

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.12.004

栽培丹参居群外转录间隔区(ETS) 遗传多样性分析

冯洁¹, 尹艳艳¹, 廖芳², 孔德英³,
马浩予¹, 唐嘉浩¹, 李关荣¹

1. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400716; 2. 天津海关动植物与食品检测中心, 天津 300461;
3. 重庆海关技术中心, 重庆 401333

摘要: 为了解栽培丹参居群核糖体 RNA 基因外转录间隔区(ETS)的遗传多样性及其系统发育关系, 该研究以征集到的国内 40 份栽培丹参居群为材料, 采用 PCR 首次成功扩增了栽培丹参居群的 ETS 序列, 利用生物信息学手段对其序列进行了分析比较. 结果表明: 40 个栽培丹参居群的 ETS 序列长度为 421~433 bp, 其中 32 个栽培丹参居群 ETS 序列长度为 422 bp; GC 含量为 56.8%~62.8%, 向 GC 方向偏斜; 共有 241 个单核苷酸多态性(SNP)变异位点, 变异率高达 54.8%, 有 205 个简约信息位点; 基于 ETS 序列的 SNP 指纹可以鉴定 14 个栽培丹参居群. 贝叶斯分析表明: 其最佳核苷酸替代模型为 HKY+I. 对 ETS 序列的遗传多样性分析表明: 栽培丹参在物种水平上存在非常丰富的遗传多样性. 中性检验显示其在 $p > 0.10$ 的水平差异不具有统计学意义, 符合中性进化模型. 基于 ETS 序列的系统进化树表明: 40 个栽培丹参居群聚类在 2 个系支上, 其中最大似然法(ML)和邻近连接法(NJ)聚类结果一致, 较最大简约法更适合丹参 ETS 聚类分析.

关键词: 丹参; 栽培居群; 外转录间隔区; 遗传多样性;

系统发育关系

中图分类号: Q949.777.6

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2022)12-0029-10

Genetic Diversity of External Transcribed Spacer(ETS) of Cultivated *Salvia miltiorrhiza* Populations

FENG Jie¹, YIN Yanyan¹, LIAO Fang², KONG Deying³,
MA Haoyu¹, TANG Jiahao¹, LI Guanrong¹

1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Animal, Plant and Foodstuff Inspection Center, Tianjin Customs, Tianjin 300461, China;

3. Technology Center, Chongqing Customs, Chongqing 401333, China

收稿日期: 2021-11-

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFF0210303, 2017YFF0210305).

作者简介: 冯洁, 硕士研究生, 主要从事资源植物的生物化学与分子生物学研究.

通信作者: 李关荣, 教授.

Abstract: To understand the genetic diversity and phylogenetic relationship of the cultivated *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) populations based on the external transcribed spacer (ETS) of the rRNA genes, 40 cultivated Danshen populations were collected in China as studying materials. The ETS sequences were successfully amplified by PCR for the first time. Obtained sequences were comparatively analyzed by bioinformatic means. Results showed that the aligned total length of the ETS was 421~433 bp with the majority (32 populations) being 422 bp. GC contents were 56.8%~62.8%, which deviated to higher GC content. There were 241 single nucleotide polymorphism (SNP) sites, with a variation rate as high as 54.8%, among which 205 was parsimony-informative (PI) sites. The SNP fingerprints based on the ETS sequences can identify 14 cultivated Danshen populations. Bayesian analysis showed that the best nucleotide substitution model for ETS of Danshen was HKY+I. Genetic diversity analysis of the ETS sequences showed that the cultivated Danshen populations are rich in genetic diversity at the species level. Neutral test results showed that the ETS sequences were not significant at the level of $p > 0.10$, which is in accordance with the neutral evolution model. The phylogenetic trees based on the ETS sequences indicated that the 40 populations were clustered in two clades. The phylogenetic clustering patterns constructed by both Neighbor-joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) were almost identical, more suitable for the analysis of Danshen ETS than by Maximum Parsimony (MP).

Key words: Danshen (*Salvia miltiorrhiza*); cultivated population; external transcribed spacer (ETS); genetic diversity; phylogenetic relationship

中药丹参 *Salvia miltiorrhiza* 为唇形科鼠尾草属多年生草本植物,其根茎可入药;在中国、日本、美国和欧洲,丹参已广泛用于治疗血管疾病,包括动脉粥样硬化、高血压、高血脂和中风等^[1-2]。近些年的研究表明,丹参还具有其他多种药理活性,如抗氧化、神经保护、抗纤维化、抗炎、抗肿瘤等,其临床应用为患者护理和人体健康做出了重要贡献^[3]。丹参原产于中国,在韩国、越南、澳大利亚等国家也被广泛种植^[4]。国内丹参的主要产区有河南、山东、陕西、山西、湖北、安徽、四川等地^[5]。

遗传多样性作为生物多样性的核心部分,是长期进化的产物,对丹参药材的利用具有重要意义,也是药用植物适应生存和进化的前提。植物各种高产、抗病、抗逆等优良性状基因以及控制有效成分代谢途径的基因构成了其基因水平上的多样性,这些遗传多样性为我们收集、保存、利用、评价植物资源提供了依据;因此遗传多样性是中药丹参种质鉴定、资源利用、引种栽培、资源保护的基础^[6]。目前,采用的丹参种源鉴定方法主要有来源鉴定法、性状鉴定法、理化鉴定法和生物鉴定法^[7]。有学者研究了 12 种丹参的性状、显微特征、理化鉴别特征,并通过化学成分定性定量及药理实验比较分析,评估了丹参种质的质量^[8]。

DNA 标记是研究植物遗传多样性的有力工具^[9],主要有叶绿体和核基因标记。学者们曾采用随机扩增多态性 DNA^[10-11]、AFLP(扩增片段长度多态性)^[12-13]、ISSR(简单重复序列间扩增标记)^[14]、叶绿体基因 SSR(简单重复序列标记)^[15]、EST-SSR(基于表达序列标签开发微卫星标记)^[16]对丹参遗传多样性进行了研究。高等植物细胞核核糖体 DNA(Nuclear Ribosomal DNA, nrDNA)是高度重复的串联序列单元,包括 1 个单元段,1 个操纵子,以及由外转录间隔区(External Transcribed Spacer, ETS)、非转录间隔区(Non-Transcribed Spacer, NTS)、18SrDNA、内转录间隔区 1(Internal Transcribed Spacer, ITS1)、5.8SrDNA、

内转录间隔区 2(ITS2) 和 28SrDNA 组成的串联重复序列^[17].

nrDNA 的非编码区为高变区, 受选择压小, 序列差异主要表现在该区上, 在近缘类群间的系统学、杂交及居群进化研究上具有一定的应用潜力^[18]. ETS 重复序列较少, 进化较快, 并且具有很高的多态性和可变性, 在遗传变异、分类及系统发育研究中具有重要的应用价值. 采用 ETS 序列对粟的起源与传播进行研究, 该区能很好地检测种内及种间多态性^[19]. 药水苏核外转录间隔区(ETS)的分析表明, 所有斯堪的纳维亚种群都有一个自发的起源, 这些种群由该物种基因定义明确的亚群组成, 与来自北欧大陆邻近地区的其他自发种群关系最密切^[20]. Thell 等^[21]根据地理位置、分类学和遗传采样, 基于包括 ETS 的 6 种 DNA 分子标记研究, 重建了东亚鼠尾草的系统关系.

丹参作为我国传统的大宗药材之一, 在临床上发挥着越来越重要的作用. 目前, 还未见有栽培丹参居群 ETS 序列的遗传多样性报道. 为了解不同栽培丹参居群的 ETS 序列遗传多样性, 为栽培丹参资源快速鉴定奠定基础, 本研究对 40 个栽培丹参居群的 ETS 序列进行了 PCR 扩增、序列比对及系统发育树构建, 探明了不同栽培丹参居群间的系统发育关系.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为来自国内不同地区的 40 种栽培丹参居群(表 1). 本实验室前期对种子形状、大小、田间栽培或钵钵培育植物的叶片、花形、花色、收获种子等农艺性状进行了鉴定, 确认均为丹参材料.

表 1 本研究使用的丹参材料

编号	地区	居群代码	来源	编号	地区	居群代码	来源
01	重庆	V-CQ-V-2	恒大种业	21	内蒙	R-NM-V-2	恒大种业
02	甘肃陇西	V-GSLX-V-2	丰鸿种业	22	湖南长沙	R-HNCS-V-2	恒大种业
03	北京	V-BJ-V-2	丰鸿种业	23	河北安国	R-HBAG-V-2	丰鸿种业
04	江苏	V-JS-V-1	通达种业	24	广东	B-GD-V-1	通达种业
05	吉林长春	V-JLCC-V-2	恒大种业	25	江苏	B-JS-V-1	通达种业
06	四川	V-SC-V-1	通达种业	26	四川中江	B-SCZJ-V-2	恒大种业
07	云南丽江	V-YNLJ-V-2	恒大种业	27	山东	B-SD-V-1	通达种业
08	贵州遵义	V-GZZY-V-2	恒大种业	28	安徽全椒	B-AHQJ-V-2	恒大种业
09	河北安国	V-HBAG-V-2	丰鸿种业	29	四川	B-SC-V-1	通达种业
10	广东	V-GD-V-2	恒大种业	30	四川红原	W-SCHY-W-2	自我征集
11	江西吉安	V-JXJA-V-2	恒大种业	31	陕西西安	W-SXXA-bV-2	恒大种业
12	贵州	V-GZ-V-1	通达种业	32	江苏	W-JS-V-1	通达种业
13	山东	V-SD-V-1	通达种业	33	四川	W-SC-V-1	通达种业
14	江苏沐阳	V-JSSY-V-2	恒大种业	34	福建罗源	W-FJLY-V-2	恒大种业
15	广东	V-GD-V-1	通达种业	35	河北荆门	W-HBJM-V-2	恒大种业
16	湖南永州	V-HNYZ-bV-2	自我征集	36	辽宁沈阳	W-LNSY-V-2	恒大种业
17	山东莒县	R-SDJX-V-2	恒大种业	37	云南丽江	W-YNLJ-V-2	恒大种业
18	广西	R-GX-V-2	恒大种业	38	贵州	W-GZ-V-1	通达种业
19	河南方城	R-HNFC-V-2	恒大种业	39	山东	W-SD-V-1	通达种业
20	甘肃酒泉	R-GSJQ-V-2	恒大种业	40	广东	W-GD-V-1	通达种业

1.2 试验方法

1.2.1 基因组总 DNA 提取

采用十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethyl Ammonium Bromide, CTAB)法提取丹参基因组总 DNA^[22], 经 1% 琼脂糖凝胶电泳确定其纯度, 提取的 DNA 样品置于 -20 °C 冰箱中保存.

1.2.2 PCR 扩增

采用上游引物 F(5'-ATAGAGCGCGTGAGTGGTG-3')和下游引物 R(5'-GACAAGCATATGACTG-GATCAA-3')^[23]对丹参不同栽培居群的 ETS 序列进行 PCR 扩增. PCR 扩增体系为 25 μ L: 2 \times SanTaq PCR Mix 11 μ L, F 和 R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 11 μ L. PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 PCR 产物测序

以回收、纯化的 PCR 产物为测序反应模板, 通用引物为测序引物, 由四川成都生工生物技术有限公司进行测序.

1.2.4 序列数据处理

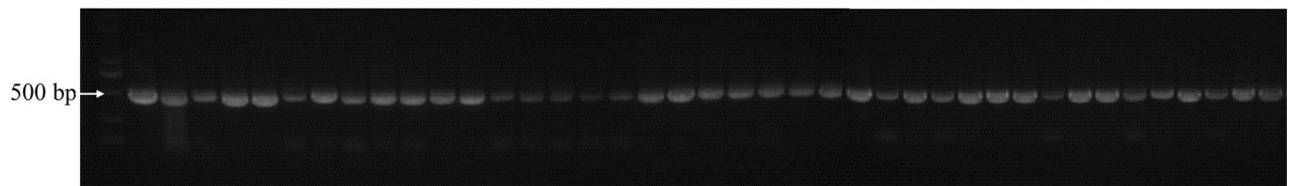
在美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)网站上将测得序列进行 BLAST 同源比对确认后, 使用 BioEdit 7.09^[24]和 Vector NTI Advance 11.5.3^[25]软件对 40 个栽培丹参居群的 ETS 序列和 GenBank 中已登录的丹参 ETS 序列(MG824345.1)进行比对, 使用分子进化遗传分析软件 MEGA 7.0 进行分析及系统发育树的构建^[26], 使用 DNASP v5 进行多态性位点、遗传多样性指数和中性检测分析^[27].

2 结果与分析

2.1 不同栽培丹参居群 ETS 序列的 PCR 扩增

以丹参基因组总 DNA 为模板, 对其 ETS 序列进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. 结果显示, ETS 扩增产物均为 500 bp 左右的单带, 条带清晰, 特异性好(图 1).

M 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



M: DL5000; 材料编号见表 1.

图 1 不同栽培丹参居群 ETS 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

2.2 丹参 ETS 序列特征

获得的 40 份丹参材料的 ETS 序列经比对整理后, 提交 GenBank 获得了相应的收录号(表 2). 40 个栽培丹参居群的 ETS 序列长为 421~433 bp, GC 含量为 56.8%~62.8%, 向 GC 方向偏斜. 其中, 居群 B-GD-V-1 和 W-SD-V-1 的长度为 421 bp, 居群 B-SD-V-1 和 W-SCHY-W-2 的长度为 423 bp, 居群 W-GZ-V-1 和 W-GD-V-1 的长度为 431 bp, 居群 B-JS-V-1 和 W-JS-V-1 的长度为 433 bp, 其余 32 个栽培丹参居群 ETS 序列长度为 422 bp; GC 含量最高的是居群 V-GSLX-V-2, 含量最低的是居群 B-JS-V-1 和 W-JS-V-1, 其余栽培丹参居群 GC 含量在 56.8%~62.8% 范围内有细微差异(表 2).

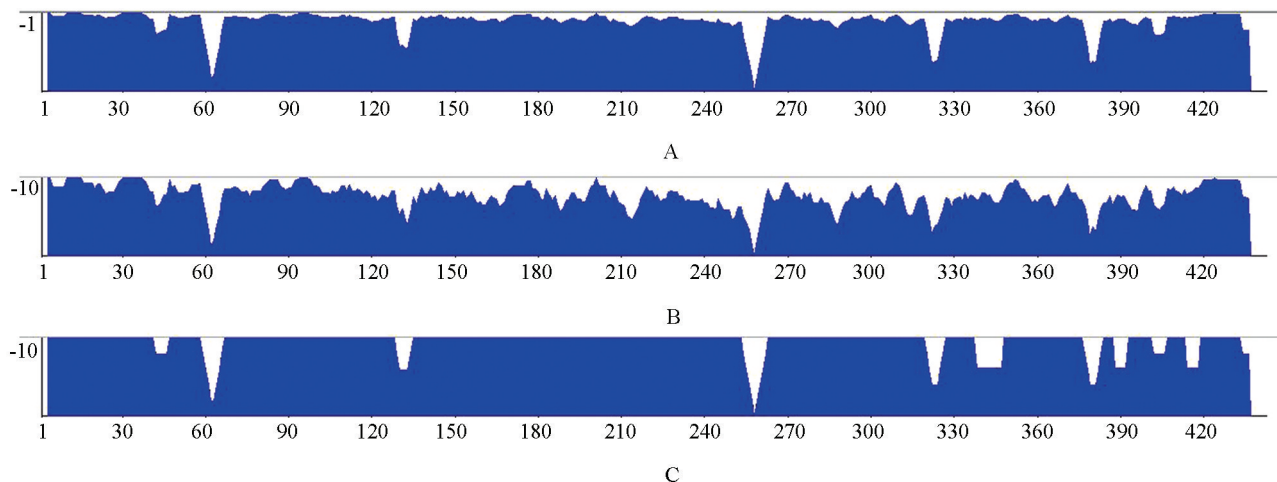
表 2 丹参 ETS 序列的基础数据

编号	居群代码	长度* / bp	GC [†] / %	收录号	编号	居群代码	长度* / bp	GC [†] / %	收录号
01	V-HBAG-V-2	422/454	62.5	MW699307	21	B-SCZJ-V-2	422 /457	62.5	MW699327
02	V-CQ-V-2	422/457	62.5	MW699308	22	B-SD-V-1	423 /469	60.1	MW699328
03	V-JXJA-V-2	422 /470	59.7	MW699309	23	R-HBAG-V-2	422 /455	62.5	MW699329
04	V-JLCC-V-2	422 /455	62.5	MW699310	24	R-HNFC-V-2	422 /455	62.5	MW699330
05	V-JSSY-V-2	422 /455	62.5	MW699311	25	R-SDJX-V-2	422 /459	62.5	MW699331
06	V-GZ-V-1	422 /456	62.5	MW699312	26	R-GX-V-2	422 /455	62.5	MW699332
07	V-GD-V-1	422 /454	62.5	MW699313	27	R-NM-V-2	422 /457	62.5	MW699333
08	V-GD-V-2	422 /457	62.5	MW699314	28	R-HNCS-V-2	422 /455	62.5	MW699334
09	V-GSLX-V-2	422 /457	63.0	MW699315	29	R-GSJQ-V-2	422 /455	62.5	MW699335
10	V-BJ-V-2	422 /456	62.5	MW699316	30	W-SCHY-W-2	423 /457	61.5	MW699336
11	V-YNLJ-V-2	422 /455	62.5	MW699317	31	W-SXXA-bV-2	422 /458	62.5	MW699337
12	V-GZZY-V-2	422 /457	62.5	MW699318	32	W-LNSY-V-2	422 /445	62.5	MW699338
13	V-SC-V-1	422 /466	61.8	MW699319	33	W-FJLY-V-2	422 /443	62.5	MW699339
14	V-SD-V-1	422 /466	58.1	MW699320	34	W-GZ-V-1	431 /466	57.6	MW699340
15	V-JS-V-1	422 /466	62.1	MW699321	35	W-SD-V-1	421 /455	60.4	MW699341
16	V-HNYZ-bV-2	422 /457	62.5	MW699322	36	W-JS-V-1	433 /457	56.8	MW699342
17	B-SC-V-1	422 /458	62.5	MW699323	37	W-SC-V-1	422 /457	62.5	MW699343
18	B-AHQJ-V-2	422 /457	62.5	MW699324	38	W-GD-V-1	431 /470	56.9	MW699344
19	B-GD-V-1	421 /473	61.1	MW699325	39	W-HBJM-V-2	422 /457	62.8	MW699345
20	B-JS-V-1	433 /467	56.8	MW699326	40	W-YNLJ-V-2	422 /458	62.3	MW699346

注: * 比对序列/扩增产物序列长度; † 比对序列含量。

2.3 不同栽培丹参居群 ETS 序列的核苷酸变异分析

通过对 40 个栽培丹参居群 ETS 序列进行排序, 经 Vector NTI Advance 11.5.3 软件比对及人工整理, 结果显示: 40 个栽培丹参居群 ETS 序列的相似度为 95.5%, 一致性为 41.0%(图 2)。存在 241 个 SNP 变异位点, 变异率高达 54.8%; 有 205 个简约信息位点, 变异位点丰富。



横轴为序列长度, 纵轴为计算的分数。

图 2 不同栽培丹参居群 ETS 相似(A)、一致(B)及共有位点(C)分数

丹参 ETS 序列中 16 个居群有核苷酸变异位点, 其余 24 个居群没有核苷酸变异. 变异位点丰富(100 个以上)的居群有 W-GZ-V-1, V-SD-V-1W, W-GD-V-1, B-JS-V-1, W-JS-V-1 和 B-SD-V-1; 变异位点数中等(10~100 个)的居群有 W-SD-V-1, B-GD-V-1, V-JXJA-V-2 和 W-SCHY-W-2; 变异位点较少(低于 10 个)的居群有 V-SC-V-1, V-GD-V-1, V-JS-V-1, W-YNLJ-V-2, V-GSLX-V-2 和 W-HBJM-V-2(表 3).

表 3 栽培丹参居群 ETS 序列核苷酸变异位点统计分析

居群代码	变异位点数	转换位点数	颠换位点数	插入位点数	缺失位点数
W-GZ-V-1	145	71	57	13	4
V-SD-V-1	140	44	94	1	1
W-GD-V-1	126	66	43	13	4
W-JS-V-1	124	64	45	2	13
B-JS-V-1	124	64	45	2	13
B-SD-V-1	108	29	78	1	0
W-SD-V-1	51	14	36	0	1
B-GD-V-1	39	10	28	0	1
V-JXJA-V-2	27	5	20	1	1
W-SCHY-W-2	10	3	6	1	0
V-SC-V-1	8	1	7	0	0
V-GD-V-1	4	2	2	0	0
V-JS-V-1	4	2	2	0	0
W-YNLJ-V-2	3	1	2	0	0
V-GSLX-V-2	2	0	0	0	0
W-HBJM-V-2	1	0	1	0	0

通过 MEGA 软件找到 ETS 序列的 24 个核苷酸替代模型, 分别为 HKY+I, HKY+G, T92+I, HKY, HKY+G+I, TN93+I, T92+G, TN93, T92, TN93+G, T92+G+I, TN93+G+I, JC+G, JC+I, K2+G, K2+I, JC, JC+G+I, K2, K2+G+I, GTR+I, GTR+G, GTR 和 GTR+G+I. 根据贝叶斯准则(Bayesian Information Criterion, BIC), 其中 HKY+I 模型的 BIC 分数最低, 为 ETS 序列的最佳替代模型. 栽培丹参居群 ETS 序列转换率和颠换率分别为 40.1% 和 59.9%, 其转换率低于颠换率(图 3).

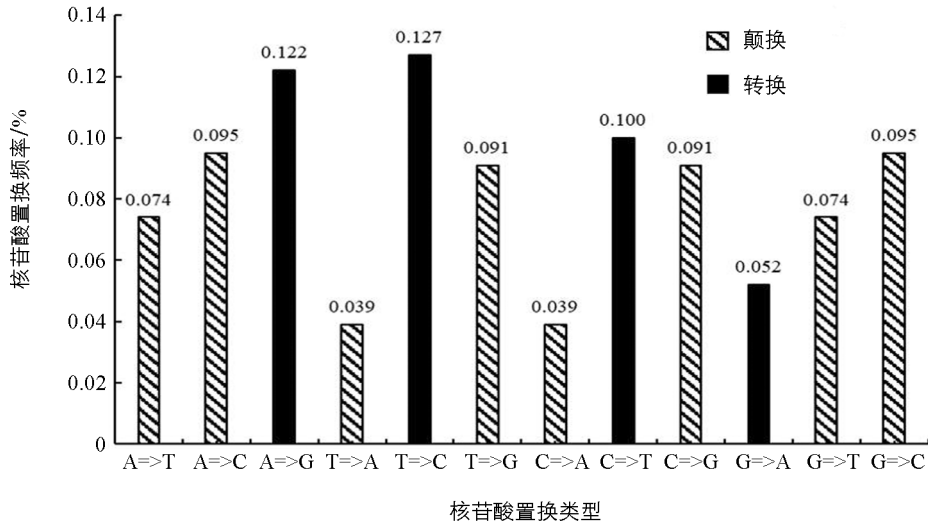


图 3 栽培丹参居群 ETS 序列核苷酸置换频率

2.4 遗传多样性分析

通过 DNASP 软件, 对 40 个栽培丹参居群的遗传多样性进行分析获得 16 种单倍型, 单倍型多样性指数(Haplotype Diversity, Hd)为 0.640, 核苷酸多样性指数(Nucleotide Diversity Index, π)为 0.112, 单倍型多样性方差(Variance of Haplotype Diversity, Vh)为 0.008, 单倍型多样性标准差(Standard Deviation of Haplotype Diversity, Sh)为 0.089. 中性检验表明 ETS 序列在 $p > 10\%$ 水平上均不具有统计学意义, 符合中性进化模型.

2.5 遗传距离分析

利用最大似然法对 ETS 序列的遗传距离进行估算. 结果表明: 在标准误估计值为 0.052 的情况下, 40 个栽培丹参居群的总平均遗传距离为 0.151. 24 个没有核苷酸变异位点的居群用 C24 表示. 16 个具有 SNP 指纹的栽培丹参居群及其之间的遗传距离表明: 居群 W-SD-V-1 与居群 B-JS-V-1 和 W-JS-V-1 的遗传距离最大, 达到 0.648, 说明居群 W-SD-V-1 与居群 B-JS-V-1 和 W-JS-V-1 的亲缘关系较远, 居群间遗传多样性高; 而居群 W-JS-V-1 与 B-JS-V-1 的遗传距离最小, 数值为 0, 说明两个居群间的亲缘关系较近, 居群间遗传多样性低(表 4).

表 4 栽培丹参居群间 ETS 序列的遗传距离

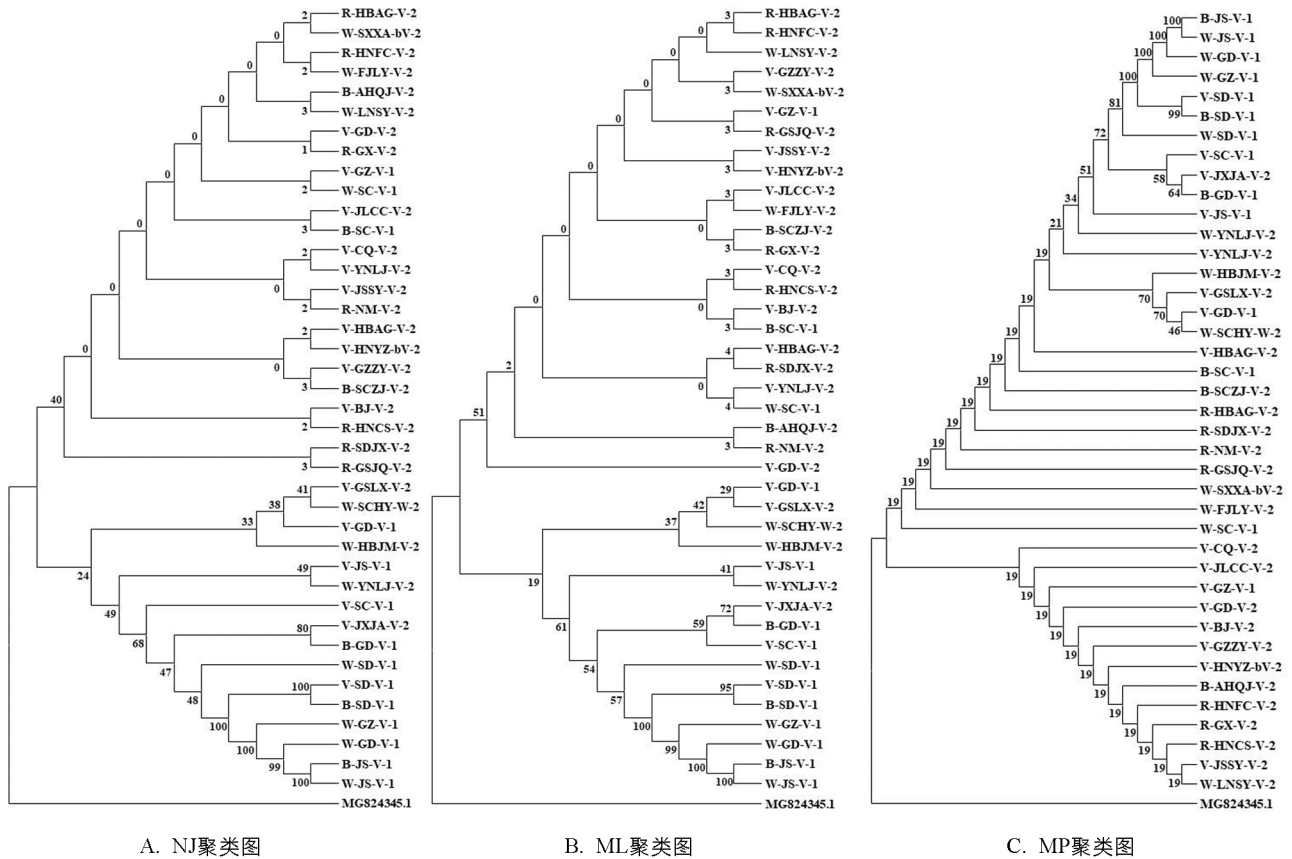
居群编号	C24	V-JXA-V-2	V-GD-V-1	V-GSLX-V-2	V-SC-V-1	V-SD-V-1	V-JS-V-1	B-GD-V-1	B-JS-V-1	B-SD-V-1	W-SCHY-W-2	W-GZ-V-1	W-SD-V-1	W-JS-V-1	W-GD-V-1	W-HBJM-V-2	W-YNLJ-V-2
C24		0.012	0.005	0.003	0.007	0.111	0.005	0.018	0.105	0.128	0.007	0.106	0.022	0.105	0.100	0.002	0.004
V-JXA-V-2	0.054		0.013	0.013	0.009	0.108	0.013	0.013	0.114	0.125	0.014	0.106	0.027	0.114	0.106	0.012	0.013
V-GD-V-1	0.010	0.060		0.003	0.009	0.109	0.007	0.018	0.104	0.126	0.007	0.105	0.022	0.104	0.100	0.004	0.006
V-GSLX-V-2	0.005	0.060	0.005		0.008	0.110	0.006	0.018	0.105	0.127	0.006	0.106	0.022	0.105	0.100	0.002	0.005
V-SC-V-1	0.020	0.033	0.030	0.025		0.109	0.008	0.015	0.115	0.126	0.010	0.110	0.022	0.115	0.110	0.008	0.008
V-SD-V-1	0.486	0.482	0.487	0.492	0.483		0.111	0.104	0.093	0.020	0.108	0.057	0.114	0.093	0.080	0.110	0.111
V-JS-V-1	0.010	0.060	0.020	0.015	0.025	0.495		0.017	0.104	0.128	0.008	0.105	0.021	0.104	0.100	0.006	0.005
B-GD-V-1	0.102	0.065	0.107	0.107	0.079	0.471	0.096		0.129	0.122	0.020	0.114	0.030	0.129	0.121	0.018	0.018
B-JS-V-1	0.500	0.518	0.491	0.496	0.523	0.402	0.520	0.600		0.129	0.105	0.018	0.146	0.000	0.007	0.105	0.105
B-SD-V-1	0.506	0.517	0.507	0.512	0.507	0.107	0.515	0.499	0.532		0.126	0.094	0.128	0.129	0.119	0.128	0.128
W-SCHY-W-2	0.020	0.076	0.020	0.015	0.041	0.487	0.030	0.125	0.492	0.511		0.106	0.022	0.105	0.100	0.006	0.008
W-GZ-V-1	0.490	0.491	0.481	0.486	0.502	0.287	0.509	0.548	0.096	0.408	0.482		0.130	0.018	0.015	0.106	0.106
W-SD-V-1	0.131	0.168	0.140	0.134	0.131	0.499	0.122	0.174	0.648	0.514	0.134	0.599		0.146	0.134	0.022	0.021
W-JS-V-1	0.500	0.518	0.491	0.496	0.523	0.402	0.520	0.600	0.000	0.532	0.492	0.096	0.648		0.007	0.105	0.105
W-GD-V-1	0.481	0.493	0.472	0.477	0.504	0.371	0.500	0.572	0.018	0.506	0.473	0.076	0.613	0.018		0.100	0.100
W-HBJM-V-2	0.002	0.057	0.007	0.002	0.023	0.487	0.012	0.105	0.501	0.507	0.018	0.491	0.131	0.501	0.482		0.005
W-YNLJ-V-2	0.007	0.062	0.018	0.012	0.028	0.486	0.010	0.102	0.515	0.506	0.028	0.500	0.122	0.515	0.496	0.010	

注: C24 为没有核苷酸变异位点的 24 个居群; 标准误差估计值显示在对角线上方.

2.6 基于丹参 ETS 序列的系统发育关系

根据获得的栽培丹参居群 ETS 序列, 以 GenBank 下载的湖北鼠尾草 ETS 序列(MG824345.1)为外群, 用邻接法(NJ)、最大似然法(ML)和最大简约法(MP)3 种方法构建系统进化树, 考察其系统发育关系. 结果表明: 3 种进化树的拓扑结构大致相同. 最大似然法和邻近连接法构建的进化树显示, 40 个栽培丹参居

群聚类在 2 个系支上, 相同的 24 个居群聚类在一个系支上, 另外相同的、具有变异位点的 16 个居群(表 3) 聚类在另一系支上(图 4A, B); 而最大简约法构建的进化树显示, 40 个栽培丹参居群聚在 2 个系支上, 27 个居群聚类在一个系支上, 另外 13 个居群聚类在另一系支上(图 4C). 可见, 最大似然法和邻近连接法更适合丹参 ETS 聚类分析.



A: NJ 聚类图; B: ML 聚类图; C: MP 聚类图.

图 4 基于丹参 ETS 序列的系统树

3 结论与讨论

ETS 序列进化较快且具有较高的多态性和可变性, 在遗传变异、分类及系统发育研究中有着重要的用途. 由于 ETS 序列难以找到合适的通用引物扩增整个区域, 所以在系统学研究中的例子比较少^[28]. 本研究采用应用于辣椒的 ETS 引物^[23]首次成功扩增了丹参的 ETS 序列, 其长度为 421~433 bp, GC 含量为 56.8%~62.8%; 发现 40 个栽培丹参居群的 ETS 序列共有 241 个 SNP 变异位点, 变异率高达 54.8%, 有 205 个简约信息位点, 与同属唇形科植物的 ETS 研究结果相似^[29-30]; 还发现基于 ETS 序列的 SNP 指纹可鉴定 14 个栽培丹参居群, 但不足以区别所有栽培丹参居群, 因此笔者认为准确可靠的分子鉴定可能依赖于从多种 DNA 分子标记上寻找可靠的复合分子标记.

本研究通过 MEGA 软件找到 ETS 序列的最佳核苷酸替代模型为 HKY+I, 发现核苷酸转换率 (40.1%) 低于颠换率 (59.9%), 而相对较高的核苷酸置换率说明丹参种间和种内具有较高的遗传变异性^[31]; 丹参 ETS 序列的单倍体多样性指数 Hd 为 0.64 (>0.5), 表明栽培丹参的遗传资源丰富, 这与基于 EST-SSR 标记的丹参遗传多样性研究结果一致^[16]. 中性检验结果表明 ETS 序列在 $p > 10\%$ 的水平不

具有统计学意义,符合中性进化模型,表明栽培丹参居群近期并没有发生扩张现象。

基于 ETS 序列的最大似然法、邻近连接法和最大简约法聚类结果表明,40 个栽培丹参居群聚类在两个系支上,3 种进化树的拓扑结构大致相同,最大似然法和邻近连接法聚类结果一致,更适合丹参 ETS 聚类分析。研究结果为进一步的栽培丹参分子系统学研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] CHAN K, CHUI S H, WONG D Y L, et al. Protective Effects of Danshensu from the Aqueous Extract of *Salvia Miltiorrhiza* (Danshen) Against Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction [J]. *Life Sciences*, 2004, 75(26): 3157-3171.
- [2] 陈昆圆, 文艺, 许相奎, 等. 河南省丹参根结线虫病原种类鉴定 [J]. *河南农业大学学报(首发)*. DOI: 10. 16445/j. cnki. 1000-2340. 20220906. 001.
- [3] SU C Y, MING Q L, RAHMAN K, et al. *Salvia Miltiorrhiza*: Traditional Medicinal Uses, Chemistry, and Pharmacology [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, 13(3): 163-182.
- [4] SHENG S J, PANG E, XUE C, et al. Seasonal Variations in Bioactive Marker Contents in Australian-Grown *Salvia Miltiorrhiza* Roots [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2009, 6(4): 551-560.
- [5] 赵宝林. 丹参药材道地性探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(12): 3101-3102.
- [6] 马小军, 肖培根. 种质资源遗传多样性在药用植物开发中的重要意义 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(10): 579-581, 600.
- [7] 李晗, 郭耀武. 中药鉴定技术的研究进展 [C] // 中华中医药学会第十届中药鉴定学术会议暨 WHO 中药材鉴定方法和技术研讨会论文集. 西安: 中华中医药学会, 2010.
- [8] 徐国钧, 徐璐珊, 施大文, 等. 常用中药材品种整理和质量研究(南方专题组) [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2005.
- [9] KENENI G, BEKELE E, IMTIAZ M, et al. Genetic Diversity and Population Structure of Ethiopian Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Germplasm Accessions from Different Geographical Origins as Revealed by Microsatellite Markers [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 30(3): 654-665.
- [10] 郭宝林, 林生, 冯毓秀, 等. 丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究 [J]. *中草药*, 2002, 33(12): 1113-1116.
- [11] 石婧, 刘海涛, 郝文耀, 等. 内蒙古产丹参的随机扩增多态性 DNA 研究 [J]. *医药导报*, 2010, 29(4): 441-442.
- [12] 唐晓清, 王康才, 陈暄, 等. 丹参不同栽培农家类型的 AFLP 鉴定 [J]. *药物生物技术*, 2006, 13(3): 182-186.
- [13] 温春秀, 吴志明, 田伟, 等. 丹参种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. *华北农学报*, 2007, 22(S2): 122-125.
- [14] 宋振巧, 王建华, 王洪刚, 等. 山东丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 不同地理居群的遗传多样性 [J]. *生态学报*, 2008, 28(11): 5370-5376.
- [15] 王海, 何冬梅, 王睿婷, 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): 9985-9989.
- [16] 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.
- [17] 王英男. 基于核糖体 DNA ITS 和 ETS 序列的糜子起源研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [18] HILLIS D M, DIXON M T. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference [J]. *The Quarterly Review of Biology*, 1991, 66(4): 411-453.
- [19] FUKUNAGA K, ICHITANI K, KAWASE M. Phylogenetic Analysis of the rDNA Intergenic Spacer Subrepeats and Its Implication for the Domestication History of Foxtail Millet, *Setaria Italica* [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*

Theoretische Und Angewandte Genetik, 2006, 113(2): 261-269.

- [20] THELL A, HANSSON M, PERSSON P E, et al. ETS and Plastid Sequence Data Indicate a Spontaneous Origin of Scandinavian Betony, *Betonica Officinalis* L [J]. *Biologia Futura*, 2019, 70: 1-22.
- [21] HU G X, TAKANO A, DREW B T, et al. Phylogeny and Staminal Evolution of *Salvia* (Lamiaceae, Nepetoideae) in East Asia [J]. *Annals of Botany*, 2018, 122(4): 649-668.
- [22] AMANI J, KAZEMI R, ABBASI A R, et al. A Simple and Rapid Leaf Genomic DNA Extraction Method for Polymerase Chain Reaction Analysis [J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2011, 9(1): 69-71.
- [23] FENG S J, NIU J S, LIU Z S, et al. Genetic Diversity and Evolutionary Relationships of Chinese Pepper Based on nrDNA Markers [J]. *Forests*, 2020, 11(5): 543.
- [24] ALZOHAIRY A M. BioEdit: an Important Software for Molecular Biology [J]. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2011, 2(1): 60-61.
- [25] LU G Q, MORIYAMA E N. Vector NTI, a Balanced All-in-one Sequence Analysis Suite [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(4): 378-388.
- [26] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7. 0 for Bigger Datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [27] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP V5: a Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [28] ROALSON E H, FRIAR E A. Phylogenetic Relationships and Biogeographic Patterns in North American Members of *Carex* Section *Acrocystis* (Cyperaceae) Using nrDNA ITS and ETS Sequence Data [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2004, 243(3/4): 175-187.
- [29] DENG T, NIE Z L, DREW B T, et al. Does the Arcto-Tertiary Biogeographic Hypothesis Explain the Disjunct Distribution of Northern Hemisphere Herbaceous Plants? the Case of *Meehania* (Lamiaceae) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117171.
- [30] DREW B, SYTSMA K. Testing the Monophyly and Placement of *Lepechinia* in the Tribe *Mentheae* (Lamiaceae) [J]. *Systematic Botany*, 2011, 36(4): 1038-1049.
- [31] NEWTON A C, ALLNOT T R, GILLIESA C M, et al. Molecular Phylogeography, Intraspecific Variation and Conservation of Tree Species [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 1991, 14(4): 140-145.

责任编辑 夏娟