DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202006045

刘畅, 潘婕, 刘雄伟, 等. 基于 SLAF-seq 技术的苗药八爪金龙遗传分析 [J]. 广西植物, 2021, 41(7): 1145-1154. LIU C, PAN J, LIU XW, et al. Genetic analysis in Radix *Ardisia* based on SLAF-seq technology [J]. Guihaia, 2021, 41(7): 1145-1154.



基于 SLAF-seq 技术的苗药八爪金龙遗传分析

刘 畅,潘 婕,刘雄伟,丁晶鑫,周 英*

(贵州中医药大学药学院,贵阳 550025)

摘 要:为探究苗药八爪金龙群体遗传进化和亲缘关系的远近,该研究利用简化基因组测序技术(SLAF-seq)对 42 份八爪金龙样品进行测序,获得多态性 SLAF 标签。同时采用 GATK 和 SAMtools 软件在多态性 SLAF 中检测单核苷酸多态性(SNP)分子标记,并利用 SNP 分子标记分析八爪金龙样品间的遗传分化关系。结果表明:(1)42 份八爪金龙共获得 246.35 Mb reads,测序质量值 Q30 的平均值为 95.66%,GC 含量的平均 值为41.14%。(2)通过生物信息学的分析,获得 1 769 265 个 SLAF 标签,其中 379 829 个多态性 SLAF 标签,共开发 2 299 640 个 SNPs 分子标记。(3)利用开发的 SNPs 数据构建八爪金龙的系统发育树,42 份八爪 金龙分成两个大的类群。第一类群为细柄百两和原变种百两金;第二类群由贵州朱砂根、红凉伞、湖北朱砂 根和江西朱砂根组成。江西朱砂根与其余群体关系较远,有明显的分群现象。该研究从基因组水平揭示不 同地区八爪金龙资源之间的遗传关系,为八爪金龙种质资源的鉴定和遗传多样性分析提供了理论基础,所 开发的 SNP 位点可进一步用于挖掘与品质、抗逆性等相关的基因。

关键词:八爪金龙, SLAF-seq, SNP,遗传进化,亲缘关系 中图分类号: 0943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)07-1145-10

Genetic analysis in Radix Ardisia based on SLAF-seq technology

LIU Chang, PAN Jie, LIU Xiongwei, DING Jingxin, ZHOU Ying*

(College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou 550025, China)

Abstract: In order to explore the genetic evolution and relationship in Radix *Ardisia*, the 42 materials were used to sequencing base on specific loci amplified fragment sequencing (SLAF-seq). Based on polymorphic SLAF tags, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified by the GATK and SAMtools softwares, and to analysis the genetic differentiation. The results were as follows: (1) A total of 246.35 Mb reads data were obtained by SLAF-seq, the average of Q30 and GC content was 95.66% and 41.14%, respectively. (2) In total, 1 769 265 high quality SLAF tags were obtained, including 379 829 polymorphic SLAF tags, and a total of 2 299 640 SNPs were obtained. (3) Through the

收稿日期: 2020-09-25

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1708100);贵州省高层次创新型人才培养项目(黔科合人才 [2015]4032 号);贵州 省科技厅学术新苗项目(黔科合平台人才 [2018]5766 号-9);贵州中医药大学博士启动基金([2019]04 号) [Supported by the National Key Research and Development Programs (2018YFC1708100); Guizhou Province "Hundred" Innovative Talents Project (QKHRC [2015]4032); Guizhou Provincial Department of Science and Technology Academic Seedling Project(QKHPTRC [2018]5766-9); Doctor foundation of Guizhou University of Chinese Medicine([2019]04]]。

作者简介:刘畅(1988-),博士,讲师,主要从事分子生药学研究,(E-mail)19liuchang@163.com。

通信作者:周英,教授,主要从事中药药效物质基础与质量控制研究,(E-mail)yingzhou71@126.com。

SNPs data, Radix *Ardisia* were divided into two groups. The first group contained BLX1-8 and BLY1-8, the second group contained ZSG1-8, HL, ZSH1-6 and ZSJ1-6. The results revealed the genetic relationships in the genomic level and provided theoretical basis for germplasm identification and genetic diversity analysis of Radix *Ardisia* and developed SNPs could be further used for excavating the gene related resistant, quality and so on.

Key words: Radix Ardisia, SLAF-seq, SNP, genetic evolution, genetic relationship

八爪金龙为贵州省苗族常用药物,其药用部 位为根及根茎,具有清热解毒、祛风除湿、散瘀止 痛等功能,被苗族奉为喉科良药,是苗药验方开喉 剑喷雾剂(赵欧等,2016)和养阴口香合剂(吴筑 华,2012)的主要成分。八爪金龙药材来源多样, 其基原植物为紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属 (Ardisia) 植物朱砂根(A. crenata)、红凉伞(A. crenata var. bicolor)、百两金(A. crispa)、大叶百两 金(A. crispa var. amplifolia) 和细柄百两金(A. crispa var. dielsii) (中国科学院中国植物志编辑委 员会, 2002)。研究表明,不同来源的八爪金龙药 材化学成分存在差异,其主要成分岩白菜素的含 量在不同来源的八爪金龙中存在差异,朱砂根中 的皂苷数量远远丰富于百两金(Liu et al., 2016); 而百两金中发现的4种黄酮类在朱砂根未被鉴定 到(黄伟等,2010)。化学成分的形成与品质、产 地、生态等密切相关,而化学成分决定其质量的好 坏及其药理作用。

八爪金龙资源主要以野生为主,其地理分布、 生态环境、生长周期、采收与产地初加工存在的差 异,为八爪金龙用药准确及质量均一带来了难题; 其药材使用比较混乱,也使得质量难以控制,严重 影响其质量控制以及临床使用的"疗效同等性"。 因此,建立有效的鉴定方法,对其遗传结构进行深 入分析,明确八爪金龙的起源和亲缘关系,优选出 质量较好且稳定的居群,保证其正确使用,对于规 范八爪金龙流通和临床有效利用具有重要的指导 意义。目前主要的鉴别方法有性状鉴别、显微鉴 别、DNA条形码等(陈新莲等,2017;陈文婷等, 2020;潘婕等,2020),但这些方法具有片面性强或 实验过程复杂等缺点。高通量测序的技术,如简 化基因组测序(SLAF-seq)已经被运用于药用植物 的种质资源鉴定、遗传定位分析、多态性分析、系 统进化分析等(Liu et al., 2016; Du et al., 2019)。

本研究利用 SLAF-seq 技术对贵州、湖北、江西 3 个地点的 42 份八爪金龙种质资源进行测序,获 得 SLAF 多态性标签,应用 GATK 和 SAMtools 软件 对 SNP 进行检测。基于 SNP 分子标记,利用生物 信息学进行系统进化树、群体结构和 PCA 分析,从 基因组水平揭示不同个体之间的遗传分化关系, 评估八爪金龙遗传资源的亲缘关系,为八爪金龙 种质资源的鉴定和育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

42 份八爪金龙种质资源来源于贵州、湖北和 江西,其中贵州 30 份(8 份原变种百两金 BLY、8 份细柄百两金 BLX、8 份朱砂根 ZSG、6 份红凉伞 HL),湖北恩施朱砂根 ZSH 6 份,江西武功山朱砂 根 ZSJ 6 份,对叶片形态进行拍照观察。具体分布 地点如表 1 所示。

表 1 42 份八爪金龙种质资源来源

Table 1 Sources of 42 Radix Ardisia

样品 Sample	样品类型 Sample type	数量 Number	来源 Source
原变种百两金(BLY)	叶片	8	贵州贵阳
Ardisia crispa var. crispa	Leaf		Guiyang, Guizhou
细柄百两金(BLX)	叶片	8	贵州贵阳
Ardisia crispa var. dielsii	Leaf		Guiyang , Guizhou
朱砂根(ZSG)	叶片	8	贵州贵阳
Ardisia crenata	Leaf		Guiyang , Guizhou
红凉伞(HL)	叶片	6	贵州贵阳
Ardisia crenata var. bicolor	Leaf		Guiyang , Guizhou
朱砂根(ZSH)	叶片	6	湖北恩施
Ardisia crenata	Leaf		Enshi, Hubei
朱砂根(ZSJ)	叶片	6	江西武功山
Ardisia crenata	Leaf		Wugongshan, Jiangxi

1.2 基因组 DNA 的制备

取约40 mg八爪金龙叶片,用75% 医用酒精 棉球擦拭叶片,将其剪碎后,加入液氮研磨,利用 试剂盒提取八爪金龙基因组总 DNA,用1%琼脂糖 凝胶电泳和 Nanodrop 2000 检测八爪金龙基因组 DNA 的质量和浓度。 由于八爪金龙目前尚无基因组序列信息发 布,同时也无其近缘物种的基因组作参考,根据八 爪金龙基因组的大小以及 GC 含量等信息。选取 水稻日本晴(Oryza sativa ssp. japonica)参考基因组 进行酶切预测,选择最适酶切方案,以期获得足够 标签数的酶切片段(SLAF 标签)(Davey et al., 2013)。选取 HaeIII+ScaI-HF 酶进行酶切,对质量 合格的八爪金龙个体基因 DNA 分别进行酶切。 将酶 切片段的 3'端加 A,加 Dual-index 接头 (Kozich et al., 2013),然后进行 PCR 扩增、纯化、 建库,质检合格的文库,利用 Illumina HiSeq 进行 测序。

1.4 SLAF 标签和 SNP 标记的开发

利用 Dual-index 识别测序得到的原始数据,获 得样品的 reads,对低质量的 reads 及 read 接头进 行过滤,获得高质量的 reads。对高质量的 reads 进 行聚类分析,聚在一起的为同一个 SLAF 标签,其 不同个体间序列的差异为多态性 SLAF 标签。以 测序深度最高的 SLAF 标签序列作为参考序列,利 用 BWA 软件(Li et al., 2009)将高质量的 reads 比 对到参考基因组上,结合 GATK(McKenna et al., 2010)和 SAMtools(Li et al., 2009)软件计算 SNP 分子标记,取两个软件的交集得到最终的 SNP 分 子标记,MAF > 0.05 的 SNP 被认为是代表性 的 SNP。

1.5 遗传结构分析

将具有代表性的高质量 SNP 使用 MEGA X (Kumar et al., 2018)软件,基于邻接法(neighborjoining),采用 Kimura 2-parameter 模型,bootstrap 重 复 1 000 次,构建各样品的系统发育树。基于 SNP 数据,利用 admixture 软件(Alexander et al., 2009),分析样品的群体结构,假设样品的分群数(K值)为1~10,进行聚类分析,利用交叉验证法验证聚类结果,交叉验证错误率最小时为最佳分 群数。同时利用 EIGENSOFT 软件(Price et al., 2006),进行主成分分析(principal components analysis)(PCA),得到样品的主成分聚类情况。

2 结果与分析

2.1 八爪金龙的形态特征

苗药八爪金龙由朱砂根、红凉伞、百两金和细

柄百两金等的根茎加工而成。朱砂根(ZS)、红凉 伞(HL)、原变种百两金(BLY)及细柄百两金 (BLX)在叶片形态上存在差异,细柄百两金叶片 较狭窄,朱砂根的叶片边缘有齿,红凉伞叶片背面 是红色的(图1)。百两金及其变种主要区别在于 叶片长度及宽度。朱砂根变种红凉伞的叶背、花 梗、花萼及花瓣均带紫红色(图1)。

2.2 建库评估

利用 SLAF-predict 软件对八爪金龙基因组进 行酶切方案预测,选择 Hae III + ScaI-HF 酶对八爪 金龙基因组进行酶切, SLAF 标签长度为 414~464 bp,预测得到 222 509 个 SLAF 标签(表 2)。将水 稻日本晴的测序 reads 与其参考基因组进行比对, 水稻日本晴双端比对率为 96.96%,酶切比例为 95.79%(表 3)。

2.3 测序数据统计与评估

经 Illumina HiSeq 测序平台进行测序,共获得 246.35 Mb reads,测序后各样品的 reads 数目在 1 491 644~11 923 328 bp 范围内(图 2)。测序质 量值 Q30 平均值为 95.66%,测序碱基错误率低, 所获数据合格;测序获得 GC 含量平均值为 41.14%,达到测序要求。

2.4 SLAF 标签与 SNP 标记的鉴定

通过序列分析,从 42 份八爪金龙中共获得了 1 769 265 个 SLAF 标签(表 4)。标签的平均测序 深度为 26.48,鉴定到 379 829 个多态性 SLAF 标 签,对多态性 SLAF 标签进行分析,共开发得到 2 299 640 个 SNP 位点(表 4)。

2.5 系统发育分析

基于开发的 2 299 640 个 SNP,采用 Kimura 2parameter 模型,构建所有个体的 NJ 系统发育树 (图 3)。42 份样品可分成 2 个大的类群,第一类 群由 细柄 百两金(BLX1-8)和原变种百两金 (BLY1-8),显示它们之间有更近的亲缘关系,细 柄百两金可能由原变种百两金上溯而来。第二类 群由贵州朱砂根(ZSG1-8)、红凉伞(HL)、湖北朱 砂根(ZSH1-6)和江西朱砂根(ZSJ1-6)组成,表 明它们之间有较近的亲缘,其分化有着明显的地 域特征。

2.6 遗传结构分析

基于开发出的 2 299 640 个 SNP 位点,通过 admixture 软件分析群体结构。K 值为 1~10 的聚 类情况(图 4)及各个 K 值对应的交叉验证错误率

表 2	根据酶切万案设计预测相关信息
Table 2	Information prediction according to the

enzyme digestion method

酶	插入片段大小	SLAF 个数	
Enzyme	Insert size	SLAF number	
Hae III +ScaI-HF	414~464	222 509	

表 3 水稻日本晴测序读长比对结果统计表

Table 3 Alignment results in Oryza sativa ssp. japonica

样品 Sample	双端比对 Paired- end mapped reads (%)	未比对 Unmapped reads (%)	正常酶 切比例 Normal digestion proportion (%)	部分酶 切比例 Part digestion proportion (%)
水稻日本晴 Oryza sativa ssp. japonica	96.96	2.05	95.79	4.21

(图 5),交叉验证错误率最小时为最优分群组。 当 K=6时,交叉验证错误率最小,因此最佳分群 数为6,将42份八爪金龙种质资源分为6个亚组, 表明八爪金龙种间遗传差异较大,形成明显的种 群遗传分化。当 K=2时,百两金和朱砂根明显分 开;当 K=3时,朱砂根、百两金和朱砂根明显分 开;当 K=3时,朱砂根、百两金和江西武功山朱砂 根区分开;当 K=4时,将细柄百两金、原变种百两 金、江西武功山朱砂根和贵州朱砂根区分开;当 K=5时,将细柄百两金、原变种百两金、江西武功 山朱砂根、贵州朱砂根和湖北朱砂根区分开;当 K=6时,将细柄百两金、原变种百两金、江西武功 山朱砂根、贵州朱砂根、湖北朱砂根区分开和红凉 伞区分开,但存在基因渗入的情况。

2.7 PCA 分析

用 EIGENSOFT 软件对 2 299 640 个 SNP 位点 进行 PCA 分析,得到 42 份八爪金龙主成分聚类分 析结果(图 6)。通过 PCA 分析将个体聚为三维, PC1 代表第一主成分,PC2 代表第二主成分,PC3 代 表第三主成分,且 PC1、PC2、PC3 的方差贡献率分 别为 39.21%、18.58%、7.71%。从图 6 可以看出,样 品间存在差异,来自同一地方的朱砂根/百两金基 本上聚在一起,说明它们之间的亲缘关系比较近。 图中不同颜色表示所属的群体,能够反映个体的聚 类情况,群体之间的距离能够反映亲缘关系的远 近。群体之间的距离越远说明遗传背景越远,将 42 份材料大致分为 A、B、C、D 四组。A 组为原变种百 两金(除 BLY1 外); B 组为细柄百两金(除 BLX5、 BLX6、BLX8 外); C 组为贵州朱砂根(ZSG1-8)、湖 北朱砂根(ZSH)和红凉伞(HL),说明这三个种或变 种的遗传背景差异较小; D 组为江西朱砂根(ZSJ1-6),与其余群体关系较远,有明显的分群现象。

3 讨论与结论

近几年,RAPD、ISSR 等分子标记已应用到八 爪金龙种质资源的评价和遗传分析,采用 RAPD 分子标记技术对朱砂根遗传多样性进行分析,朱 砂根群体在 DNA 水平上存在着丰富的遗传多态 性(江香梅等,2006)。骆亮等(2020)分析了20 个朱砂根野生居群的255个样品的遗传多样性, 发现5条 ISSR 引物共扩增出96条多态性条带。 但由于八爪金龙无参考基因组,常规方法开发的 特异分子标记数量不多。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是一种较为有效的 分子标记(Liu et al., 2012),可用于动植物的群体 遗传和进化关系研究。赵俊生等(2016)利用 SNP 分子标记分析化橘红的种质资源,从中筛选出21 个多态性 SNP 位点,为化橘红种质资源鉴定提供 了有效的分子标记。孙清明等(2013)利用 SNP 分子标记对 363 份荔枝种质资源进行亲缘关系鉴 定,为荔枝新种质的亲本来源鉴定提供分子标记。

简化基因组测序(SLAF-seq)技术能够在无参 基因组物种中实现 SNP 特异性分子标记开发,可 用于植物遗传多样性的研究。有研究利用 SLAFseq 技术已经构建了枸杞果实和叶片性状的 SNP 高密度遗传图谱(Zhao et al., 2019)和丹参高密度 遗传连锁图(Liu et al., 2016)。Du et al. (2019)采 用 SLAF-seq 方法,对 7 个中国本地山楂属植物和 2 个欧洲、1 个北美外来山楂属植物的 53 个家系 进行了分析,共鉴定出933 450个 SNP,用于物种基 因组进化研究。姜涛等(2020)利用 SLAF-seq 测 序技术对 39 份连翘种质资源遗传多样性和 SNP 分子标记进行研究,共获得1809741个SNP分子 标记,将连翘资源分为4组,为其遗传结构分类提 供新的信息。唐晓敏等(2020)利用 SLAF-seq 技 术对广金钱草样品进行测序,开发得到 SNP 多态 标记 220 704 个,为种质保护和遗传改良提供参 考。本研究利用 SLAF-seq 技术对 42 份八爪金龙 种质资源进行测序,共开发得到 2 299 640 个 SNP

表 4 42 份样品的 SLAF 标签和 SNP 信息

Table 4 SLAF tags and SNP information of 42 samples

样品 ID Sample ID	简写 Abbreviation	SLAF 数量 SLAF number	总深度 Total depth	平均深度 Average depth	SNP 数量 SNP number	杂合率 Hetloci ratio (%)
BLY1	aa	43 042	1 382 869	32.13	21 701	15.89
BLY2	ab	207 162	3 264 971	15.76	1 049 378	10.79
BLY3	ac	316 533	10 843 644	34.26	1 308 357	12.34
BLY4	ad	294 238	11 059 046	37.59	1 250 586	11.95
BLY5	ae	189 597	3 167 816	16.71	1 019 700	10.42
BLY6	af	192 818	3 010 675	15.61	1 034 819	9.95
BLY7	ag	199 521	3 009 724	15.08	1 061 158	10.87
BLY8	ah	287 392	10 156 615	35.34	1 247 297	11.84
BLX1	ai	185 859	3 425 923	18.43	998 588	10.09
BLX2	aj	286 752	9 947 635	34.69	1 242 436	11.32
BLX3	ak	177 558	2 734 846	15.4	962 479	9.05
BLX4	al	174 022	2 417 183	13.89	926 301	8.36
BLX5	am	273 669	8 929 728	32.63	1 222 179	11.84
BLX6	an	237 119	5 765 564	24.32	1 117 942	11.17
BLX7	ao	229 011	4 843 854	21.15	1 063 052	10.54
BLX8	ар	251 487	7 304 680	29.05	1 138 654	11.52
ZSG1	aq	180 430	5 165 119	28.63	828 498	1.94
ZSG2	ar	162 315	3 731 826	22.99	788 064	1.96
ZSG3	as	143 271	2 511 104	17.53	710 930	1.83
ZSG4	at	188 587	5 748 870	30.48	851 088	1.93
ZSG5	au	184 927	5 663 061	30.62	840 931	1.94
ZSG6	av	155 645	3 853 150	24.76	752 502	1.76
ZSG7	aw	154 116	3 052 403	19.81	756 654	1.89
ZSG8	ax	186 591	6 043 295	32.39	840 778	1.95
HL1	ay	190 316	5 830 665	30.64	828 484	1.8
HL2	az	201 267	8 500 035	42.23	861 863	1.83
HL3	ba	177 323	5 669 241	31.97	815 901	1.73
HL4	$^{\rm bb}$	178 217	4 228 711	23.73	827 005	2.07
HL5	bc	162 156	3 785 248	23.34	782 340	1.83
HL6	$\mathbf{b}\mathbf{d}$	178 707	5 745 349	32.15	808 199	1.91
ZSH1	be	231 753	6 746 866	29.11	790 649	2.42
ZSH2	bf	152 788	3 062 282	20.04	727 328	1.81
ZSH3	bg	162 305	3 934 419	24.24	746 306	1.78
ZSH4	$\mathbf{b}\mathbf{h}$	207 828	5 382 719	25.9	824 422	2.41
ZSH5	bi	190 876	4 950 645	25.94	834 483	2.03
ZSH6	bj	198 824	5 595 229	28.14	855 204	2.08
ZSJ1	bk	193 366	7 726 784	39.96	733 201	2.28
ZSJ2	bl	208 015	7 890 981	37.93	765 269	2.36
ZSJ3	bm	249 974	8 533 583	34.14	813 855	3.33
ZSJ4	bn	178 360	3 581 548	20.08	670 464	2.34
ZSJ5	bo	251 197	7 287 104	29.01	776 679	3.41
ZSJ6	$^{\mathrm{bp}}$	142 125	2 069 174	14.56	575 033	2.17



Fig. 1 Leaves morphological characteristics of Radix Ardisia





位点,为后期八爪金龙特异性 SNP 开发提供基础, 同时为八爪金龙遗传育种改良,提高育种效率提 供数据参考。

植物的生长环境、地理位置、海拔高度对物种 的遗传分化和种群结构能够产生影响。地理分布 和海拔高度的差异影响浙江产车前草种群的遗传 分化(郭水良等,2002)。不同地理位置的广金钱 草种源间存在一定的遗传分化(唐晓敏等,2020)。 系统发育树主要是描述物种之间的分类学和进化 关系以及具有共同祖先的物种之间的进化关系的 树形图(韩凤侠等,2008)。本研究构建了 42 份八 爪金龙样品的系统发育树,系统发育树可以将百 两金和朱砂根区分开。课题组前期对八爪金龙基 原植物 DNA 条型码进行筛选,ITS 序列能区别百 两金和朱砂根,但无法区分朱砂根和红凉伞(潘婕 等,2020)。因此,百两金和朱砂根亲缘关系较远, 化学成分存在差异,需进一步明确其药理作用的 差异,保证其正确使用。



图 3 系统发育树 Fig. 3 Evolutionary tree

叶片形态表明,贵州朱砂根和湖北恩施州朱 砂根叶片形态相近,而与江西武功山朱砂根叶片 形态差距较大。系统发育树结果表明,贵州朱砂 根和湖北恩施州朱砂根亲缘关系较近,与江西武 功山朱砂根关系较远;红凉伞与贵州的朱砂根和 湖北恩施州的朱砂根亲缘关系较近。贵州和湖北 恩施州同属苗族聚集区,江西武功山与贵州和湖 北恩施州在人为环境和地理环境方面存在差异。 因此,江西武功山朱砂根种源在进化过程中受到 了人文环境、地理环境隔离的影响,与贵州、湖北 恩施州的朱砂根种源基因交流较少,逐渐出现 分化。

朱砂根和红凉伞叶片形态相近,但红凉伞的 叶背、花梗、花萼及花瓣均带紫红色,DNA 条形码 无法区分朱砂根和红凉伞(陈新莲等,2017;潘婕 等,2020)。当K=6时的群体遗传结构分析表明, 将细柄百两金、原变种百两金、江西武功山朱砂 根、贵州朱砂根、湖北朱砂根和红凉伞区分开,说 明八爪金龙种源间存在一定的遗传分化。基于 SNP的分子标记,能够区分红凉伞和朱砂根,因 此,我们将进一步开发红凉伞和朱砂根特异的 SNP分子标记。

基于 SNP 标记构建的系统发生树为研究八爪 金龙品种之间亲缘关系提供了证据,虽然八爪金 龙野生种可能具有相似的起源种,但在演化过程 中逐渐出现分化;同时本研究开发的 SNP 位点为 后续八爪金龙品种间共有或特异性标记的开发提 供基础,理清归纳八爪金龙品种间生物学特征。



群体结构 Population structure



参考文献:

- ALEXANDER DH, NOVEMBRE J, LANGE K, et al., 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals [J]. Genome Ees, 19(9): 1655-1664.
- CHEN WT, TONG JY, ZHONG HY, et al., 2020. Character and microscopic identification of ardisiae crenatae radix and its adulterants [J]. J Chin Med Mat, 43(1): 52–55. [陈文 婷, 童家赟, 钟慧怡, 等, 2020. 朱砂根等四种易混淆中 药的性状和显微比较鉴别[J]. 中药材, 43(1): 52–55.]
- CHEN XL, ZHOU JG, MA SJ, et al., 2017. Molecular identification of ardisiae crenatae radix and its adulterants based on ITS2 sequence [J]. Mod Chin Med, 19(7): 939– 943. [陈新连,周建国,马双姣,等, 2017. 基于 ITS2 序 列的朱砂根及其混伪品分子鉴定[J]. 中国现代中药, 19(7): 939–943.]

Chinese Flora Editorial Board, Chinese Academy of Sciences,

2002. Flora Reipublicae Popularis Sinicae [D]. Beijing: Science Press. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 2002. 中国植物志 [D]. 北京:科学出版社.]

- DAVEY JW, CEZARD T, FUENTES-UTRILLA P, et al., 2013. Special features of RAD Sequencing data: Implications for genotyping [J]. Mol Ecol, 22(11): 3151-3164.
- DU X, ZHANG X, BU HD, et al., 2019. Molecular analysis of evolution and origins of cultivated hawthorn (*Crataegus* spp.) and related species in China [J]. Front Plant Sci, 10: 443.
- GUO SL, ZHANG DX, CAO T, 2002. Principal axes analyses on population genetic differentiation of *Plantago asiatica* in Zhejiang, Yingyong Shengtai Xuebao [J]. Chin J Appl Ecol, 13(10): 1283-1286 [郭水良,张东旭,曹同, 2002. 浙江 产车前(*Plantago asiatica*)种群遗传分化的主坐标分析 [J]. 应用生态学报, 13(10): 1283-1286.]
- HAN FX, 2008. On the principle of common ancestry to understand the phylogenetic tree [J]. Bull Biol, 43(9): 14-







图 6 主成分分析 Fig. 6 Analysis of principal components

- 15. [韩凤侠, 2008. 共同祖先原则和系统发育树的解读 [J]. 生物学通报, 43(9): 14-15.]
- HUANG W, TAN GS, XU KP, et al., 2010. Cytotoxic constituents from the root of *Ardisia crispa* [J]. Nat Prod Res Dev, 22(6): 949-951. [黄伟,谭桂山,徐康平,等, 2010. 百两金细胞毒活性成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 22(6): 949-951.]
- JIANG T, WEN CX, TIAN W, et al., 2020. SNP molecular markers development and genetic diversity analysis of forsythia suspensa based on SLAF-seq technology [J/ OL]. Mol Plant Breed, (2020-07-20) https://kns.cnki. net/kcms/detail/46.1068.S.20200720.1130.010.html.][姜 涛,温春秀,田伟,等, 2020. 基于 SLAF-seq 技术连翘 SNP 分子标记开发及遗传多样性分析[J/OL]. 分子植物 育种, (2020-07-20) https://kns.cnki.net/kcms/detail/ 46.1068.S.20200720.1130.010.html.]
- JIANG XM, WEN Q, YE JS, et al., 2006. RAPD analysis of

genetic diversity in *Ardisia crenata* Smis [J]. Acta Agric Univ Jiangxi, 5(28): 762-765. [江香梅, 温强, 叶金山, 等, 2006. 朱砂根群体遗传多样性 RAPD 分析 [J]. 江西 农业大学学报, 5(28): 762-765.]

- KOZICH JJ, WESTCOTT SL, BAXTER NT, et al., 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform [J]. Appl Environ Microbiol, 79(17): 5112-5120.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, et al., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Mol Biol Evol, 35(6): 1547-1549.
- LI H, DURBIN R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. Bioinformatics, 25(14): 1754–1760.
- LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al., 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools [J]. Bioinformatics, 25(16): 2078–2079.
- LIU DL, ZHANG X, ZHAO Y, et al., 2016. Three new triterpenoid saponins from the roots of *Ardisia crenata* and their cytotoxic activities [J]. Nat Prod Res, 30(23): 2694–2703.
- LIU J, HUANG SM, SUN MY, et al., 2012. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application [J]. Plant Methods, 8(1): 34.
- LIU T, GUO LL, PAN YL, et al., 2016. Construction of the first high-density genetic linkage map of *Salvia miltiorrhiza* using specific length amplified fragment (SLAF) sequencing [J]. Sci Rep, 6: 24070.
- LU H, REDUS MA, COBURN JR, et al., 2005. Population structure and breeding patterns of 145 U.S. Rice cultivars based on SSR marker analysis [J]. Crop Sci, 85: 484–492.
- LUO L, ZHANG WC, LI L, et al., 2020. Genetic diversity analysis of *Ardisia crenata* in different populations by fluorescence ISSR [J/OL]. Mol Plant Breed, (2020-08-07) https://kns. cnki. net/kcms/detail/46. 1068. S. 20200807.1415.006.html. [骆亮, 张文春, 李龙, 等, 2020. 不同居群朱砂根 *Ardisia crenata* 的荧光 ISSR 遗传多 样性分析 [J/OL]. 分子植物育种, (2020-08-07) https://kns. cnki. net/kcms/detail/46. 1068. S. 20200807. 1415.006.html.]
- MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al., 2010. The genome analysis toolkit: A mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. Genome Res, 20(9): 1297-1303.
- PAN J, LIU C, FENG TT, et al., 2020. Screening and identification on ITS sequences of original plants from Radix *Ardisia*[J]. Mol Plant Breed, 18(24): 8187–8195. [潘婕, 刘 畅, 俸婷婷, 等, 2020. 苗药八爪金龙基原植物 DNA 条型码 的筛选与鉴定[J]. 分子植物育种, 18(24): 8187–8195.]

- PRICE AL, PATTERSON NJ, PLENGE RM, et al., 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies [J]. Nat Genet, 38(8): 904–909.
- SUN QM, LI YZ, XIANG X, et al., 2013. A novel litchi germplasm (*Litchi chinensis* Sonn.), Yujinqiu, identified by EST-SSR and SNP analysis [J]. Mol Plant Breed, 11(3): 403-414. [孙清明, 李永忠, 向旭, 等, 2013. 利用 SNP 和 EST-SSR 分子标记鉴定荔枝新种质御金球[J]. 分子植 物育种, 11(3): 403-414.]
- TANG XM, ZHANG CR, ZHOU LY, et al., 2020. SNP loci development and genetic analysis of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr based on SLAF-Seq technology [J]. Mol Plant Breed, 18(18): 6101-6107. [唐晓敏,张春荣,周良云,等, 2020. 基于 SLAF-Seq 技术的广金钱草 SNP 位点开发及遗传 分析[J]. 分子植物育种, 18(18): 6101-6107.]
- WU ZH, 2012. Prevention and treatment of metabolic syndrome with miao medicine Yangyin Kouxiang Mixture [J]. J Med Pharm Chin Minor, (8): 41-43. [吴筑华, 2012. 苗药养 阴口香合剂对代谢综合征的防治[J]. 中国民族医药杂志, (8): 41-43.]
- XU LL, LI TJ, ZHANG MY, et al., 2009. Interspecific relationships and variation of 12 species in Ardisia Sw.

(Myrsinaceae) based on ITS and trnL-F data sets [J]. Acta Hortic Sin, 36 (10): 1531-1537. [徐玲玲, 李同建, 张美 云, 等, 2009. 基于核 ITS 与叶绿体 trnL-F 序列分析 12 种紫 金牛属植物的种间关系与变异[J]. 园艺学报, 36(10): 1531-1537.]

- ZHAO JH, XU YH, LI HX, et al., 2019. A SNP-based highdensity genetic map of leaf and fruit related quantitative trait loci in wolfberry (*Lycium* Linn.) [J]. Front Plant Sci, 10: 977.
- ZHAO JS, YANG XY, ZENG XY, et al., 2016. Analysis on germplasm resources of exocarpium citri grandis using SNP molecular markers [J]. Mol Plant Breed, 14(5):1203-1211. [赵俊生,杨晓燕,曾祥有,等, 2016. 利用 SNP 分 子标记分析化橘红种质资源[J]. 分子植物育种, 14(5): 1203-1211.]
- ZHAO O, DU Y, WEI WL, 2016. Analysis of volatile oils of kai hou sword and its major constituted radix sophorae tonkinensis and *Ardisia crispa* (Thunb.) A. DC by GC-MS [J]. Hubei Agric Sci, 55(6): 1568-1571. [赵欧, 杜莹, 韦万丽, 2016. 开喉剑及组方药材山豆根、八爪金龙挥发油的 GC-MS 分析[J]. 湖北农业科学, 55(6): 1568-1571.]

(责任编辑 周翠鸣)