种, 提高药材质量。对苦玄参种质的遗传多样性进行研究, 明确苦玄参主要变异来源和进化关系, 分析种质与品质的相关性, 可为苦玄参种质资源评价和保护、优良种质选育及分子标记辅助育种等提供依据。

遗传多样性是生物多样性的基础, 遗传多样性越丰富, 物种的稳定性及进化潜力就越强, 对环境的适应能力也越高。遗传多样性的研究不仅有助于对种质资源的评价、开发及保护, 更是作物遗传改良和引种、育种的理论基础。传统检测遗传多样性方法有形态学水平、细胞学(染色体)水平、生理生化水

平,目前已发展到分子水平。利用与性状相关联的标记选择目的性状,具有选择准确、效率高等优点,因此,随着分子标记技术的不断成熟,分子标记辅助育种已成为作物育种的首选方式,如在水稻中的应用取得了较好的效果^[6-7]。数量性状基因座(Quantitative Trait Loci, QTL)通过定位与所选择性状连锁的标记,辅助选择育种,是重要的分子标记辅助育种手段^[8-9],但他需要构建遗传群体,对物种的基因信息要求较高,需要有参考基因才能实现,对于没有参考基因组的物种来说,关联分析(或相关分析)不失为一种简单的选择关联标记的方法。GUO 等^[10]利用全基因组关联分析方法分析小麦生长性状的相关标记,获得一些与生长性状相关的重要信息。李丹阳等^[11]通过相关分析,获得 77 个与花生营养品质性状相关的简单重复序列(SSR)分子标记。牛泓博等^[12]通过相关分析,获得 4 个与菲律宾蛤仔生长性状相关的 EST-SSR 标记。左力辉等^[13]通过关联分析,证明野苹果部分 SSR 标记与其叶形变异具有关联。

SSR 又称微卫星技术,该技术因其共显性遗传、多态位点多、信息含量丰富,目前在分子标记开发、种质遗传多样性和亲缘关系^[14-17],QTL 及基因关联分析,遗传背景及遗传育种和品种鉴定^[18-19]等方面得到广泛应用。本研究利用 SSR 分子标记,分析课题组前期基于同一居群的表型性状筛选出的 69 份种质的遗传差异,探明苦玄参群体内遗传分化状态,同时对筛选的标记与苦玄参主要品质性状苦玄参苷 IA 和 IB 的含量进行相关分析,筛选与品质性状关联的标记,结果可为苦玄参资源评价、遗传进化、良种选育、分子标记辅助育种等提供参考和依据。

1 材料

2014 年 7 月,于苦玄参主产区广西龙州和梧州,经广西中医药大学药用植物专家韦松基教授鉴定为玄参科苦玄参 *Picria felterrae*。基于苦玄参表型性状差异筛选出 69 个单株,采集种子。种子分为 2 份,分别于 2016 年和 2017 年于广西南宁连续种植 2 年。每年采集盛花期苦玄参植株倒数第二对展开叶,使用硅胶干燥, -20 °C 保存备用。69 份种质表型性状见表 1。

DYY-6B 型电泳仪(北京六一);GELI-DOC2000 型凝胶成像分析仪,聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国伯乐, Bio-Rad);3730XL 型测序仪(美国应用生物)。

CTAB 提取液[100 mmol NaCl, 20 mmol EDTA

(pH 8.0), 2% CTAB, 100 mmol Tris-HCl];苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),三氯甲烷-异戊醇(24:1)。

2 方法

2.1 引物合成 基于转录组序列挖掘 SSR 标记 13 768 条,根据其在不同样品中的扩增结果,随机选择具有 2 至 6 个碱基数,90% 样品有扩增,具有多态性的标记 100 条,根据其两端保守序列,设计和合成引物。采用 10 个样品对这 100 条引物的多态性进行验证,得到多态性引物 48 条,从多态性引物里随机选择 20 条,用于批量扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,入选引物所在序列 NCBI 登录号为 SRR5942165,20 条引物具体信息见表 2。

2.2 基因组 DNA 的提取 DNA 提取参照谢阳姣等^[14]的方法进行,每一年度、每份种质随机选择 30 个单株,分别提取 DNA 后等量混合用于 PCR 扩增。采用 CTAB 法提取进行 DNA 提取,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。

2.3 PCR 扩增 采用毛细管电泳荧光检测法进行检测,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(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.3 μL , 反向引物(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.3 μL , DNA 模板 2 μL , *Taq* 0.2 μL 。扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,54 °C(退火温度在 54 °C 上下波动)复性 35 s,72 °C 延伸 40 s,共 35 个循环;最终 72 °C 延伸 3 min。

扩增后采用毛细管电泳方法检测,按 100:1 的体积比将甲酰胺与分子量内标混匀后,取 9 μL 加入上样板中,再加入稀释 10 倍的 PCR 产物 1 μL 。使用 3730XL 型测序仪进行毛细管电泳,测序仪得到的原始数据利用 Genemarker 中的 Fragment(Plant)片段分析软件进行分析,将各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置做比对,得到片段大小。

2.4 数据分析 一个引物为一个等位基因位点,将其表现型(即每个样品在各个等位基因位点的片段大小),按照 Convert 1.31(Glaubitz, 2004)软件要求的格式录入转化数据格式。使用 POPGENE32 软件对 SSR 遗传多样性相关参数进行统计分析。使用 NTSYS_2 软件对苦玄参群体进行聚类分析。将每一位点的不同基因型进行哑变量设置,参照李丹阳等^[11]的方法,采用 SPSS 13.0 的一般线性模型(GLM)对 SSR 分子标记与苦玄参主要药效物质

表 1 69 份苦玄参种质表型性状 ($n=3$)

Table 1 Phenotypic characters of 69 *Picria felterrae* germplasms ($n=3$)

种质	产地	苦玄参苷 IA/%	苦玄参苷 IB/%	花色	茎色	叶形	叶脉	叶缘	叶基
hzp02	龙州	0.291	0.242	淡紫	绿	卵圆形	浅	圆	平滑
hzp03	龙州	0.350	0.223	淡紫	紫绿相间	卵圆形	浅	圆	交错
hzp04	龙州	0.490	0.211	淡紫	紫绿相间	卵圆形	浅	圆	交错
hzp05	龙州	0.214	0.210	淡紫	紫绿相间	卵圆形	深	尖	平滑
hzp06	龙州	0.284	0.241	淡紫	全紫	卵圆形	深	圆	交错
hzp07	龙州	0.269	0.216	淡紫	全紫	卵圆形	深	圆	交错
hzp08	龙州	0.327	0.195	淡紫	绿	卵圆形	深	圆	交错
hzp10	龙州	0.337	0.252	淡紫	紫绿相间	卵圆形	浅	尖	交错
hzp11	龙州	0.323	0.269	淡紫	紫绿相间	卵圆形	深	圆	交错
hzp12	龙州	0.340	0.217	淡紫	绿	卵圆形	深	圆	平滑
lxj01	龙州	0.389	0.250	紫色	绿	卵圆形	浅	尖	交错
lxj03	龙州	0.292	0.245	紫白	绿	卵圆形	浅	尖	交错
lxj05	龙州	0.399	0.199	紫白	绿	卵圆形	深	尖	交错
lxj06	龙州	0.377	0.283	淡紫	绿	卵圆形	深	圆	平滑
lxj07	龙州	0.266	0.235	紫白	紫绿相间	卵圆形	深	尖	平滑
lxj09	龙州	0.343	0.233	无花	绿	卵圆形	深	圆	交错
lxj10	龙州	0.389	0.241	淡紫	绿	卵圆形	浅	圆	交错
lxj11	龙州	0.335	0.189	无花	紫	卵圆形	深	圆	平滑
lxj12	龙州	0.449	0.219	淡紫	绿	卵圆形	深	圆	平滑
wzhjx01	梧州	0.376	0.232	淡紫	淡紫	卵圆形	深	圆	平滑
wzhjx03	梧州	0.365	0.199	淡紫	绿	卵圆形	浅	圆	交错
wzhjx05	梧州	0.360	0.200	淡紫	淡紫	卵圆形	浅	尖	平滑
wzhjx06	梧州	0.335	0.178	淡紫	淡紫	卵圆形	浅	尖	平滑
wzhjx10	梧州	0.338	0.192	淡紫	淡紫	卵圆形	浅	圆	平滑
wzhjx11	梧州	0.264	0.232	淡紫	淡紫	卵圆形	浅	圆	平滑
wzhjx12	梧州	0.254	0.161	淡紫	淡紫	卵圆形	深	圆	平滑
wzhjx14	梧州	0.312	0.268	淡紫	绿	卵圆形	浅	尖	平滑
wzhjx15	梧州	0.266	0.201	淡紫	绿	卵圆形	深	尖	平滑
wzhzp18	梧州	0.313	0.151	淡紫	绿	卵圆形	深	圆	平滑
wzhzp19	梧州	0.331	0.160	淡紫	绿	卵圆形	浅	尖	交错
wzhzp20	梧州	0.389	0.189	淡紫	淡紫	卵圆形	深	尖	平滑
wzhzp21	梧州	0.299	0.288	淡紫	淡紫	卵圆形	深	尖	交错
wzhzp22	梧州	0.248	0.188	紫色	淡紫	卵圆形	浅	圆	平滑
wzhzp23	梧州	0.300	0.204	紫白	绿	卵圆形	浅	尖	交错
wzhzp24	梧州	0.269	0.265	淡紫	绿	卵圆形	深	圆	平滑
wzhzp25	梧州	0.337	0.221	淡紫	淡紫	卵圆形	浅	圆	交错
wzhzp26	梧州	0.297	0.227	紫白	淡紫	卵圆形	浅	圆	平滑
wzhzp27	梧州	0.289	0.204	淡紫	淡紫	心形	深	圆	交错
xyj01	龙州	0.366	0.288	淡紫	绿	卵圆形	浅	圆	交错

续表 1

种质	产地	苦玄参苷 IA/%	苦玄参苷 IB/%	花色	茎色	叶形	叶脉	叶缘	叶基
xyj02	龙州	0.280	0.236	淡紫	绿	长卵圆形	浅	圆	平滑
xyj03	龙州	0.324	0.222	淡紫	老紫嫩绿	心形	深	尖	交错
xyj04	龙州	0.399	0.196	淡紫	绿	卵圆形	浅	圆	交错
xyj05	龙州	0.237	0.248	紫色	绿	长卵圆形	浅	尖	平滑
xyj06	龙州	0.350	0.229	紫色	老紫嫩绿	心形	深	圆	交错
xyj07	龙州	0.260	0.254	紫色	全紫	小叶(心形)	浅	圆	交错
ytl01	龙州	0.321	0.225	淡紫	绿	卵圆形	深	尖	平滑
ytl02	龙州	0.264	0.279	淡紫	绿	卵圆形	深	尖	平滑
ytl03	龙州	0.356	0.268	淡紫	绿	卵圆形	浅	尖	平滑
ytl04	龙州	0.227	0.186	淡紫	紫	卵圆形	浅	尖	平滑
ytl05	龙州	0.280	0.247	淡紫	全绿	卵圆形	浅	圆	平滑
ytl06	龙州	0.218	0.191	淡紫	绿	卵圆形	浅	圆	平滑
ytl07	龙州	0.279	0.259	淡紫	紫绿相同	卵圆形	浅	圆	平滑
ytl08	龙州	0.355	0.232	淡紫	淡紫	卵圆形	深	尖	平滑
ytl09	龙州	0.347	0.199	淡紫	绿	心形	深	尖	平滑
ytl10	龙州	0.311	0.281	淡紫	绿	卵圆形	浅	尖	交错
ytl11	龙州	0.349	0.343	淡紫	绿	卵圆形	浅	圆	平滑
ytl12	龙州	0.244	0.237	淡紫	绿	卵圆形	深	圆	交错
zgb01	龙州	0.377	0.274	淡紫	全紫	心形	浅	圆	交错
zgb02	龙州	0.357	0.316	淡紫	淡紫	心形	深	圆	交错
zgb03	龙州	0.352	0.261	淡紫	绿	心形	浅	圆	交错
zgb04	龙州	0.431	0.270	淡紫	绿	长卵圆形	浅	圆	交错
zgb05	龙州	0.459	0.226	无花	淡紫	卵圆形	深	圆	平滑
zgb06	龙州	0.321	0.258	淡紫	淡紫	小叶(心形)	浅	尖	平滑
zgb07	龙州	0.372	0.260	无花	淡紫	长卵圆形	浅	圆	平滑
zgb08	龙州	0.347	0.265	淡紫	绿	长卵圆形	深	圆	交错
zgb09	龙州	0.422	0.179	无花	绿	卵圆形	浅	圆	平滑
zgb10	龙州	0.370	0.237	淡紫	淡紫	长卵圆形	深	圆	平滑
zgb11	龙州	0.397	0.259	淡紫	淡紫	卵圆形	浅	圆	平滑
zgb12	龙州	0.372	0.228	淡紫	淡紫	卵圆形	浅	圆	平滑

苦玄参苷 IA 和 IB 进行相关分析,并对有显著相关的标记进行多元逐步回归分析,其中同一位点的哑变量以进入方式同时进行分析。

3 结果和分析

3.1 69 份苦玄参种质的 SSR 遗传多样性 20 对引物在 69 份种质中的扩增结果见表 3,遗传多样性分析结果见表 4。共扩增出 76 个等位基因,每个位点 1~7 个,平均每个位点 3.8 个,有效等位基因 1.969 2 个,观测等位基因高于有效等位基因,表明等位基因分布不均匀,其中位点 P59 和 P72 获得最

多的等位基因;位点 P60 获得的等位基因数最少,呈单态。所有位点中,仅 P4 位点在一个样品中未扩增出产物,其余均有扩增;其中,平均多态位点 52.75 个,多态率 38.24%,而位点 P7, P52, P60 在 69 份种质中均呈纯合状态。从等位基因出现频率来看,稀有等位基因(频率 < 5%)占 38.2%,稀有基因较多。其中频率 < 1% 的占 17.11%,将近稀有基因的一半,只出现 1 次的基因有 4 个,分别出现在编号 zgb09 的 P21 位点,片段大小 86 bp;编号 xyj03 的 P59 位点,片段大小 260 bp;编号 hzp02 的 P69 位

表 2 20 对 SSR 引物的信息

Table 2 Information of 20 pairs of SSR primers

引物代码	正向引物	反向引物	重复单元(次数)	目的片段长度/bp
P4	TTCCAGATTCCATTTCTCTGC	TTGGAGCAACTTTCGATTGG	TC(7)	264
P7	CGGGCCACCTTTAGACAATA	TCGAATTCAAATCTCCCCTG	CAG(5)	221
P11	TTTAGGCTAATGCCGCTGTT	CAGATCCCCAAACCTCTTCA	GCT(3)	272
P21	AACTCTTCCACGGAGCGTTA	GGACGAGGAAAGACATGGAA	CTG(7)	100
P34	CCAATTTGGTTGTCCAATC	TAACTTCATGGGGGATCAGG	TATT(5)	185
P36	TTGTCTGCAAACGAAGGTTG	TTCTCTTCACTTTCTCTCG	TG(11)	229
P39	TGTTTCGGGCTTTTTATTGC	TGAAAGGGCTGATTACCGAG	TTC(6)	154
P43	AGGGAGAGATGGCTCATTCA	GAACAGCACCCTGCGATTA	AG(7)	120
P45	TGAATCACTCGCTTTCACG	GGTGGGACTTTGGTTGAGA	AG(9)	120
P52	GAGGTCCTGACCTTGTGA	TCAACAGCAGCAGCAGATT	TGC(9)	224
P59	ACCCGATTCAGACCCATTTT	TGAGACTTTTTGGTGGGGAG	ACG(5)	246
P60	GCAGTGAATGGAACAGCAGA	CCAGAGCTTCTCCCAACTG	ATG(10)	144
P61	GCAAGCAAAGAGTCACTCCC	ACATGTGGGTACTTGTGGCA	ACA(6)	170
P65	TTCTAATAGCAAAGGAGACGAA	GCTGCCTGCAAAAATCTACC	TACC(5)	169
P69	TCTCGCTTTTCTGTTTGGGT	GCAGGAAGTACCTTTGAGC	AT(6)	189
P72	CGAGGTGGTTCGAAACAAAT	GATCACTACCAGTCCGGGAT	TA(8)	118
P74	CTTCCACAGCTCAACAACCA	TCTCGGTATCTCGGTCAAC	CGC(7)	154
P77	CCGTCATGTTAAACGGGTC	GAGGTTGCGAATGATTGGAT	ATC(5)	166
P84	ACGCCACACATCCTACACAG	GGGAGATAAGCCAACACGAA	CAT(6)	189
P93	TGCGTTTTTGGTTTCATGTG	TCTCATTGCTGTCAAATCTTGC	AC(9)	185

点,片段大小 199 bp;编号 zgb05 的 P93 位点,片段大小 188 bp。稀有基因多,可为筛选变异位点提供更多机会。各位点多态信息含量(PIC)变化范围为 0~0.621 1,平均 0.378 0;Shannon 多态性信息指数(I)变化范围 0~1.240 1,平均 0.759,Nei's 基因多样性指数(Nei)变化范围 0~0.682 3,平均 0.440 9,其中最高的为 P21,最低为 P7;以上 3 个指标在不同位点间变化范围均较大,说明不同位点的遗传变异具有较大的差异。20 个位点中,观测杂合度变化范围 0~0.587,平均 0.382 4;期望杂合度变化范围 0~0.684 8,平均 0.442 5,不同位点杂合度存在较大差异。平均观测杂合度低于期望杂合度,说明种群内存在一定程度的近交率,杂合子缺失,纯合性较高。

3.2 种质间遗传分化及亲缘关系 为检测 SSR 位点遗传变异在各种质间和种质内的分布情况,根据 Nei's 提出的 F 统计量,分析苦玄参各种质的遗传变异程度以及基因流,结果见表 5。由表 5 可知,种质内的平均自交系数(Fis)为 -0.368 4,种质内杂合子表现为过量;整个群体的平均自交系数

(Fit)为 0.132 3,群体杂合子缺失;遗传分化系数 Fst 平均为 0.365 9,种质间遗传分化很大。基因流 Nm 平均为 0.433 2,且均 < 1,说明苦玄参种质间的基因流较缺乏,基因交换较少,导致种质间产生了较大的遗传分化。

对 69 份种质的遗传距离和遗传相似系数进行分析,结果见表 6。由表 6 可知,69 份种质的相似系数为 0.585 6~0.950 6,遗传距离为 0.050 6~0.532 5,不同种质间亲缘关系有较大差异。基于遗传距离对 69 份种质进行聚类分析,结果见图 1。从图 1 可以看出,种质间分群较连续,很难进行明显的分群,即便是分别来源于梧州和龙州的种质,均未能归入同一群体,两地苦玄参遗传距离很近,且栽培种质受人为干扰,生长条件较一致,其遗传分化仅来自于种群内的遗传分化,没受外界群体的影响,因此其种质间的遗传分化是一个连续变化的过程,较难进行明确的分群。

3.3 SSR 标记与品质性状的相关分析 对苦玄参主要药效物质苦玄参苷 IA 和 IB 的含量进行正态分布检测,正态分布检验 Q-Q 图见图 2。从图 2 可以

表 3 20 个 SSR 位点的遗传变异和杂合性

Table 3 Genetic variation and heterozygous of 20 SSR sites

引物	等位基因 /个	稀有基因/个		单基因 /个	扩增位点 /个	多态位点 /个	P/%	PIC
		(频率 5% ~1%)	(频率 <1%)					
P4	6	1	1		137	44	32	0.493 9
P7	2	1	0		138	0	0	0.054 7
P11	4	2	0		138	68	49	0.423 8
P21	5	0	1	1	138	81	59	0.621 1
P34	4	1	1		138	6	4	0.175 2
P36	4	1	1		138	12	9	0.268 7
P39	4	2	0		138	78	57	0.449 5
P43	2	0	0		138	54	39	0.297 7
P45	3	0	0		138	77	56	0.446 2
P52	2	0	0		138	0	0	0.252 7
P59	7	2	2	1	138	44	32	0.504 0
P60	1	0	0		138	0	0	单态
P61	5	1	1		138	81	59	0.581 4
P65	2	0	0		138	75	54	0.374 7
P69	4	0	1	1	138	80	58	0.535 0
P72	7	3	1		138	81	59	0.561 3
P74	4	0	1		138	81	59	0.518 8
P77	2	0	0		138	64	46	0.327 0
P84	3	0	1		138	67	49	0.377 8
P93	5	1	2	1	138	62	45	0.335 9

注:总位点均为 138。

看出,2 种药效物质均可认为呈正态分布,可对其与 SSR 分子标记进行相关分析。采用 SPSS 的 GLM 法对 SSR 标记与苦玄参苷 IA 和 IB 的含量的相关分析结果见表 7。由表 7 可知,与苦玄参苷 IA 和 IB 具有显著相关的标记各有 5 个,只有 1 个标记既与苦玄参苷 IA 的含量相关,也与苦玄参 IB 含量相关。其中与苦玄参苷 IA 相关联的位点有 P4, P11, P34, P59, P61, P34 位点的 AA 基因型(183/183), P45 的 AA 基因型(116/116), P59 位点的 AB 基因型(256/252)与苦玄参苷 IA 的含量呈极显著正相关, P34 位点的 BB 基因型(185/185), P61 位点的 AA 基因型(157/157)与苦玄参苷 IA 的含量呈显著负相关;与苦玄参苷 IB 相关联的位点有 P11, P21, P43, P45, P74, 与苦玄参苷 IB 关联的位点均为显著水平,未达到极显著水平。对关联 SSR 位点所在基因的功能进行预测, P4 位点主要与核苷酸运输与代谢有关, P11 位点与锌簇结构域有关, P43 位点为编码

未知功能蛋白, P59 位点与泛素水解酶的锌指蛋白有关, P74 位点与 WRKY 转录因子 7 有关, 其余几个位点所在基因的功能未知。根据对具有显著相关的标记进行多元逐步线性回归, 与相关分析结果一致, 所分析的标记均与 2 个性状具有显著相关, 其中, 各回归模型的决定系数见表 8。由表 8 可知, 与苦玄参苷 IA 进行回归的模型中, 以 5 个相关标记进行回归的决定系数最高, R^2 为 26.97%, 而与苦玄参苷 IB 进行回归的模型中, 则以 4 个相关标记进行回归的决定系数最高, R^2 为 15.81%, 但与 5 个标记进行回归的决定系数 ($R^2 = 15.22%$) 相差不大。

4 讨论

4.1 苦玄参栽培种质间的遗传多样性 本研究对课题组前期基于表型性状选择同一居群内的 69 份苦玄参种质进行 SSR 遗传多样性分析, 结果表明 69 份种质中, 不同位点间遗传多样性存在较大的差异,

表 4 20 个 SSR 位点的遗传变异和杂合性

Table4 Genetic variation and heterozygous of 20 SSR sites

基因位点	样本量	Na ¹⁾	Ne ¹⁾	I ¹⁾	Obs_Het	Exp_Het ¹⁾	Nei ²⁾	Ave_Het
P4	274	6	2.140 9	1.069 1	0.321 2	0.534 9	0.532 9	0.295 3
P7	276	2	1.059 6	0.131 2	0	0.056 5	0.056 3	0.029 0
P11	276	4	2.081 1	0.848 1	0.492 8	0.521 4	0.519 5	0.329 7
P21	276	5	3.148 0	1.240 1	0.587 0	0.684 8	0.682 3	0.478 3
P34	276	4	1.228 5	0.394 8	0.043 5	0.186 7	0.186 0	0.076 1
P36	276	4	1.408 8	0.573 8	0.087 0	0.291 2	0.290 2	0.170 3
P39	276	4	2.139 9	0.907 4	0.565 2	0.534 6	0.532 7	0.344 2
P43	276	2	1.572 1	0.550 1	0.391 3	0.365 2	0.363 9	0.257 2
P45	276	3	2.138 0	0.864 0	0.558 0	0.534 2	0.532 3	0.353 3
P52	276	2	1.421 8	0.473 1	0	0.297 8	0.296 7	0.152 2
P59	276	7	2.254 5	1.079 9	0.318 8	0.558 5	0.556 4	0.333 3
P60	276	1	1	0	0	0	0	0
P61	276	5	2.843 9	1.137 6	0.587 0	0.650 7	0.648 4	0.440 2
P65	276	2	1.997 4	0.692 5	0.543 5	0.501 2	0.499 3	0.338 8
P69	276	4	2.602 2	1.026 5	0.579 7	0.617 9	0.615 7	0.387 7
P72	276	7	2.541 9	1.199 1	0.587 0	0.608 8	0.606 6	0.371 4
P74	276	4	2.470 8	0.999 3	0.587 0	0.597 4	0.595 3	0.382 2
P77	276	2	1.699 8	0.602 0	0.463 8	0.413 2	0.411 7	0.286 2
P84	276	3	1.968 7	0.715 7	0.485 5	0.493 8	0.492 0	0.298 9
P93	276	5	1.666 4	0.674 8	0.449 3	0.401 4	0.399 9	0.268 1

注:Na. 观察等位基因数;Ne. 有效等位基因数;I. Shannon 信息指数;Obs_Het. 观测杂合度;Exp_Het. 预期杂合度;Nei. 基因多样性指数;Ave_Het. 平均杂合度。与基因位点比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

与课题组基于磁珠富集开发 SSR 引物所进行的遗传多样性分析结果一致^[14]。其中,观测等位基因数为有效等位基因的 2 倍,部分种质等位基因多达 7 个,部分种质呈单态,表明供试种质间等位基因分布极不均匀。稀有基因率较高,仅出现 1 次的基因数达 4 个,稀有基因多不利于基因多样性的稳定遗传,但可为筛选变异位点提供更多机会。从多态信息含量,Shannon 多态性信息指数,Nei's 基因多样性指数(Nei)来看,不同位点间变化范围均较大,表明不同位点的遗传变异具有较大的差异。从多态率分析结果可知,20 个位点多态率仅为 38.24%,其中有 3 个位点呈纯合状态;杂合子检测表明,该苦玄参居群内存在一定程度的近交率,69 份种质平均观测杂合度低于期望杂合度,其杂合子缺失,纯合性较高。供试种质为 1950 年代由野生种质驯化而来,具有 70 年的栽培历史,可能由于栽培环境单一,其遗传变异主要来自于种质内部的变异,受其他群体的影响较小,种质间近交率较高,致使群体内杂合子

缺失。

4.2 苦玄参栽培种质遗传分化及亲缘关系 供试种质为 2 个具有 70 年栽培历史的栽培种,其中广西梧州的苦玄参跟龙州栽培种质遗传分化小,亲缘关系近。由于人为干扰,供试种质基本处于一个较封闭的生长环境,与外界群体进行的基因交流较少,经多年的自交和近交,整个群体的纯合性较高,杂合子缺失。由于近交率的存在,各种质间基因流较小,致使群体内遗传分化较大。较大的遗传分化,对于良种选育具有重要的意义,可通过聚集更多优质的基因,为优良种质的选择和利用提供优质材料。由于供试种质有着共同的来源,且与外界缺少基因交换,各种质间的差异主要产生于居群内部基因的重组、突变等,因此整个群体内的遗传变异较为连续,各种质间遗传距离远近不一,但没有明显分界线,基于遗传距离进行聚类分析,很难把各种质归为某个明显的群体。

4.3 品质性状相关标记筛选 育种的本质是聚集

表 5 所有位点的 F 统计量和基因流

Table 5 F statistics and gene flow of 20 SSR sites

基因位点	样本量 / 个	群体内自交率	整个群体自交率	群体分化率	基因流
P4	274	-0.104 3	0.39	0.447 6	0.308 5
P7	276	1	1	0.485 1	0.265 4
P11	276	-0.494 5	0.051 5	0.365 3	0.434 4
P21	276	-0.227 3	0.139 8	0.299 1	0.585 9
P34	276	0.428 6	0.766 2	0.590 9	0.173 1
P36	276	0.489 4	0.700 3	0.413 1	0.355 1
P39	276	-0.642 1	-0.061 1	0.353 8	0.456 5
P43	276	-0.521 1	-0.075 3	0.293 1	0.603 0
P45	276	-0.579 5	-0.048 3	0.336 3	0.493 4
P52	276	1	1	0.487 1	0.263 3
P59	276	0.043 5	0.427 0	0.401 0	0.373 5
P60	276	-	-	0	-
P61	276	-0.333 3	0.094 7	0.321 0	0.528 7
P65	276	-0.604 3	-0.088 4	0.321 6	0.527 4
P69	276	-0.495 3	0.058 5	0.370 3	0.425 0
P72	276	-0.580 5	0.032 4	0.387 8	0.394 7
P74	276	-0.535 5	0.014 0	0.357 9	0.448 6
P77	276	-0.620 3	-0.126 5	0.304 7	0.570 4
P84	276	-0.624 2	0.013 3	0.392 5	0.386 9
P93	276	-0.675 7	-0.123 4	0.329 6	0.508 6

注:基因流 = 0.25(1 - 群体分化率) / 群体分化率。

表 6 种质遗传距离和遗传相似系数

Table 6 Genetic distance and genetic similarity coefficient of strains

种质	Wzhjx05	Zgb06	Zgb12	Hzp06
Wzhjx05	-	0.807 1	0.585 6	0.683 0
Zgb06	0.214 4	-	0.693 0	0.950 6
Zgb12	0.535 2	0.274 7	-	0.725 8
Hzp06	0.204 9	0.050 6	0.291 4	-

注:左下区域为遗传距离,右上区域为相似性系数(该表仅显示最大和最小值部分)。

更多的优良变异,即优良基因的聚集。分子标记辅助育种可以摆脱环境因素对表型的限制,利用分子标记与决定目标性状的基因连锁的特点,筛选与质量性状基因紧密连锁的分子标记用于辅助育种。目标性状的 QTL 定位主要通过基于基因连锁的遗传图谱的构建及基于连锁不平衡的全基因组关联分析进行定位。由于遗传图谱的构建需要构建遗传群体,且需要对物种的基因组进行全面地了解,对于没有参考基因组或基因信息较少的物种来说,较难实

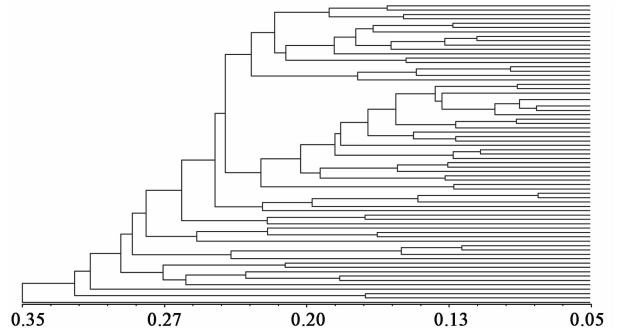
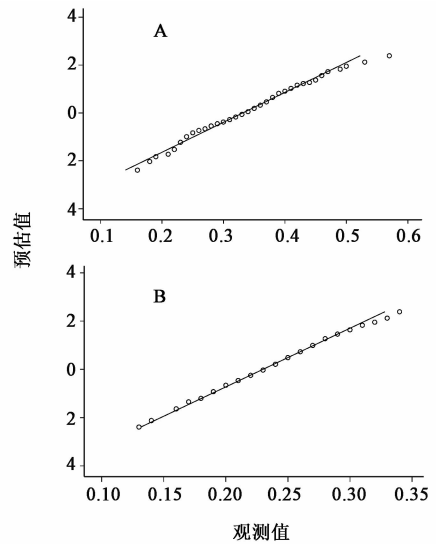


图 1 69 份苦玄参种质的聚类分析

Fig.1 Dendrogram for 69 strains



A. 苦玄参根 IA; B. 苦玄参根 IB

图 2 正态分布检验 Q-Q

Fig.2 Normal distribution Q-Q plot

现。全基因组关联分析需要进行全基因组测序,同样需要参考基因,对于物种基因信息较少的药用植物来说,也较难实现。相关分析通过检测目标性状与标记的显著相关性,筛选与目标性状相关联的标记,方法简单,不失为一种有效的手段。李丹阳等^[11]、胡宏霞等^[20]在花生、牛泓博等^[12]在菲律宾蛤仔、孙际佳等^[21]在翘嘴鳊的研究中,通过相关分析获得了与目标性状相关联的标记。本研究采用 SPSS 的 GLM 方法及多元逐步回归方法,获得 9 个与苦玄参品质性状相关联的标记。本研究所筛选出的与苦玄参苷含量相关联的 SSR 标记中,有 4 个与基于转录组序列筛选出的与苦玄参苷含量相关联的 SSR 分子标记相同,表明通过相关分析筛选出的关联标记,具有一定的可信度,且较 QTL 定位及全基因组关联分析,方法简单、成本低,对于基因信息缺乏的物种,不失为一种较好的筛选关联标记的方法。

表 7 品质性状相关 SSR 标记及功能

Table 7 SSR markers related with quality traits and function prediction

位点	相关性状	基因型	相关系数	片段大小/bp	重复基元	功能
P4	苦玄参苷 IA	BC	0.203 ¹⁾	265/269	(TC)7	核苷酸运
		AC	0.232 ¹⁾	271/269		输和代谢
P11	苦玄参苷 IA	AB	0.218 ¹⁾	264/273	(GCT)3	锌簇结构域
		苦玄参苷 IB	AA	0.189 ¹⁾	264/264	
P21	苦玄参苷 IB	AD	0.185 ¹⁾	94/84	(CTG)7	未知
P34	苦玄参苷 IA	AA	0.316 ²⁾	183/183	(TATT)5	未知
		BB	-0.262 ²⁾	185/185		
P43	苦玄参苷 IB	AA	-0.183 ¹⁾	116/116	(AG)7	编码未知 功能蛋白
P45	苦玄参苷 IB	AA	0.351 ²⁾	116/116	(AG)9	未知
		AB	-0.202 ¹⁾	116/112		
P59	苦玄参苷 IA	CD	-0.225 ¹⁾	254/250	(ACG)5	锌指蛋白(泛素水解酶)
		AB	0.267 ²⁾	256/252		
P61	苦玄参苷 IA	AA	-0.260 ²⁾	157/157	(ACA)6	未知
P74	苦玄参苷 IB	AB	-0.192 ¹⁾	150/150	(CGC)7	WRKY 转 录因子 7

注:基因位点与苦玄参含量相关性¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 8 SSR 标记与品质性状的多元回归分析

Table 8 Multiple regression analysis between SSR and quality traits

性状	SSR 标记	模型	决定系数/%
苦玄参苷 IA	P4/P11/P34/P59	4	22.95
	P4/P11/P34/P59/P61	5	26.97
苦玄参苷 IB	P11/P21/P43/P45	4	15.81
	P11/P21/P43/P45/P74	5	15.22

本研究 69 份苦玄参种质间有效等位基因数,观察等位基因数,Shannon 信息指数,总体期望杂合度,观察杂合度及多态率均具有明显差异。等位基因在群体中分布不均匀,稀有基因率较高。各种质间遗传分化较大,种质间基因流较小;遗传距离较连续,很难进行明显的分群。从供试的 20 个 SSR 标记中,筛选出 9 个与苦玄参苷含量相关联的标记位点。试验结果可为苦玄参遗传多样性、遗传进化关系及优良种质筛选等提供参考和依据。

[参考文献]

[1] 丘琴,苏春妹,甄汉深,等.不同生产期苦玄参中苦玄参苷 IA 含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):108-110.
[2] 邓鑫,陆彦蓉,覃兰迁,等.复方苦玄参颗粒急性毒性

和亚慢性毒性试验[J].南方农业学报,2018,49(9):1873-1879.
[3] 潘翠柳,韦一飞,甄汉深,等.苦玄参生药学与质量分析的研究进展[J].广州化工,2016,44(14):10-11.
[4] 林伟国,黄海连,黄宇声.苦玄参规范化栽培技术操作规程[J].现代农业科技,2014(12):92-93,95.
[5] 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.
[6] CHEN S, XU C G, LIN X H, et al. Improving bacterial blight resistance of 6078, an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection [J]. Plant Breeding, 2010, 120(2): 133-137.
[7] WANG C R, CHEN S, YU S B. Functional markers developed from multiple loci in GS3 for fine marker-assisted selection of grain length in rice [J]. TAG, 2011, 122(5): 905-917.
[8] Lavaud C, Baviere M, Roy G L, et al. Single and multiple resistance QTL delay symptom appearance and slow down root colonization by *Aphanomyces euteiches* in pea near isogenic lines [J]. BMC Plant Biol, 2016, 16(1): 166.
[9] LIU D X, ZHANG J, LIU X Y, et al. Fine mapping and RNA-Seq unravels candidate genes for a major QTL controlling multiple fiber quality traits at the T₁ region in

- upland cotton[J]. *BMC Genomics*,2016,17(1):295.
- [10] GUO Z F, LIU G Z, Röder M S, et al. Genome-wide association analyses of plant growth traits during the stem elongation phase in wheat[J]. *Plant Biotechnol J*,2018,16(12):2042-2052.
- [11] 李丹阳,刘凯歌,卢济明,等.花生 SSR 标记与品质性状的相关分析[J]. *分子植物育种*,2017,15(7):2695-2701.
- [12] 牛泓博,聂鸿涛,朱德鹏,等.菲律宾蛤仔 EST_SSR 标记与生长性状的相关分析[J]. *生态学报*,2015,35(6):1910-1916.
- [13] 左力辉,张文林,邱彤,等.新疆野苹果叶形性状变异及其与 SSR 标记关联分析[J]. *园艺学报*,2015,42(4):759-768.
- [14] 谢阳姣,李耀燕,闫国跃,等.苦玄参育种材料遗传多样性 SSR 分析[J]. *南方农业学报*,2017,48(1):20-25.
- [15] 余文霞,雷胃熙,袁媛,等.铁皮石斛种质资源 DNA 身份证的构建及遗传相似性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*,2019,25(1):16-21.
- [16] 王家,周天华.山白树微卫星特征分析及分子标记开发[J]. *中国实验方剂学杂志*,2019,25(3):143-150.
- [17] 曹玲亚,谷聪,孙海峰,等.基于 SSR 标记的党参属部分药用植物的遗传多样性和遗传结构评价[J]. *中国实验方剂学杂志*,2018,24(24):45-52.
- [18] HUANG L, HE H Y, CHEN W G, et al. Quantitative trait locus analysis of agronomic and quality-related traits in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Theor Appl Genet*,2015,128(6):1103-1115.
- [19] Taeprayoon P, Tanya P, Sukha L, et al. Genetic background of three commercial oil palm breeding populations in Thailand revealed by SSR markers [J]. *Australian J Crop Sci*,2015,9(4):281-288.
- [20] 胡宏霞,穆国俊,侯名语,等.河北省花生地方品种基于 EST-SSR 的遗传多样性及性状-标记相关分析[J]. *植物遗传资源学报*,2013,14(6):1118-1123.
- [21] 孙际佳,李桂峰,刘丽,等.翘嘴鲈微卫星标记及其与主要经济性状的关联分析[J]. *水产学杂志*,2017,30(1):11-18.

[责任编辑 顾雪竹]