

丹参线粒体和叶绿体微卫星 标记开发及多样性分析

沙秀芬¹, 彭芳^{2,3}, 陶珊^{2,3}, 吴宇^{2,3}, 刘继明⁴, 张超^{2,3}, 李群^{1*}

(1 四川师范大学 生命科学学院, 成都 610101; 2 四川省农业科学院 经济作物育种栽培研究所, 成都 610300; 3 国家中药材产业技术体系成都试验站, 成都 610300; 4 彭州市农林局, 成都 611942)

摘要: 该研究通过生物信息学方法, 对丹参线粒体、叶绿体基因组序列进行 SSR 位点搜索, 利用 Primer3.0 软件在线设计 SSR 引物, 通过 PCR 扩增, 筛选出扩增效果好、多态性高的 10 对 cpSSR 引物和 13 对 mtSSR 引物, 用于分析 61 份丹参品种的遗传多样性和鼠尾草属植物种间的通用性。结果显示: (1) 从 2 条基因组序列中搜索到 32 个 cpSSR 位点和 24 个 mtSSR 位点, 其中叶绿体单核苷酸的重复序列最多为 31 个, 占 96.9%, 重复类型中以 A/T 形式的微卫星最为丰富。 (2) 23 对 SSR 引物共检测出 46 个等位基因, 平均每个 SSR 位点等位基因数是 2 个, 有效等位基因数为 1.566; 预期杂合度 (H_e) 为 0.346, 高于双子叶植物的平均水平 ($H_e = 0.190$); 多态信息含量 (PIC) 为 0.278, 大于 0.250 小于 0.500; Shannon's 信息指数为 0.519, 表明所采集的丹参呈中等水平的遗传多样性。 (3) 聚类分析表明, 61 份丹参材料的遗传相似系数在 0.54~0.96 之间, 并在遗传相似系数为 0.64 处将 61 份丹参分为 6 个亚群; 四川、山东和安徽省的丹参聚集在 I 和 II 亚群中, 说明四川中江、山东和安徽地区的丹参亲缘关系较近, 而来源于四川中江的丹参分布于所有亚群, 表明四川中江的丹参具有丰富的多态性。 (4) 通用性检测结果显示, 11 对 mtSSR 引物在 9 种鼠尾草属中的平均通用性比率为 64.63%, 通用性较高; 9 对 cpSSR 引物在 10 种鼠尾草属中的平均通用性比率为 44.66%, 通用性较低; 引物 cp5p、cp8p 和 cp10p 在野芝麻亚科植物属间的通用性较好。研究表明, 开发的 23 对 SSR 引物在鼠尾草属内具有很好的适用性, 可以为该属种间的亲缘关系和种内遗传分化研究提供分子依据。

关键词: 丹参; 线粒体微卫星; 叶绿体微卫星; 遗传多样性; 通用性

中图分类号: Q346⁺.5; Q789 **文献标志码:** A

Development and Diversity Analysis of Mitochondrial and Chloroplast Microsatellite Markers in *Salvia miltiorrhiza*

SHA Xiufen¹, PENG Fang^{2,3}, TAO Shan^{2,3}, WU Yu^{2,3},
LIU Jiming⁴, ZHANG Chao^{2,3}, LI Qun^{1*}

(1 College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101; 2 Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610300; 3 Comprehensive Experimental Station of Chengdu Chinese Materia Medica of China Agriculture Research System, Chengdu 610300; 4 Agriculture and Forestry Bureau of Pengzhou, Chengdu 611942)

Abstract: In this test, SSR loci were searched for the mitochondrial and chloroplast genome sequences of *Salvia miltiorrhiza* by bioinformatics methods, and the SSR primers were designed by primer3.0 online software. 10 pairs of cpSSR primers and 13 pairs of mtSSR primers with high polymorphism were selected by PCR amplification. They were used to analyze the genetic diversity of 61 *S. miltiorrhiza* cultivars and

收稿日期: 2018-09-29; 修改稿收到日期: 2018-12-18

基金项目: 四川省财政创新提升工程(2016TSCY-001)

作者简介: 沙秀芬(1993-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事细胞工程与植物资源研究。E-mail: shaxiufen6@163.com

* 通信作者: 李群, 教授, 硕士生导师, 主要从事细胞工程与植物资源研究。E-mail: 619750304@qq.com

the transferability of *Salvia* L. species. (1) Total 32 cpSSR and 24 mtSSR were identified from 2 genome sequences. There were 31 mononucleotide repeat sequences with 96.9% frequency, showing the dominant types in the cpSSR. Both A/T types were abundant among mononucleotide repeat sequences. (2) 46 alleles were detected in 23 pairs of SSR primers, the average number of alleles per SSR locus was 2, and the number of effective alleles was 1.566. The expected heterozygosities was 0.346, which was higher than the average level of dicotyledons ($H_e = 0.190$); the polymorphism information content was 0.278, which was between 0.250 and 0.500; Shannon's information index was 0.519. The results showed that *S. miltiorrhiza* had a moderate level of genetic diversity. (3) The cluster analysis on 61 *S. miltiorrhiza* showed that the genetic similarity coefficient was ranging from 0.54 to 0.96. It can be divided into 6 subgroups when the genetic similarity coefficient was 0.64; the *S. miltiorrhiza* in Sichuan, Shandong and Anhui provinces clustered in I and II subgroups, suggesting their close relationship. *S. miltiorrhiza* in Zhongjiang of Sichuan Province were distributed in all the subgroups, suggesting their rich polymorphism. (4) The results of transferability test showed that 11 pairs of mtSSR primers were successfully amplified in nine species belong to *Salvia* L., the transferability ratio was 64.63%, suggesting mtSSR markers showed a higher transferability. 9 pairs of cpSSR primers were successfully amplified in all samples of *Salvia* L. species, and the transferability ratio was 44.66%, suggesting cpSSR markers showed a lower transferability. In addition, the primers cp5p, cp8p and cp10p had good generality among the genera of Lamioideae. These results indicated that 23 primers are suitable for SSR analysis of *Salvia* L. It would be useful for species relationship and study of genetic variation of *Salvia* L..

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; mtSSR; cpSSR; genetic diversity; transferability

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)属唇形科鼠尾草属植物,主要产于河北、四川、山西、陕西、山东、河南等地,其根和根茎可入药,具有活血祛瘀,凉血消痈,养血安神等效用,为妇科用药,主治子宫出血、月经不调、血瘀、腹痛、经痛、经闭、庙痛,属于中国传统大宗中药材。目前以丹参为主的复方丹参注射液、复方丹参滴丸、复方丹参片等多种复方制剂,被临床上广泛用于冠心病、心绞痛、心肌梗塞和心脑血管系统疾病^[1]的治疗。同时,丹参还具有抗肿瘤^[2-3]、抗菌抗炎^[4]、保护器官^[5]等作用,是临床应用最广泛的药材之一。

近年来,不少学者运用不同的分子标记方法对丹参主要产区的种质资源进行了遗传多样性研究,结果表明不同产地的丹参个体遗传多样性丰富,但各地遗传特性不一致。郭宝林等^[6]运用 RAPD 分子标记对中国主产区的 9 个丹参居群样本进行遗传多样性研究,结果显示,丹参居群内具有丰富的遗传多样性且不同地区间存在差异;宋振巧等^[7]利用 EST-SSR 分子标记对 4 个产地的 80 个丹参种质资源进行了多样性水平分析和聚类分析,证明 EST-SSR 可有效检测丹参的遗传多样性,但其遗传距离与地理位置未达显著相关性;Zhang 等^[8]利用 ISSR 标记分析了不同形态丹参种质的遗传多样性,结果显示不同形态丹参材料间存在较高的遗传多样性。相对于以上的标记,SSR (simple sequence repeat) 标记是由 1~6 bp 核苷酸为重复单位组成的串联重

复序列,因具有共显性遗传、多态性信息含量丰富、物种间转移性好、可重复性好和操作性简便等优点,已被广泛应用于遗传多样性的研究,王海等^[9]采用丹参叶绿体基因的 SSR 分子标记分析了全国 31 个不同丹参居群的遗传特性,认为丹参的遗传变异以种群间为主导,丹参种质间存在广泛的基因交流,并建议保护道地产区的种质特性。但是,目前已开发的适用于丹参叶绿体和线粒体基因组的 SSR 标记较少。因此本研究利用丹参叶绿体和线粒体基因组开发 SSR 标记,并对 61 份丹参进行遗传多样性和近缘物种通用性分析。

1 材料和方法

1.1 材料

所有试验材料均种植于四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所(表 1)。每个材料取 1~2 片幼嫩叶片,冷冻于 -80 °C 冰箱中备用。然后,下载唇形科全部的叶绿体、线粒体基因组序列(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/?report=5#!/organelles/Labiatae>),用于电子 PCR (Electronic PCR, e-PCR)生物信息学跨物种分析。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照文献^[10]的 CTAB 方法并稍加修改(65 °C 水浴 45 min;加 150 μ L ddH₂O 溶 DNA)提取 DNA。提取的 DNA 用 0.8%

表 1 实验材料及其来源

Table 1 Experimental materials and their source

编号 Code	来源 Source	编号 Code	来源 Source	编号 Code	来源 Source
1	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	22	山东沂源 Yiyuan, Shandong	42	安徽 Anhui
2	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	23	山东沂源 Yiyuan, Shandong	43	安徽 Anhui
3	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	24	山东沂源 Yiyuan, Shandong	44	山东沂源 Yiyuan, Shandong
4	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	25	山东沂源 Yiyuan, Shandong	45	山东沂源 Yiyuan, Shandong
5	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	26	山东沂源 Yiyuan, Shandong	46	中间材料 Intermediate material
6	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	27	山东沂源 Yiyuan, Shandong	47	中间材料 Intermediate material
7	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	28	山东沂源 Yiyuan, Shandong	48	中间材料 Intermediate material
8	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	29	山东沂蒙 Yimeng, Shandong	49	四川中江 Zhongjiang, Sichuan
9	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	30	山东沂蒙 Yimeng, Shandong	50	四川中江 Zhongjiang, Sichuan
10	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	31	山东沂蒙 Yimeng, Shandong	51	四川中江 Zhongjiang, Sichuan
11	四川中江 Zhongjiang, Sichuan	32	山东沂蒙 Yimeng, Shandong	52	四川中江 Zhongjiang, Sichuan
12	中间材料 Intermediate material	33	山东沂蒙 Yimeng, Shandong	53	中间材料 Intermediate material
13	中间材料 Intermediate material	34	山东日照 Rizhao, Shandong	54	中间材料 Intermediate material
14	中间材料 Intermediate material	35	山东日照 Rizhao, Shandong	55	中间材料 Intermediate material
15	中间材料 Intermediate material	36	山东平邑 Pingyi, Shandong	56	中间材料 Intermediate material
16	中间材料 Intermediate material	37	山东 Shandong	57	中间材料 Intermediate material
17	中间材料 Intermediate material	38	安徽 Anhui	58	陕西商洛 Shangluo, Shaanxi
18	中间材料 Intermediate material	39	安徽 Anhui	59	安徽 Anhui
19	山东 Shandong	40	安徽 Anhui	60	安徽 Anhui
20	山东 Shandong	41	安徽 Anhui	61	山西 Shanxi
21	山东 Shandong				

琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度,将合格的 DNA 样品稀释至 50 ng/ μ L 用于 SSR 反应。

1.2.2 SSR 位点的搜索及引物设计 使用 MISA 软件 (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>) 搜索 SSR 位点。设置搜索参数用于检测单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸 SSR 基序,分别至少重复 10、6、5、5、5 和 5 次。使用 Primer3 软件对 SSR 位点进行引物设计。基于以下参数设计引物组:GC 含量 40%~60%, Tm 50~60 °C,引物长度 20~24 bp,预期扩增产物长度 100~250 bp。所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.3 SSR 引物的筛选 为筛选出扩增效率好的 cpSSR、mtSSR 引物,选择 10 个 DNA 样品,用设计的 SSR 引物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 20 μ L (Mix 10 μ L,引物 2 μ L,ddH₂O 6 μ L,模板 DNA 2 μ L)。反应程序设置:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,34 个循环;

72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.4 SSR 标记的验证 筛选出多态性好的引物用 61 份丹参样品进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物用毛细管电泳进行检测。PCR 反应体系为 20 μ L (DNA 模板 2 μ L、引物 2 μ L(稀释 400 倍)、dNTP 2 μ L(稀释 4 倍)、ddH₂O 12 μ L、Buffer 2 μ L、Taq 酶 0.2 μ L)。反应程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,34 个循环;72 °C 延伸 10 min。

1.2.5 数据分析 毛细管凝胶电泳图结果有条带记为 1,无条带记为 0。利用 NTSYS-pc2.1 软件进行 UPGMA 聚类构建树形图。利用 POPGENE 1.31 软件计算等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Shannon's 信息指数 (I)、观察杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 等多样性指标。用 PIC_CALC 软件分析多态性含量 (PIC)。利用 e-PCR 进行 SSR 的跨物种性分析。

2 结果与分析

2.1 丹参 cpSSR 和 mtSSR 重复基元特征分析

使用 MISA 软件搜索丹参线粒体、叶绿体基因组序列的 SSR 位点,共获得 32 个 cpSSR 位点,24 个 mtSSR 位点,不同核苷酸重复基元的 SSR 数量间存在明显差异(表 2)。其中,单核苷酸重复基元 A/T 的 mtSSR 位点共 17 个,占 mtSSR 位点总数的 70.8%;二核苷酸重复基元(AG/CT、AT/AT)和三核苷酸重复基元(AAG/CTT、AAT/ATT),分别占 mtSSR 位点总数的 12.5% 和 16.7%。而 cpSSR 位点的单核苷酸重复基元 A/T,占 cpSSR 位点总数的 96.9%,二核苷酸重复基元 AT/AT,占 mtSSR 总数的 3.1%。没有筛选出全部由 G/C 碱基构成的 SSR 位点。

2.2 引物的筛选

为了初步筛选出 SSR 引物,用 56 对引物在 10 个 DNA 样品中进行扩增,结果(图 1)显示,34 对引物能在 7 个以上的样品中成功扩增出条带,具有较高的稳定性和多态性,能够用于 SSR 标记的验证。将筛选出的 34 对引物对 61 份丹参样品进行 PCR

扩增,PCR 产物用毛细管电泳检测筛选出 23 对扩增效果好、位点数量适中的 cpSSR 和 mtSSR 引物,进一步用于丹参遗传多样性分析,结果(表 3)发现,其中 19 个 SSR 位点出现在丹参叶绿体基因组和线粒体基因组的非编码区 UTR 区域,4 个 SSR 位点出现在 CDS 编码区,分别是引物 cp21p、cp26p、mt4p 和 mt21p。

2.3 丹参遗传多样性分析

2.3.1 SSR 标记多态性分析

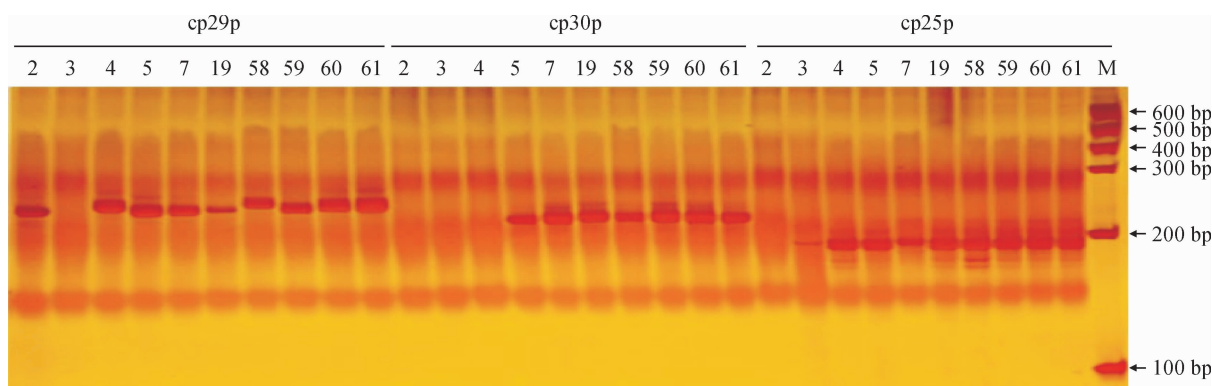
用筛选的 23 对引物对 61 个样本进行 PCR 扩增,共检测到 23 个位点,均为多态性位点,多态百分比率为 100%(表 4)。每一对引物检测到观察等位基因数为 2,有效等位基因数范围为 1.103~1.987,平均值为 1.566。引物 cp25p 最多,为 1.987,其次是引物 mt6p 和 cp5p,有效等位基因数均为 1.913,引物 mt9p 有效等位基因数最少,为 1.103。

在群体遗传多样性分析中(表 4),观测杂合度(H_o)在 0.499~0.906 之间,平均为 0.654,引物 mt9p 最高,cp25p 最低;期望杂合度(H_e)在 0.094~0.501 之间,平均为 0.346,引物 cp25p 最高,mt9p 最低;Shannon's 指数(I)为 0.196~0.690,平

表 2 丹参中不同 SSR 重复基序的量

Table 2 Amounts of different SSR repeat motifs in *S. miltiorrhiza*

序列 Sequence	重复类型 Repeat type	基序类型 Motif type	数量 Number	频率 Frequency/%
线粒体 Mitochondria	单核苷酸 Mononucleotide	A/T	17	70.8
	二核苷酸 Dinucleotid	AG/CT AT/AT	3	12.5
	三核苷酸 Trinucleotide	AAG/CTT AAT/ATT	4	16.7
叶绿体 Chloroplast	单核苷酸 Mononucleotide	A/T	31	96.9
	二核苷酸 Dinucleotid	AT/AT	1	3.1



M. DNA marker I; 10 份材料编号同表 1

图 1 引物 cp25p、cp29p、cp30p 对 10 份材料的扩增结果

M. DNA marker I; The 10 variety codes were the same as in Table 1

Fig. 1 Amplification effect of primer cp25p, cp29p, cp30p on 10 materials

表 3 23 对 cpSSR 和 mtSSR 引物特征
Table 3 Features of 23 pairs of cpSSR and mtSSR primers

引物名称 Primer name	重复基序 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5'→3')	退火温度 T _m /°C	扩增产物长度 Amplification product length/bp	基因组中位置 Genomic location
cp1p	(A)10	F:TAGCCGCACTTAAAAGCCGA	56.9	232	(trnK-UUU)-rps16 基因间区 Intergenic
		R:TCCATTCATTTTCTGTTTCGAATCA	52.5		
cp2p	(A)11	F:AATGATCCGGGGCGTAATCC	57.7	213	atpA-atpF 基因间区 Intergenic
		R:CCCTCTCTTTCCGTTTCCGT	57.3		
cp5p	(A)10(A)15	F:GGCTCTCACGCTCAATTCCT	57.7	243	(trnG-UCC)-(trnM-CAU) 基因间区 Intergenic
		R:CGGCGACCTATGCCTTATGT	57.5		
cp8p	(T)11	F:CGGTGGTATCAAAACGCCAC	57.1	234	rps4-(trnT-UGU) 基因间区 Intergenic
		R:TTCATTTCCCGAGGAAGTGCA	56.5		
cp10p	(A)11	F:ACCTTTGCGTCTTCCTTGGA	56.7	240	psbM-(trnD-GUC) 基因间区 Intergenic
		R:CAGTCCCGACGGATCCAATA	56.7		
cp11p	(A)15	F:GGAGAAGATGCGGGTTTCGAT	57.5	247	rps8-rpl14 基因间区 Intergenic
		R:CCTTGAGGTCACGGGTTCAA	57.6		
cp21p	(T)13	F:ATTTGACCTCGTATCCGGCG	57.7	122	rpoC2
		R:CCCTCGGTTGATCTTGGTTGA	57.3		
cp25p	(T)10	F:GTCAAATACATGAATGAAGGAAAAGGA	52.7	181	rps4-(trnT-UGU) 基因间区 Intergenic
		R:CGTTAGCCATACTGCTCCA	57.2		
cp26p	(T)10	F:GACTTTGATTTCGCGGCACTC	57.1	118	clpP
		R:CGTTTCCAAAGAGGTTTCGTTGT	55.6		
cp30p	(T)11	F:AATCAAGCCACGACCCTCAC	57.9	209	ndhG-ndhI 基因间区 Intergenic
		R:CGGTTACCGGTCTCAATAATTGA	54.4		
mt2p	(A)11	F:AAAGCCCCGCACCTCATTA	57.1	161	orf117a-mttB 基因间区 Intergenic
		R:CTGGCTGGGAGCTGTATGAG	58.2		
mt4p	(A)10	F:TCCTTCCACCGGCCCTTATA	58.1	227	orf154a
		R:TCAACGGTCTTCGCGCTAC	57.5		
mt6p	(T)10	F:GCAGCACACCAGACGAAAAG	57.3	242	orf137-(trnQ-UUG) 基因间区 Intergenic
		R:GTTCAGGAGCTCCTTGCGTA	57.3		
mt7p	(A)10	F:CCGAATGAATATCCCGCGGA	57.6	194	atp4-(trnI-CAU) 基因间区 Intergenic
		R:CCGCCTTTTGGCCAACATCA	56.8		
mt9p	(T)11(A)11	F:GAACGGTCGGTAGCTGCTTA	57.3	142	orf117a-mttB 基因间区 Intergenic
		R:CTCGTAGTACCTGCTAGCGC	58.0		
mt11p	(T)10	F:GCCCTTCAACCACCTCATCT	57.6	238	orf182b-orf119a 基因间区 Intergenic
		R:TCTATCGAGACATTGCGGGC	57.5		
mt12p	(TA)6	F:GCGTTGGTACCAGCTCTAT	57.6	237	orf154a
		R:AGCTATACCACAGTCTGTTTTCT	55.2		
mt13p	(TA)7	F:GAAAGGGCCGCTTGCTTAAA	56.3	192	csmC-rpl2 基因间区 Intergenic
		R:GGAAAGAGGAGGCCTTTGCT	57.8		
mt14p	(TTC)5	F:GCGTTGTTGGGTGGAATTCC	57.5	177	orf99c-orf139 基因间区 Intergenic
		R:TCAAACCTCCTCTTCCCA	58.3		
mt16p	(A)10	F:TCTAACCGATCCGCCAGTA	57.9	243	atp6-orf103a 基因间区 Intergenic
		R:ACGATCCTGTCTCAGAGGCT	57.9		
mt19p	(A)10	F:CAGAGCGAGTCGAAGTGTGT	57.4	216	orf103b-orf108b 基因间区 Intergenic
		R:CGTAACTGAGCGGTGGACTT	57.5		
mt21p	(A)10	F:GAAGAGTGCACGTCCGAAGA	57.4	232	orf105-nad7 基因间区 Intergenic
		R:ACCTACGTCAATTCGACTCGC	57.2		
mt22p	(T)11	F:CGGACCTCGATTTCGATTGT	57.4	121	csmB-rpl10 基因间区 Intergenic
		R:GCTGCAAGACCAAAAACAGGG	57.5		

均为 0.519,引物 cp25p 最高,mt9p 最低。标记的多态信息含量(PIC)介于 0.089~0.373,平均为 0.278。其中 $0.250 < PIC < 0.500$ 的标记有 16 个,分别是 cp1p、cp2p、cp5p、cp8p、cp10p、cp11p、cp21p、cp25p、cp26p、cp30p、mt6p、mt11p、mt12p、mt19p、mt21p 和 mt22p,这些标记具有较高的多态性。以上数据检测结果显示丹参叶绿体 SSR 引物相比线粒体 SSR 引物更能揭示丹参遗传多样性水平。

2.3.2 聚类分析 运用 NTSYS-pc2.1 软件对 61 份丹参进行聚类分析。结果(图 2)显示,在相似性系数为 0.54 处可分为两大类群,四川省中江县 7 号材料独立聚为第一大类群;剩余的丹参聚为第二大类群。第二大类群在 0.64 处又可分为 6 个亚群,分为亚群 I、II、III、IV、V 和 VI。四川省、陕西省、山东省和 9 份中间材料聚在第 I 亚群;安徽省、山西省和

中间材料 16 号聚在亚群 II;四川省中江县 5 号小叶丹参单独聚为 IV 亚群。由图 2 可见,四川丹参在 5 个亚群中均有,说明四川丹参的遗传多样性丰富,而且同一个省的丹参分布在不同的类群中,表明丹参药材遗传变异与地理分布无明显相关性,这说明丹参产区之间的遗传分化不明显。

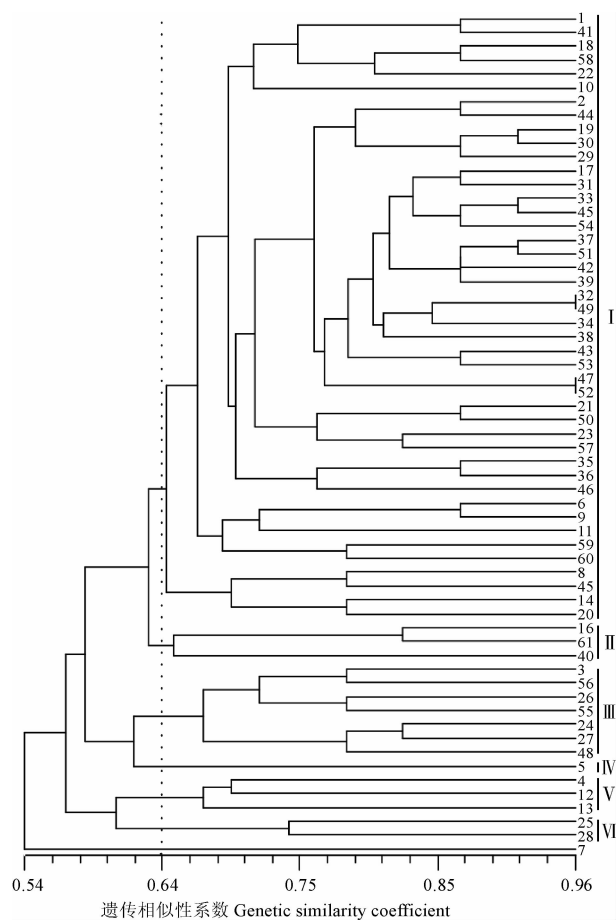
2.4 cpSSR 和 mtSSR 标记在鼠尾草属种间的通用性

利用 13 对 mtSSR 和 10 对 cpSSR 标记分别对丹参、墨西哥鼠尾草(*S. leucantha*)和康定鼠尾草(*S. prattii*)等进行 PCR 扩增。结果(表 5)显示:11 对 mtSSR 标记和 9 对 cpSSR 标记能在 3 种以上的植物中扩增出清晰的条带。11 对 mtSSR 引物在 9 种鼠尾草属中的平均通用性比率为 64.63%,通用性较高;9 对 cpSSR 引物在 10 种鼠尾草属中的平均通用性比率为 44.66%,通用性较低。

表 4 23 对 mtSSR 和 cpSSR 标记的遗传参数

Table 4 Genetic parameters of the 23 polymorphic mtSSR and cpSSR markers

引物 Primer	观察等位基因数 Observed number of alleles(N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles(N_e)	观测杂合度 Observing heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	香农信息指数 Shannon's information index(I)	多态信息含量 Polymorphic information content(PIC)
cp1p	2	1.856	0.535	0.465	0.654	0.355
cp2p	2	1.751	0.568	0.433	0.620	0.337
cp5p	2	1.913	0.519	0.481	0.670	0.363
cp8p	2	1.505	0.662	0.338	0.518	0.279
cp10p	2	1.505	0.662	0.338	0.518	0.279
cp11p	2	1.631	0.610	0.390	0.575	0.312
cp21p	2	1.590	0.626	0.374	0.558	0.302
cp25p	2	1.987	0.499	0.501	0.690	0.373
cp26p	2	1.751	0.568	0.433	0.620	0.337
cp30p	2	1.672	0.595	0.405	0.592	0.321
mt2p	2	1.177	0.848	0.152	0.284	0.139
mt4p	2	1.336	0.746	0.254	0.418	0.220
mt6p	2	1.913	0.519	0.481	0.670	0.363
mt7p	2	1.140	0.876	0.124	0.242	0.115
mt9p	2	1.103	0.906	0.094	0.196	0.089
mt11p	2	1.590	0.626	0.374	0.558	0.302
mt12p	2	1.547	0.643	0.357	0.539	0.291
mt13p	2	1.378	0.724	0.276	0.446	0.237
mt14p	2	1.295	0.770	0.230	0.389	0.202
mt16p	2	1.378	0.724	0.276	0.446	0.237
mt19p	2	1.462	0.681	0.319	0.496	0.266
mt21p	2	1.672	0.595	0.405	0.592	0.321
mt22p	2	1.856	0.535	0.465	0.654	0.355
平均值 Mean	2	1.566	0.654	0.346	0.519	0.278



61 份材料编号同表 1

图 2 基于遗传距离的 61 份丹参资源聚类图

The 61 variety codes were the same as in Table 1

Fig. 2 Cluster diagram of 61 accessions of *S. miltiorrhiza* based on genetic distance

2.5 cpSSR 标记在野芝麻亚科植物属间的通用性

将 10 对 cpSSR 引物分别在 22 条基因组序列中用电子 PCR 进行分析,结果(表 6)发现,引物 cp5p、cp8p 和 cp10p 分别在 3 个属 4 条基因组序列、8 个属 21 条基因组序列和 6 个属 12 条基因组序列生成特异性产物,表明这 3 对引物在野芝麻亚科植物属间的通用性较好。

3 讨论

3.1 61 份丹参品种间的亲缘关系

通过聚类分析发现,采集的 61 份丹参的遗传相似性系数为 0.54~0.96。山东 32 号和四川中江 49 号,中间材料 47 号和四川中江 52 号品种,遗传距离最小,相似性系数最大。此外,来源于四川中江、山东和安徽的丹参聚在 I、II 亚群,说明四川中江、山东和安徽地区的丹参亲缘关系较近,具有很大的相似性,可能是因为四川中江丹参的种植主要采用根段无性繁殖方式栽培,在栽培过程中引来了外来种源,不同地区进行种质互换、基因交流等引起的。9 份中间材料聚在 I 亚群,可能它们母本之间亲缘关系较近;而 5 号四川中江小叶丹参品种形成了相对独立的亚群,小叶丹参经产地长期选根留种,形成了具有适应性强、耐旱、亩产量高等优势的稳定遗传因子,且在长期栽培过程中和其他产地丹参品种间基因交流较少所致。总体看,四川丹参出现在绝大部分亚群中,说明四川丹参仍保留着较为丰富的遗传多样性。为保护四川丹参资源的多样性,提高四川

表 5 mtSSR 和 cpSSR 引物在鼠尾草属种间的扩增结果

Table 5 Amplification results of mtSSR and cpSSR primers in species of *Salvia* L.

材料 Material	mtSSR		cpSSR	
	通用性扩增的标记数 (比率/%) No. of transferable markers (ratio/%)	多态性扩增的标记数 (比率/%) No. of polymorphic markers (ratio/%)	通用性扩增标记数 (比率/%) No. of transferable markers (ratio/%)	多态性扩增标记数 (比率/%) No. of polymorphic markers (ratio/%)
丹参 <i>S. miltiorrhiza</i>	11(100)	11(100)	9(100)	9(100)
华鼠尾草 <i>S. chinensis</i>	8(72.70)	8(72.70)	3(33.30)	3(33.30)
暗红鼠尾草 <i>S. atroviruba</i>	7(63.60)	7(63.60)	3(33.30)	3(33.30)
粘毛鼠尾草 <i>S. roborowskii</i>	7(63.60)	7(63.60)	3(33.30)	3(33.30)
墨西哥鼠尾草 <i>S. leucantha</i>	6(54.50)	6(54.50)	6(66.70)	6(66.70)
康定鼠尾草 <i>S. prattii</i>	6(54.50)	6(54.50)	0	0
栗色鼠尾草 <i>S. castanea</i>	9(81.80)	9(81.80)	5(55.60)	5(55.60)
黄花鼠尾草 <i>S. flava</i>	5(45.50)	5(45.50)	7(77.80)	7(77.80)
云南鼠尾草 <i>S. yunnanensis</i>	5(45.50)	5(45.50)	4(44.40)	4(44.40)
鼠尾草 <i>S. japonica</i>	—	—	2(22.20)	2(22.20)

注: — 表示鼠尾草没有用 mtSSR 来检测

Note: —. Indicates that *Salvia* is not detected with mtSSR

表 6 cpSSR 引物在野芝麻亚科植物属间的扩增结果

Table 6 Results of amplification of cpSSR primers in the genus subspecies of Lamioideae

引物 Primer	青兰属 <i>Dracocephalum</i>	鼬瓣花属 <i>Galeopsis</i>	薄荷属 (6 条) <i>Mentha</i>	野芝麻属 (2 条) <i>Lamium</i>	紫苏属 (3 条) <i>Perilla</i>	水蜡烛属 (2 条) <i>Dysophylla</i>	迷迭香属 <i>Rosmarinus</i>	水苏属 (4 条) <i>Stachys</i>	鼠尾草属 (2 条) <i>Salvia</i>
cp1p	0	0	0	0	1	0	0	0	1
cp2p	0	0	0	0	0	0	0	0	1
cp5p	1	0	0	1	0	0	0	0	2
cp8p	0	1	6	2	3	2	1	4	2
cp10p	1	0	4	0	2	0	1	3	1
cp11p	0	0	0	0	0	0	0	0	1
cp21p	0	0	2	0	0	0	0	0	1
cp25p	0	0	1	0	0	0	0	0	1
cp26p	0	0	0	0	0	0	0	0	1
cp30p	0	0	0	0	0	0	0	0	1
总计 Total	2	1	13	3	6	2	2	7	12

丹参的质量,急需对四川丹参资源进行系统收集评价,为生产提供更加优质的种源。

3.2 遗传多样性分析

遗传多样性是物种生存适应和发展进化的前提,对环境变化适应能力越强的物种,其遗传多样性越高或遗传变异越丰富;反之,容易受到环境变化影响的物种其遗传多样性较低^[11]。期望杂合度(H_e)被认为是衡量一个物种遗传多样性水平高低的标准,本研究结果表明丹参的期望杂合度为 0.346,高于双子叶植物的平均水平($H_e=0.190$),多态信息含量在 0.089~0.373 之间,平均值为 0.278,Shannon's 指数平均值为 0.519,说明所收集的丹参种质资源呈中等水平的遗传多样性。与王海^[9]、宋杰^[12]、Hyejin An^[13]等研究丹参遗传多样性的结果是一致的。本研究开发的 23 对 SSR 引物在丹参中具有较高的多态性,说明 mtSSR 和 cpSSR 引物对丹参具有良好的鉴别能力,可以作为品种鉴定的一

个辅助工具。

3.3 cpSSR 和 mtSSR 标记的通用性

近年,人们对葫芦科^[14]、虎耳草科^[15]、蜡梅科^[16]、松科^[17]、禾本科^[18]、豆科^[19]、茄科^[20]、菊科^[21]、葡萄科^[22]及蔷薇科^[23]等近缘物种间通用性进行了大量研究,并且开发了一定数目通用 SSR 标记,这些标记可以为遗传学和基因组学等方面的研究提供更多的遗传信息^[24]。本研究所选用的 11 对 mtSSR 标记在鼠尾草属通用性比率为 64.63%,比宗成堃^[25]利用 EST-SSR 标记在唇形科鼠尾草属通用性分析结果高,表明丹参 mtSSR 在鼠尾草属中有较好的通用性。而 9 对 cpSSR 在唇形科鼠尾草属通用性比率为 44.66%,低于宗成堃的研究结果。显然,mtSSR 和 cpSSR 引物在鼠尾草属内较高的可转移性极大地减轻了引物开发的工作量,同时为研究种间进化关系提供了一条有效途径。

参考文献:

- [1] 刘家军,吴松,李龙珠,等. 丹参酮 II A 磺酸钠注射液对兔心肌缺血预处理后血管内皮损伤的保护作用[J]. 世界中医药, 2017, **12**(3): 618-622.
- LIU J J, WU S, LI L Z, *et al.* Protective effect of danshen a sodium sulfonate injection on vascular endothelial injury after ischemic preconditioning in rabbits with myocardial ischemia preconditioning[J]. *World Chinese Medicine*, 2017, **12**(3): 618-622.
- [2] LI X J, LI Z F, *et al.* Mechanisms of tanshinone II a inhibits malignant melanoma development through blocking autophagy signal transduction in A375 cell[J]. *BMC Cancer*, 2017, **17**(1): 357.

- [3] 单云岗,俞忠明,傅跃青. 丹参不同有效成分对黑色素瘤细胞增殖活力和细胞周期影响的研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, **35**(2): 435-440.
- SHAN Y G, YU Z M, FU Y Q. Effect of different effective components of *Salvia miltiorrhiza* on cell proliferation and cell cycle of melanoma cells[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2017, **35**(2): 435-440.
- [4] GAO D, MENDOZA A, LU S, *et al.* Immunomodulatory effects of danshen (*Salvia miltiorrhiza*) in BALB/c mice[J]. *International Scholarly Research Notices*, 2012: 954 032-954 032.
- [5] 张静,刘天荣,薛克栋. 丹参对小鼠急性肺损伤的保护作用研究[J]. 临床急诊杂志, 2017, **18**(2): 93-97.

- ZHANG J, LIU T R, XUE K D. The study of *Salvia miltiorrhiza* in LPS-induced acute lung of mice[J]. *Journal of Clinical Emergency (China)*, 2017, **18**(2): 93-97.
- [6] 郭宝林,林生,冯毓秀,等. 丹参主要居群的遗传关系及药材地道性的初步研究[J]. *中草药*, 2002, **33**(12): 1 113-1 116.
- GUO B L, LIN S, FENG Y X, *et al.* Primary research on genetic relationship among main populations of *Salvia miltiorrhiza* and genuineness of herb[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2002, **33**(12): 1 113-1 116.
- [7] 宋振巧,王建华,陈为序,等. EST-SSR 分析不同产地丹参的遗传多样性[J]. *核农学报*, 2014, **28**(2): 193-199.
- SONG Z Q, WANG J H, CHEN W X, *et al.* Analysis of genetic diversity of *Salvia miltiorrhiza* from different habitats by EST-SSR[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, **28**(2): 193-199.
- [8] ZHANG Y, LI X, WANG Z Z. Diversity evaluation of *Salvia miltiorrhiza* using ISSR markers[J]. *Biochemical Genetics*, 2013, **51**(9/10): 707-721.
- [9] 王海,何冬梅,等. 利用 cpSSR 分子标记法对丹参遗传特征的分析[J]. *安徽农业科学*, 2012, **40**(19): 9 985-9 989.
- WANG H, HE D M, *et al.* Genetic diversity investigation of cultivated *Salvia miltiorrhiza* Bge. with cpSSR technology[J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, 2012, **40**(19): 9 985-9 989.
- [10] 宋振巧,王明明,王建华,等. 丹参 DNA 提取方法比较[J]. *中国野生植物资源*, 2008, **27**(1): 54-57.
- SONG Z Q, WANG M M, WANG J H, *et al.* Comparison of genomic DNA extraction methods for *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2008, **27**(1): 54-57.
- [11] 孙典荣,李渊,李文涛,等. 大叶藻居群微卫星遗传多样性研究[J]. *水生生物学报*, 2013, **37**(1): 82-89.
- SUN D R, LI Y, LI W T, *et al.* Microsatellite genetic diversity of *Zostera marina* L. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(1): 82-89.
- [12] 宋杰. 丹参 EST-SSR 和 cpSSR 分子标记的建立及其遗传特征分析[D]. 成都:成都中医药大学, 2009.
- [13] AN H, PARK J H, HONG C E, *et al.* Genetic diversity and population structure of Chinese ginseng accessions using SSR markers[J]. *Journal of Plant Biotechnology*, 2017, **44**(3): 312-319.
- [14] 宋金亮,杨路明,郭禄芹,等. 甜瓜 SSR 标记在葫芦科不同作物间的通用性分析[J]. *分子植物育种*, 2018, **16**(12): 3 980-3 988.
- SONG J L, YANG L M, GUO L Q, *et al.* Generality analysis of melon SSR markers in different cucurbit crops[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, **16**(12): 3 980-3 988.
- [15] 杨雯,蒋伟,钟国跃,等. 虎耳草属植物 SSR 分子标记的开发及应用[J]. *中国中药杂志*, 2018, **43**(10): 2 057-2 066.
- YANG W, JIANG W, ZHONG G Y, *et al.* Development and application of polymorphic microsatellite markers in *Saxifraga* genus[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, **43**(10): 2 057-2 066.
- [16] 吴静,黄耀辉,董彬,等. 夏蜡梅 SSR 引物适用性分析及其在遗传多样性研究中的应用[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2018, **42**(3): 58-66.
- WU J, HUANG Y H, DONG B, *et al.* Suitability test of SSR primer of *Sinocalycanthus chinensis* and its application in genetic diversity[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2018, **42**(3): 58-66.
- [17] 倪州献,白天道,蔡恒,等. 马尾松基因组 SSR 标记在松属其他树种中的通用性分析[J]. *分子植物育种*, 2015, **13**(12): 2 811-2 817.
- NI Z X, BAI T D, CAI H, *et al.* The transferability of *Pinus massoniana* SSR in other *Pinus* species[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, **13**(12): 2 811-2 817.
- [18] 程雪妮,王颖,庞玉辉,等. 小麦 SSR 和 EST-SSR 引物对无芒雀麦的通用性分析[J]. *植物科学学报*, 2014, **32**(1): 27-33.
- CHENG X N, WANG Y, PANG Y H, *et al.* Primer transferability analysis on SSR and EST-SSR markers from *Triticum aestivum* to *Bromus inermis* [J]. *Plant Science Journal*, 2014, **32**(1): 27-33.
- [19] 潘磊,李依,郭瑞,等. 豇豆叶绿体微卫星标记的开发及其在近缘种的通用性研究[J]. *长江蔬菜*, 2014, (6): 9-15.
- PAN L, LI Y, GUO R, *et al.* Development of chloroplast microsatellite markers in *Vigna unguiculata* and its versatility in related species[J]. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2014, (6): 9-15.
- [20] 汪国平,牛玉,汪文毅,等. 番茄 SSR 标记在茄子及其他茄科作物上的通用性分析[J]. *华南农业大学学报*, 2014, **35**(4): 56-60.
- WANG G P, NIU Y, WANG W Y, *et al.* Transferability of tomato SSR markers to eggplants and other Solanaceous vegetables[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2014, **35**(4): 56-60.
- [21] 张华丽,王涛,宋利娜,等. 菊花 EST-SSR 标记开发及其对万寿菊的可转移性研究[J]. *核农学报*, 2016, **30**(1): 42-49.
- ZHANG H L, WANG T, SONG L N, *et al.* Development of *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel EST-SSR marker and its transferability to *Tagetes erecta* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2016, **30**(1): 42-49.
- [22] ROSSETTO M, MCNALLY J, HENRY R J, *et al.* Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, **104**(1): 61-66.
- [23] 王彩虹,田义朝,赵静. 来自苹果的 SSRs 在蔷薇科植物资源上的通用性分析[J]. *园艺学报*, 2005, **32**(3): 500-502.
- WANG C H, TIAN Y K, ZHAO J. General application analysis of SSRs derived from apple (*Malus pumila*) on other species in Rosaceae[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, **32**(3): 500-502.
- [24] 陈明丽,王兰芬,武晶,等. 普通菜豆基因组 SSR 标记开发及在豇豆和小豆中的通用性分析[J]. *作物学报*, 2014, **40**(5): 924-933.
- CHEN M L, WANG L F, WU J, *et al.* Development of genomic SSR markers in common bean and their transferability in cowpea and adzuki bean[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, **40**(5): 924-933.
- [25] 宗成堃. 丹参遗传连锁图谱构建及 QTL 分析[D]. 山东泰安:山东农业大学, 2015.