

# 基于叶绿体 SSR 分子标记的苦参种质资源遗传多样性分析

宋芸<sup>1,2</sup> 张鑫瑞<sup>1</sup> 贺嘉欣<sup>1</sup> 李政<sup>1</sup> 孙哲<sup>1</sup> 李澳旋<sup>1</sup> 乔永刚<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>山西农业大学生命科学学院, 030801, 山西晋中; <sup>2</sup>中兽医现代化山西省重点实验室, 030801, 山西晋中)

**摘要** 以来自 15 个不同产地的 150 份苦参为材料, 采用 cpSSR 分子标记技术探究不同产地苦参种质资源的遗传多样性。结果表明, 18 对 cpSSR 引物共扩增出 311 个条带, 检测出 97.47 个等位基因, 平均每对 cpSSR 引物扩增出 17.28 个条带。平均检测到的等位基因数 ( $N_a$ ) 为 5.415, 有效等位基因数 ( $N_e$ ) 为 4.395, Shannon's 信息指数 ( $I$ ) 为 1.535, 多样性指数 ( $h$ ) 为 0.748, 无偏多样性指数 ( $uh$ ) 为 0.832, 多态信息含量 ( $PIC$ ) 为 0.886,  $PIC > 0.5$  说明 18 对 cpSSR 引物具有较高的多态性。不同产地的苦参遗传多样性丰富, 其中山西武乡土河坪种质 (THP) 的  $I$  为 1.600,  $N_e$  为 4.786, 其他遗传多样性指数均较大, 是遗传多样性较丰富的苦参产地。居群分子方差分析 (AMOVA) 表明, 苦参种质内个体间差异大, 苦参种质内遗传变异率大于种质间的。聚类分析、主坐标分析 (PCoA) 和 STRUCTURE 软件进行的遗传结构分析结果均将不同产地的苦参分为 2 个类群, 并且分类结果有明显的地理相关性。第 1 类群中的 9 个苦参种质主要来自山西、河北、陕西和内蒙古等地, 第 2 类群主要来自山东、河南、江苏以及安徽等地。18 对 cpSSR 引物在苦参内具有很好的适用性。苦参种质资源的遗传多样性研究为发掘、利用与保护苦参种质资源以及优良品种的选育提供一定的理论基础。

**关键词** 苦参; 叶绿体分子标记; 遗传多样性; 种质资源

苦参 (*Sophora flavescens* Ait.) 为豆科槐属 (*Sophora*) 多年生落叶亚灌木或多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 以根入药, 味苦性寒, 有抑菌、抗病毒和抗肿瘤等多种药理活性<sup>[2-3]</sup>。苦参作为一种具有广泛应用价值的药用植物, 其生产和栽培备受重视。目前, 人工栽培苦参技术已经广泛投入种植和生产中。但各地对苦参资源的开发利用和应用范围存在较大差异, 人工栽培技术也存在较大的问题, 对苦参种质资源和重要农艺性状的相关基础研究较少, 致使育种进程缓慢, 产量与品质不佳。为解决这一问题, 急需对苦参种质资源进行收集和研究, 并从中选择优质和可高效利用的种质资源, 用于苦参大规模的人工栽培, 以满足市场对苦参的需求。

种质资源遗传多样性可通过表型性状或者分子标记等多种方法进行评价, 但是表型性状极易受到外界环境的影响, 从而导致分析结果缺乏稳定性<sup>[4]</sup>。分子标记可以在 DNA 水平上揭示植物的遗传变异, 是一种稳定可靠的遗传分析方法<sup>[5]</sup>。简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 分子标记是一种建立在 DNA 序列多态性基础上的遗传标记, 是在 DNA 分子水平上遗传多态性的直接反映,

具有重复性好、多态性高及稳定性强等优点, 是育种研究中重要的遗传标记方法之一<sup>[6]</sup>, 广泛用于药用植物品种图谱构建、种质资源评价与鉴定、种群遗传多样性分析、基因组作图、基因定位、辅助育种和亲缘关系鉴定等领域, 也是分子系统学的重要研究手段<sup>[7-9]</sup>。

近年来, 随着测序技术的不断发展, 对叶绿体基因组的研究更加深入, 并且取得了长足的进展。叶绿体基因组的结构较核基因组简单, 筛选低拷贝的基因较容易, 高度保守, 母系遗传, 不会受基因重组的干扰<sup>[10]</sup>, 进化路线相对独立, 它在植物遗传多样性<sup>[11]</sup>、系统发育与进化<sup>[12]</sup>、物种鉴定及分类学等研究中应用广泛<sup>[13-14]</sup>。如今有很多分子标记技术 (如 SSR、SNP 和 InDel 等) 都被运用到叶绿体 DNA 的研究上, 形成了基于叶绿体基因组开发的、广泛应用于植物的分子标记技术<sup>[15-16]</sup>。叶绿体 SSR (chloroplast simple sequence repeat, cpSSR) 分子标记是其中应用较为广泛的一种。cpSSR 具有 SSR 分子标记技术重复性好、多态性高和稳定性强的优点, 同时兼有叶绿体基因组高度保守、单亲遗传、进化相对独立及对 DNA 样品质量要求不高等优

作者简介: 宋芸, 主要从事药用植物遗传多样性分析以及中药资源与开发研究, E-mail: songyun0283@126.com

乔永刚为通信作者, 主要从事药用植物遗传多样性分析以及中药资源与开发研究, E-mail: sxndqyg@126.com

基金项目: 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金 (2021-11)

收稿日期: 2021-08-23; 修回日期: 2021-10-22; 网络出版日期: 2022-07-13

点<sup>[17-19]</sup>。目前 cpSSR 已被广泛应用到植物种群遗传多样性<sup>[20]</sup>、种群结构分析<sup>[21]</sup>、种群分类<sup>[22]</sup>和系统地理分布<sup>[23]</sup>等方面研究。因此本试验基于本课题组报道的苦参叶绿体基因组开发 cpSSR 分子标记,为苦参种质资源提供鉴定方法,为优异种质资源的有效利用以及突破性新品种和新材料的创制提供材料基础。

本试验以收集到的 150 份苦参种质资源为材料,并利用前期叶绿体基因组研究中开发的 cpSSR 标记为基础,对 150 份苦参种质材料进行遗传结构和多样性分析,以期为苦参种质资源利用及优良品种选育等提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 种质材料与 DNA 提取

试验所选材料为 150 份苦参,于山西、河北、江苏和内蒙古等 9 个省区的 15 个产地收集的种子,产地详情见表 1,并于 2017 年种植于山西农业大学生命科学院试验田。于 2019 年 7 月获取苦参材料,每个产地均随机选取 10 株,用无水乙醇擦拭干净新鲜叶片表面,晾干后采集其幼嫩叶片于自封袋,采用改良的 CTAB 法<sup>[24]</sup>对苦参基因组 DNA 进行提取,并对 DNA 浓度和质量进行检测,提取后的 DNA 置于-20℃保存备用。

表 1 苦参的来源信息  
Table 1 Source information of *S. flavescens*

种质 Germplasm	来源 Source	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Altitude (m)	样本量 Sample
HD	河北省邯郸市	114°03'~114°40'	36°20'~36°44'	1899	10
THP	山西省武乡县土河坪村	112°26'~113°22'	36°39'~37°08'	1069	10
XHD	山西省武乡县西河底镇	112°26'~113°22'	36°39'~37°08'	1069	10
AG	河北省安国市	115°33'	38°42'	32	10
WGS	山西省长治市五谷山村	113°01'~113°40'	35°50'~37°08'	976	10
CF	内蒙古赤峰市	116°21'~120°58'	41°17'~45°24'	1000	10
TG	山西省太谷区	112°28'~113°01'	37°03'~37°12'	808	10
BJ	陕西省宝鸡市	106°18'~108°03'	33°35'~35°06'	618	10
YL	陕西省榆林市	109°77'	38°03'	1000	10
PY	山东省平邑县	117°37'	35°30'	146	10
LY	山东省临沂市	117°24'~119°11'	34°22'~36°13'	88	10
LNJZ	辽宁省锦州市	121°51'	41°31'	23	10
BZ	安徽省亳州市	115°53'~116°49'	32°51'~35°05'	35	10
SY	江苏省沭阳县	118°30'~119°10'	33°53'~34°25'	5	10
HNJZ	河南省焦作市	113°26'~113°40'	35°10'~35°21'	91	10

1.2 苦参叶绿体基因组 SSR 引物筛选

本试验所选 cpSSR 来自于本课题组所报道的苦参叶绿体基因组 (GeneBank 登录号: MN205931)<sup>[25]</sup>,根据 MISA 软件<sup>[26]</sup>开发出的 104 个 cpSSR 位点的分布情况随机选择其中的 18 个 cpSSR 位点,用于后续分析,并根据 18 个 cpSSR 位点利用 Primer 5 设计引物,引物具体信息见表 2。

1.3 目的产物的扩增及检测

对提取的苦参 DNA 样品进行稀释,统一稀释为 100ng/μL 浓度,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系 10μL,其中苦参 DNA 模板 1μL,2×Es Taq MasterMix 5μL,正向引物 0.5μL,反向引物 0.5μL,ddH<sub>2</sub>O 3μL。PCR 扩增反应程序参数为 94℃预变性 2min; 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 共 32 个循环; 最后 72℃终延伸 2min 确保扩增完整。PCR

扩增结束后,检测 PCR 产物的完整性、质量和浓度,产物于 4℃保存备用。

1.4 苦参叶绿体基因组 SSR 的毛细管电泳分析

将 PCR 产物浓度稀释到 0~50ng/μL 范围内,利用岛津 DNA/RNA 分析专用微芯片电泳仪 MCE-202 MultiNA 进行毛细管电泳分析。电泳结果在 MultiNA Viewer 软件中进行可视化处理,从中获得每个产物的条带片段大小,并进行统计。

1.5 SSR 数据统计

利用 GenAlEx 6.503<sup>[27]</sup>对 18 对 cpSSR 引物和 150 份苦参种质资源的遗传多样性和遗传分化进行分析,获得遗传多样性指数: 等位基因数 (number of allele,  $N_a$ )、有效等位基因数 (number of effective aelle,  $N_e$ )、Shannon's 信息指数 (shannon's information index,  $I$ )、多样性指数 (diversity index,

表 2 cpSSR 引物信息  
Table 2 Information of cpSSR primer

引物名称 Primer name	正向序列 Forward sequence (5'-3')	反向序列 Reverse sequence (5'-3')	产物长度 Product length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
KS1	AAACCGACACGGATTACTCG	CCCAATGTACCCTGATACGG	271	54.8
KS2	CCCCCAATCCTTCTTTGATT	ATTGGCTGTTTCGTCAATTCC	227	52.1
KS3	ATGAGGTTGTGAATCCGAGG	CGATTTCGATAAACGGCTCAT	246	54.5
KS4	ACAGGATTTGAACCCGTGAC	CCTTCCTTATAATTTCATATCCTTCC	223	55.2
KS5	ACCTTCCCGGAGACTGAACT	AAAGCTTTTGTTTCGGCTCA	276	58.2
KS6	TCCAATAACCATCCTTCCCTT	GAGTTTTTCACACCGGAAAGC	213	52.9
KS7	ACTCCTTTGATGGGTGTTGC	ACAAAGAAATTCCACGGTCG	228	55.5
KS8	GGAGCACGGAATATCGAAAA	CCAGAACCACGATGATTGAA	194	52.3
KS9	AACAGGCTCCGTAAGATCCA	CATCTCAGACCTTGCGATTG	268	55.7
KS10	GCCTACGGATCAATCGACAT	TGACCACGAAAGTCAAAATGA	229	54.5
KS11	TTTTCACCTCATACGGCTCC	TGGTTATATATGGATTGCTAAAATTG	225	54.7
KS12	TTGATGCCTTGATCGAATGA	TGAGCCAGGATCGAACTCTC	229	51.1
KS13	GAATCGACAGATCCACCGAC	GAATCGACAGATCCACCGAC	250	55.6
KS14	TGAACTAATTGATTGATTATTTCCA	TTTGGAAGTCCCATCCAACT	206	47.9
KS15	TCAAGGGGTTCACAAACA	ATTCTCGGTTGACAGGGTTG	145	53.6
KS16	AGAAGATTAAGGAACCCCG	GCATGAAACAACTCGAAGCA	245	54.0
KS17	CCGTGGGACTTAAGGAATGA	CTCAAAGCAAAGCCAAGGAG	246	54.2
KS18	GGGGGAAACGGATACTCAAT	TTCTTCTGCAGTACCTCGCC	270	54.3

*h*) 和无偏多样性指数 (unbiased diversity index, *uh*) ; 利用 GenAlEx 6.503 进行居群分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA), 分析种质内和种质间的遗传变异分布, 并对 150 份苦参材料进行主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA), 进一步评估和聚类。利用 Power Marker 软件<sup>[28]</sup>分析 SSR 位点的多态信息含量 (polymorphic information content, *PIC*), 计算 150 个苦参个体间的 Nei's 遗传距离, 并基于 Nei's 遗传距离在 MEGA X<sup>[29]</sup>构建 UPGMA 聚类树<sup>[30]</sup>。利用 STRUCTURE V2.3.4 软件<sup>[31]</sup>分析群体遗传结构, 推测最佳群体数目, 其中将群体数目 (*K*) 设为 1~10, 对每个 *K* 值模拟运算 10 次, MCMC 值分别设为 10 000 和 100 000 次, 将分析结果转入在线网站 Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) 预测确定最佳群体数<sup>[32]</sup>。

2 结果与分析

2.1 苦参基因组 DNA 扩增产物多态性分析

以 150 份不同苦参 DNA 为模板, 利用 18 对 cpSSR 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物统一进行稀释, 之后进行毛细管电泳检测, 利用 MultiNA Viewer 软件对运行结果进行分析, 记录每个条带大

小, 第 1 次未检测到相应结果的进行第 2 次补充试验, 确保结果准确可靠。试验扩增结果如表 3 所示, 18 对 cpSSR 引物共扩增出 311 个条带, 各个引物扩增条带数的范围是 9~26, 平均每个引物的扩增条带数为 17.28。其中, 引物 KS5 扩增出的条带数最多, 共 26 个, 而引物 KS17 扩增条带数最少, 共 9 个。综合分析, 18 对 cpSSR 引物的特异性、多态性以及扩增效率均表现良好。

2.2 苦参 cpSSR 引物遗传多样性分析

表 4 表明, 18 对引物的 *PIC* 值范围在 0.803~0.940, 表明这 18 对 cpSSR 引物表现高度多态性。其中 *PIC* 最小的为引物 KS2, 最高的为引物 KS10。所有引物的 *N<sub>a</sub>* 为 3.667 (KS15) ~6.400 (KS1), *N<sub>a</sub>* 越大表明引物的多态性越丰富, 引物 KS1 的多态性最丰富, 引物 KS6、KS7 和 KS10 的多态性仅次于 KS1; *N<sub>e</sub>* 在 2.887 (KS15) ~5.320 (KS10); *I* 范围为 1.120 (KS15) ~1.739 (KS1); *h* 范围为 0.620 (KS15) ~0.807 (KS6), 而所有引物 *uh* 的范围为 0.691 (KS15) ~0.898 (KS6)。以上多个遗传多样性信息结果表明, 本试验所用的 18 对 cpSSR 引物具有高度多态性, 同时, 综合多个遗传多样性指数的结果可发现, 引物 KS15 的多态性最低, 而引物 KS1、KS6 和 KS10 的多态性较高。

表 3 cpSSR 扩增条带大小信息  
Table 3 Size information of cpSSR amplified band

引物名称 Primer name	扩增条带数 Number of amplified bands	扩增条带大小 Amplified band size (bp)
KS1	22	244、247、248、249、250、251、253、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、276、278
KS2	11	224、225、226、227、228、229、230、231、236、237、238
KS3	17	240、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257
KS4	25	205、206、207、208、209、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、231、233、234、235、236、237
KS5	26	250、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281
KS6	13	207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219
KS7	18	218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、236
KS8	24	197、198、199、200、287、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、305、306、307、308、309、310、311、312、313
KS9	17	256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272
KS10	25	202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226
KS11	15	190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、220、221、222、223、224
KS12	12	227、228、229、230、231、232、233、234、235、237、238、239
KS13	13	251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、264
KS14	18	197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、215
KS15	22	128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、169、170、172
KS16	13	238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250
KS17	9	242、243、244、245、246、247、248、249、250
KS18	11	268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278
总数 Total	311	
平均 Mean	17.28	

表 4 苦参 cpSSR 位点的遗传多样性 Table 4 Genetic diversity of cpSSR loci in <i>S.flavescens</i>						
引物名称 Primer name	$N_a$	$N_e$	$I$	$h$	$uh$	$PIC$
KS1	6.400	5.308	1.739	0.801	0.890	0.915
KS2	4.200	3.405	1.281	0.685	0.761	0.803
KS3	5.867	4.639	1.625	0.773	0.860	0.890
KS4	6.200	5.155	1.690	0.787	0.874	0.917
KS5	6.000	5.093	1.625	0.749	0.833	0.931
KS6	6.267	5.290	1.738	0.807	0.898	0.897
KS7	6.267	5.112	1.712	0.793	0.881	0.888
KS8	5.133	4.040	1.483	0.737	0.819	0.921
KS9	5.067	4.041	1.462	0.731	0.812	0.907
KS10	6.267	5.320	1.730	0.804	0.893	0.940
KS11	4.133	3.203	1.259	0.675	0.750	0.837
KS12	4.667	3.546	1.356	0.698	0.777	0.825
KS13	5.467	4.432	1.559	0.761	0.846	0.858
KS14	5.467	4.281	1.538	0.748	0.831	0.898
KS15	3.667	2.887	1.120	0.620	0.691	0.928
KS16	5.333	4.248	1.532	0.753	0.840	0.862
KS17	5.267	4.181	1.526	0.755	0.840	0.860
KS18	5.800	4.936	1.663	0.793	0.881	0.875
平均 Mean	5.415	4.395	1.535	0.748	0.832	0.886

2.3 不同种质苦参遗传多样性分析

利用 GenAlEx 6.503 软件对苦参种质进行遗传多样性分析，结果如表 5 所示，不同种质苦参的遗

表 5 15 个不同种质苦参的遗传多样性 Table 5 Genetic diversity of 15 different germplasms of <i>S.flavescens</i>						
种质 Germplasm	$N_a$	$N_e$	$I$	$h$	$uh$	
HD	5.500	4.542	1.567	0.761	0.874	
THP	5.667	4.786	1.600	0.769	0.855	
XHD	5.167	4.096	1.470	0.726	0.806	
AG	5.000	3.872	1.426	0.714	0.794	
WGS	5.167	4.076	1.483	0.737	0.819	
CF	5.444	4.387	1.556	0.759	0.844	
TG	5.500	4.540	1.566	0.761	0.847	
BJ	5.833	4.629	1.591	0.753	0.839	
YL	5.556	4.573	1.565	0.754	0.838	
PY	5.333	4.385	1.542	0.759	0.843	
LY	5.278	4.329	1.502	0.739	0.823	
LNJZ	5.556	4.580	1.584	0.768	0.853	
BZ	5.278	4.421	1.475	0.713	0.793	
SY	5.500	4.405	1.552	0.753	0.837	
HNJZ	5.444	4.310	1.555	0.760	0.845	
平均 Mean	5.415	4.395	1.535	0.748	0.832	

传多样性存在差异,  $N_a$  平均值为 5.415;  $N_e$  平均值为 4.395,  $N_e$  最高的种质为山西武乡土河坪村 (THP);  $I$  值最高的种质为山西武乡土河坪村 (THP), 最低的为河北安国 (AG), 分别是 1.600 和 1.426;  $h$  表明 15 个种质中山西武乡土河坪村 (THP) 的多样性最高, 为 0.769, 而安徽亳州 (BZ) 的多样性最低, 为 0.713; 所有种质的  $uh$  最高是河北邯郸 (HD), 为 0.874, 山西武乡土河坪村 (THP) 的  $uh$  次之, 为 0.855。由以上多个遗传多

样性参数可以看出, 150 份不同种质苦参均具有较高的遗传多样性, 其中山西武乡土河坪村 (THP) 的种质遗传多样性参数值表现较高, 表明该种质苦参的遗传多样性更加丰富。

2.4 不同种质苦参 AMOVA 分析

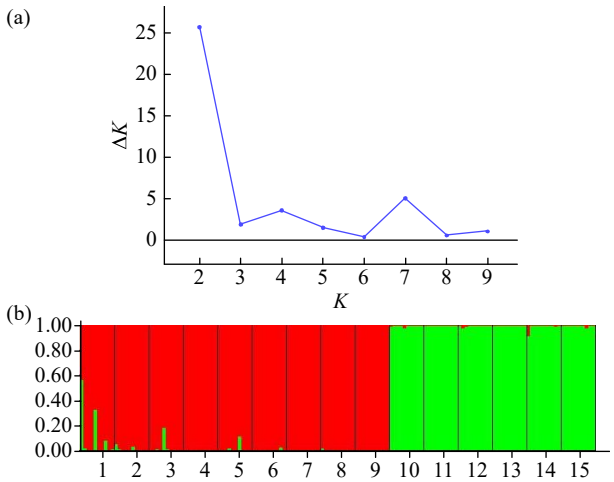
如表 6 所示, 15 个种质间的遗传变异率为 8%, 种质内的遗传变异率为 92%, 种质内的遗传变异远大于种质间, 表明 15 个苦参种质资源的遗传变异主要发生在种质内。

表 6 苦参种质 AMOVA 分析  
Table 6 AMOVA of *S. flavescens* germplasms

项目 Item	自由度 <i>df</i>	平方和 SS	均方 MS	估计方差 Estimated variance	遗传变异率 Genetic variation rate (%)
种质间 Inter germplasms	14	785.573	56.112	2.611	8
种质内 Within germplasms	135	4049.900	29.999	29.999	92
总计 Total	149	4835.473	—	32.610	100

2.5 不同种质苦参遗传结构分析

由图 1a 可知, 15 个苦参种质的最佳分组数  $K=2$ , 表明 15 个种质被分为 2 组。根据图 1b 可知, 种质 1 (HD) ~9 (YL) 被分为一类 (群体 1, 红色), 种质 10 (PY) ~15 (HNJZ) 被聚为另一类 (群体 2, 绿色), 其中群体 1 包括的种质有河北 (邯郸和安国)、山西 (武乡土河坪、西河底、长治五谷山和太谷)、内蒙古 (赤峰) 和陕西 (宝鸡和榆林), 群体 2 包含的种质有山东 (平邑和临沂)、安徽 (亳州)、江苏 (沭阳)、河南 (焦作) 和辽宁 (锦州)。



(a): 不同  $K$  值 (2~10) 对应的  $\Delta K$  的关系图, (b):  $K=2$ , 苦参种质资源的遗传结构  
(a): Estimation number of populations for  $K$  ranging (2-10) by  $\Delta K$  values, (b):  $K=2$ , genetic structure of *S. flavescens* germplasms

图 1 15 个苦参种质的遗传结构分析

Fig.1 Genetic structure analysis of 15 *S. flavescens* germplasms

2.6 不同种质苦参 PCoA 分析

为进一步研究苦参 15 个种质间的遗传相似性及差异性, 并将其结果进行可视化, 利用 GenAlEx 6.503 软件依据苦参种质的 Nei's 遗传距离进行 PCoA 分析。结果显示, 变异率贡献最高的 3 个特征值分别占总变异率的 4.90%、3.55%和 3.11%。根据分析结果绘制二维坐标图, 从图 2 可知, 150 份苦参材料被划分为 2 个区域, 表明 150 份苦参材料被分为 2 大类群, 这与 STRUCTURE 软件的群体预测结果一致。

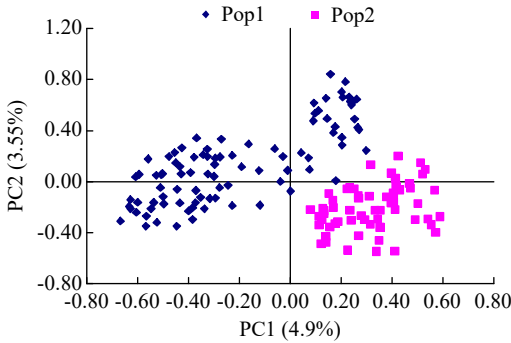


图 2 15 个苦参种质 PCoA 分析  
Fig.2 PCoA of 15 *S. flavescens* germplasms

2.7 基于 Nei's 遗传距离对不同苦参种质的聚类分析

如图 3 所示, 15 个种质的苦参被聚为 2 大类, 其中来自江苏沭阳 (SY)、河南焦作 (HNJZ)、山东平邑 (PY)、山东临沂 (LY)、辽宁锦州 (LNJZ) 和安徽亳州 (BZ) 的 6 个种质被聚为一类, 剩余 9

个种质被聚为另一类。UPGMA 聚类结果与 STRUCTURE 软件预测群体结构和 PCoA 的结果一致。

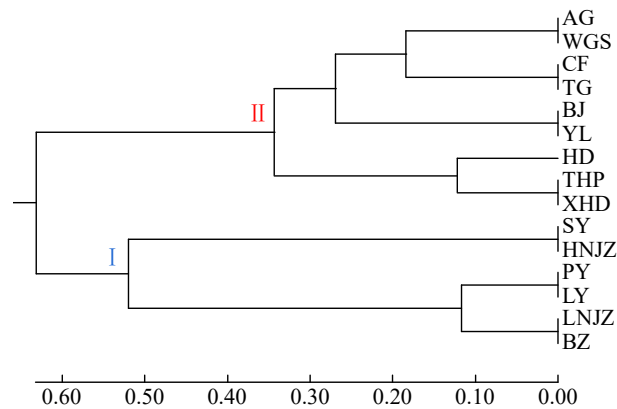


图 3 基于 Nei's 遗传距离的 15 个苦参种质 UPGMA 的聚类结果

Fig.3 UPGMA clustering results of 15 *S. flavescens* germplasms based on Nei's genetic distance

### 3 讨论

cpSSR 作为一种分子标记,既具有 SSR 高突变性的特点,同时具有叶绿体基因组单系遗传、几乎不发生重组的优点,随着叶绿体基因组的发展被广泛研究,目前主要应用于植物的遗传多样性、抗性新品种选育、物种进化及谱系研究等方面<sup>[33]</sup>。近年来,越来越多植物的 cpSSR 分子标记被开发利用。魏潇等<sup>[34]</sup>利用设计开发出的 9 对 cpSSR 引物对杏的起源和不同品种间的进化关系进行研究,发现杏在演化过程中发生了较多的适应性变异。Yan 等<sup>[35]</sup>利用水松的叶绿体基因组开发出 10 个具有多态性和遗传多样性表征的 cpSSR 位点,有助于水松及其近缘物种的种群遗传和系统地理分析。李祥栋等<sup>[36]</sup>基于薏苡叶绿体基因组筛选出 33 对多态性 cpSSR 引物,对 93 份薏苡属资源的遗传多样性、群体结构和亲缘关系进行了研究。本试验从苦参叶绿体基因组开发的 SSR 位点中筛选并设计出 18 对 cpSSR 标记引物,18 对引物在 150 份苦参材料中均可扩增出清晰明亮的条带,重复性良好,且扩增效率高。多态性信息含量是反映分子标记能力的一个重要参数,如果该标记的 *PIC* 值大于 0.5,则是高度多态的,18 对 cpSSR 的 *PIC* 值均大于 0.5,证明基于苦参叶绿体基因组开发的 cpSSR 引物在苦参种质中具有一定的通用性,可用于后续遗传结构和多样性分析。

叶绿体 SSR 分子标记技术是将 SSR 和 cpDNA

优点相结合的新型技术,不仅具有重复性好、多态性高和显性遗传的特点,还由于叶绿体单亲保守遗传和较慢的进化过程更有可能检测到遗传变异。本试验基于叶绿体单倍型对 18 对 cpSSR 引物和 150 份苦参材料进行遗传多样性分析,结果表明,18 对 cpSSR 引物共扩增出 311 个条带,平均每对引物扩增条带数为 17.28。段永红等<sup>[37]</sup>基于苦参的 EST 序列开发出的 18 对 EST-SSR 共扩增出 77 个条带,平均每对引物可扩增出 4.3 个条带,说明基于叶绿体基因组所开发出的 cpSSR 具有更高的多态性,且更易检测到种质资源丰富的遗传变异。对苦参种质的遗传多样性研究结果表明,15 个种质的苦参均具有较高的遗传多样性,其中来自山西武乡土河坪村(THP)的种质通过多个参数综合分析表现出最高的遗传多样性,说明山西武乡土河坪(THP)的苦参种质具有丰富的遗传变异,适应环境变化的能力强于其他种质,具有较高的进化潜力,后续可将该种质作为优良种质进行进一步研究。

群体遗传结构与整个群体的起源进化、自然分布及物种的生活特性等有很大关系,其在一定程度上可反映物种的遗传分化。通过 STRUCTURE 软件对苦参群体结构预测以及基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类分析和 PCoA 等结果表明,15 个苦参种质可分为 2 大类群,第 1 群体主要为山西、陕西、河北和内蒙古的种质,第 2 群体主要包括山东、安徽、河南、江苏和辽宁等地的种质,表明苦参栽培种质与其地理来源分布具有一定的相关性,表现出南北差异性。但是第 2 群体中还包括了辽宁产地,这可能是由于实验室所收集的部分种质材料具有一定的市场流通性,种质经过市场交易等行为后流通到另一地区。不同种质苦参 AMOVA 分析结果表明,15 个苦参种质的遗传变异主要发生在种质群体内,所收集的苦参材料均为栽培种质,在当地栽培时间较长,培育代数较多,基因只是在当地的种质间发生交换,各地区之间的遗传交流较少,导致种质内部发生较多的基因交流及变异,这可能是种质内遗传变异大于种质间的原因。刘亚令等<sup>[38]</sup>基于 SSR 分子标记对黄芪的遗传结构进行分析,得出遗传变异主要发生在种质内(83%)的结论。程丽莉<sup>[39]</sup>等利用 cpSSR 对板栗及其近缘种和野生种进行群体遗传变异种间及种内的 AMOVA 分析表明,33%的遗传变异来源于种间,67%来源于种内,种内变异大于种间。这与本试验的研究结果一致。



## 4 结论

通过苦参叶绿体基因组筛选并开发了苦参 cpSSR 分子标记, 18 对 cpSSR 标记引物均表现出良好的特异性、重复性和多态性。基于叶绿体单倍型对 18 对 cpSSR 引物进行遗传多样性分析, 均表现出较高的遗传多样性, 可广泛应用于苦参种质资源研究中。对 150 份苦参材料进行遗传多样性分析, 结果表明, 15 个种质均表现出较高的遗传多样性, 其中山西武乡土河坪 (THP) 的种质遗传多样性最为丰富, 后续可用于苦参温度胁迫响应研究。苦参种质的遗传变异主要发生在种质内。遗传结构分析表明, 15 个苦参种质可分为 2 个类群, 分类结果具有一定的地域来源相关性。本研究的各类分析结果对苦参资源利用和种质创新具有重要的指导意义。

### 参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 211.
- [3] 张晓雯, 李凌宇, 尚海, 等. 苦参碱及其类似物的结构修饰研究进展. 中草药, 2019, 50(23): 5892-5900.
- [4] 葛淑俊, 孟义江, 李广敏, 等. 我国药用植物遗传多样性研究进展. 中草药, 2006(10): 1584-1589.
- [5] Li Q, Su X, Ma H, et al. Development of genic SSR marker resources from RNA-seq data in *Camellia japonica* and their application in the genus *Camellia*. Scientific Reports, 2021, 11(1): 9919.
- [6] Grover A, Sharma P C. Development and use of molecular markers: past and present. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(2): 290-302.
- [7] 张征锋, 肖本泽. 基于生物信息学与生物技术开发植物分子标记的研究进展. 分子植物育种, 2009, 7(1): 130-136.
- [8] 张全芳, 姜明松, 陈峰, 等. 山东省水稻品种 (系) 的遗传多样性分析. 作物杂志, 2021(4): 26-31.
- [9] 李琼, 常世豪, 武婷婷, 等. 120 份大豆种质资源遗传多样性和亲缘关系分析. 作物杂志, 2021(4): 51-58.
- [10] Tonti-Filippini J, Nevill P G, Dixon K, et al. What can we do with 1000 plastid genomes?. The Plant Journal, 2017, 90(4): 808-818.
- [11] Zhou J, Chen X, Cui Y, et al. Molecular structure and phylogenetic analyses of complete chloroplast genomes of two aristolochia medicinal species. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(9): 1839.
- [12] Yu X Q, Drew B T, Yang J B, et al. Comparative chloroplast genomes of eleven *Schima* (Theaceae) species: insights into DNA barcoding and phylogeny. PLoS ONE, 2017, 12: e0178026.
- [13] Xu C, Dong W P, Li W Q, et al. Comparative analysis of six *Lagerstroemia* complete chloroplast genomes. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 15.
- [14] Gu C H, Tembrock L R, Zheng S Y, et al. The complete chloroplast genome of *Catha edulis*: a comparative analysis of genome features with related species. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2): 525.
- [15] 杜久军, 左力辉, 刘易超, 等. 裂叶榆叶绿体基因组及 CP-SSR 位点分析. 植物遗传资源学报, 2018, 19(6): 1187-1196.
- [16] 薛宏, 易自力, 肖亮, 等. 芒属植物叶绿体 InDel 标记的开发与应用. 现代农业科技, 2015(7): 153-155, 159.
- [17] Zhang S A, Gao M Q, Zaitlin D. Molecular linkage mapping and marker-trait associations with *NIRPT*, a downy mildew resistance gene in *Nicotiana langsdorffii*. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 185.
- [18] Breidenbach N, Gailing O, Krutovsky K V. Genetic structure of coast redwood (*Sequoia sempervirens* [D. Don] Endl.) populations in and outside of the natural distribution range based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. PLoS ONE, 2020, 15 (12): e0243556.
- [19] Gichira A W, Avoga S, Li Z Z, et al. Comparative genomics of 11 complete chloroplast genomes of Senecioneae (Asteraceae) species: DNA barcodes and phylogenetics. Botanical Studies, 2019, 60(1): 17.
- [20] 高源, 王大江, 王昆, 等. 新疆野苹果叶绿体 DNA 变异与遗传进化分析. 植物遗传资源学报, 2020, 21(3): 579-587.
- [21] Aecyo P, Marques A, Huettel B, et al. Plastome evolution in the Caesalpinia group (*Leguminosae*) and its application in phylogenomics and populations genetics. Planta, 2021, 254(2): 27.
- [22] 张靖国, 曹玉芬, 陈启亮, 等. 基于叶绿体 DNA 变异的湖北梨属种质系统进化及遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(4): 766-772.
- [23] 王荣升, 杨庆文. 基于叶绿体基因多样性的中国水稻起源进化研究. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 686-693.
- [24] Shahzadi I, Ahmed R, Hassan A, et al. Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. Genetics and Molecular Research, 2010, 9(1): 386-393.
- [25] 乔永刚, 贺嘉欣, 王勇飞, 等. 药用植物苦参的叶绿体基因组及其特征分析. 药学报, 2019, 54(11): 2106-2112.
- [26] Beier S, Thiel T, Münch T, et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. Bioinformatics, 2017, 33(16): 2583-2585.
- [27] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [28] Liu K J, Muse S V. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129.
- [29] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [30] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [31] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [32] Earl D A, Vonholdt B M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources, 2012, 4(2): 359-361.

- [33] 王崇, 王连军, 杨新笋, 等. 104 个甘薯品种的 cpSSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析. 热带作物学报, 2021, 42(6): 1549-1556.
- [34] 魏潇, 章秋平, 刘威生, 等. 基于叶绿体 SSR 单倍型的普通杏演化关系. 植物遗传资源学报, 2018, 19(4): 705-712.
- [35] Yan Y D, Li X Y, Worth J R P, et al. Development of chloroplast microsatellite markers for *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae). Applications in Plant Sciences, 2019, 7(7): e11277.
- [36] 李祥栋, 石明, 陆秀娟, 等. 利用叶绿体基因组 SSR 标记揭示蕈属种质资源的遗传多样性. 华北农学报, 2019, 34 (增 1): 6-14.
- [37] 段永红, 渠云芳, 王长彪, 等. 药用植物苦参 SSR-PCR 体系的优化与验证. 中国农业大学学报, 2014, 19(5): 95-100.
- [38] 刘亚令, 耿雅萍, 解潇冬, 等. 基于 SSR 分子标记的药用黄芪遗传多样性与遗传结构分析. 草地学报, 2019, 27(5): 1154-1162.
- [39] 程丽莉, 胡广隆, 苏淑钗, 等. 板栗及其近缘种叶绿体 SSR 遗传多样性分析. 华北农学报, 2015, 30(2): 145-149.

## Genetic Diversity Analysis of *Sophora flavescens* Ait. Germplasm Resources Based on cpSSR Markers

Song Yun<sup>1,2</sup>, Zhang Xinrui<sup>1</sup>, He Jiaxin<sup>1</sup>, Li Zheng<sup>1</sup>, Sun Zhe<sup>1</sup>, Li Aoxuan<sup>1</sup>, Qiao Yonggang<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China;

<sup>2</sup>Shanxi Key Laboratory for Modernization of TCM, Jinzhong 030801, Shanxi, China)

**Abstract** A total of 150 *Sophora flavescens* plants from 15 different habitats were used as materials, and cpSSR molecular marker technology was used to explore the genetic diversity of *S. flavescens* germplasm resources from different habitats. The results showed that, a total of 311 bands were amplified by 18 pairs of cpSSR primers, and 97.47 alleles were detected, an average of 17.28 bands were amplified per cpSSR primer pair. The average number of alleles ( $N_a$ ) detected was 5.415, effective alleles ( $N_e$ ) was 4.395, Shannon's information index ( $I$ ) was 1.535, the diversity index ( $h$ ) was 0.748, the unbiased diversity index ( $uh$ ) was 0.832, and the polymorphism information content ( $PIC$ ) was 0.886,  $PIC > 0.5$  indicated that 18 pairs of cpSSR primers had good polymorphism. The genetic diversity of *S. flavescens* from different habitats was abundant, with the  $I$  was 1.600, the  $N_e$  was 4.786, and other genetic diversity indexes of THP germplasms in Wuxiang County of Shanxi Province were all higher, which indicated that THP was the place with rich genetic diversity. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed that there were great differences among individuals within germplasms, and the genetic variation rate within germplasms was greater than that of inter germplasms. The results of cluster analysis, principal coordinate analysis (PCoA) and genetic structure analysis by STRUCTURE software divided *S. flavescens* from different habitats into two groups, and the classification results had obvious geographical correlation. The first group of nine *S. flavescens* germplasms were mainly from Shanxi, Hebei, Shaanxi and Inner Mongolia, and the second group were mainly composed of germplasms from Shandong, Henan, Jiangsu and Anhui. The 18 pairs of cpSSR primers had good applicability for *S. flavescens*. The genetic diversity of *S. flavescens* germplasm resources provided a certain theoretical basis for the exploration, utilization and protection and the breeding of excellent varieties of *S. flavescens*.

**Key words** *Sophora flavescens* Ait.; Chloroplast molecular marker; Genetic diversity; Germplasm resources