

王 鑫, 武俊达, 姜玲玲, 等. 基于转录组的 3 种缬草 SSR 位点信息比较分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(5): 796-805.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.05.004

基于转录组的 3 种缬草 SSR 位点信息比较分析

王 鑫¹, 武俊达¹, 姜玲玲¹, 周景瑞¹, 吕中允², 罗文菊¹, 艾 蓉¹, 舒福兴²,
许浩翔¹, 冉 江¹, 雷 露¹, 钟学志³, 余 波¹

(1. 贵州省农业科学院畜牧兽医研究所, 贵州 贵阳 550000; 2. 遵义医科大学, 贵州 遵义 563000; 3. 贵州云台仙沐精品水果有限公司, 贵州 黔东南 556200)

摘要: 为研究 3 种缬草 SSR 分子标记的差异, 开发相应的引物用于缬草的鉴定及分子育种。本研究采用 Excel 和 MISA 软件对 3 种缬草转录组中 SSR 位点数据进行分析, 利用 Primer 3.0 软件随机设计 SSR 引物, 并进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳验证引物的有效性和 SSR 的多态性。结果显示, 缬草 *Valeriana officinalis* L. (VOL)、*Valeriana officinalis* var. *iatifolia* Miq. (VOI) 及 *Valeriana officinalis* var. *officinalis* Linn. (VOO) 的转录组数据分别包含 29 462、40 840 和 29 280 个序列总数 (Unigene), 这些 Unigene 分别包含 7 515、8 046 和 7 330 个 SSR 位点。3 种缬草的 SSR 位点的发生频率为 25.50%、19.71%、25.05%, 平均距离为 4.16 kb、4.20 kb、4.22 kb。SSR 单碱基重复基元的主要类型为 A/T 型, 占 SSR 总数的 41.76%、41.30%、38.50%。VOL、VOI、VOO 3 种缬草的独有重复基元数量分别是 44 种、45 种、25 种。随机设计的引物扩增 SSR 的有效率为 77.78%, 具有 SSR 高多态性的引物占比 55.56%。总之, 3 种缬草的 SSR 位点具有分布密度高、出现频率高、重复基元类型多等特点, 多态性好, 可为 3 种缬草后续的鉴定及分子育种提供理论依据。

关键词: 缬草; SSR 位点; 转录组; PCR

中图分类号: S562 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)05-0796-10

Comparative analysis of SSR loci information of three *Valeriana officinalis* L. species based on transcriptome

WANG Xin¹, WU Junda¹, JIANG Lingling¹, ZHOU Jingrui¹, LYU Zhongyun², LUO Wenju¹,
AI Rong¹, SHU Fuxing², XU Haoxiang¹, RAN Jiang¹, LEI Lu¹, ZHONG Xuezhi³, YU Bo¹

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550000, China; 2. Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 3. Guizhou Yuntai Xianmu Fine Fruits Co., Ltd., Qiongdongnan 556200, China)

Abstract: To study the differences in SSR molecular markers of three *Valeriana officinalis* L. species, the corresponding primers were developed for the identification and molecular breeding of *Valeriana officinalis* L. species. In this study, Excel and MISA software were used to analyze the SSR loci data in the transcriptome of three *Valeriana officinalis* L.

species. Primer 3.0 software was used to randomly design SSR primers, and PCR amplification and agarose gel electrophoresis were performed to verify the effectiveness of the primers and the polymorphism of SSR. The results showed that the transcriptome data of *Valeriana officinalis* L. (VOL), *Valeriana officinalis* var. *iatifolia* Miq. (VOI), and *Valeriana officinalis* var. *officinalis* Linn.

收稿日期: 2023-11-10

基金项目: 贵州省科技计划项目[黔科合支撑(2020)4Y116号]; 贵州省农业农村厅项目(GZCYTX2023-0302)

作者简介: 王 鑫(1992-), 男, 贵州遵义人, 硕士研究生, 助理研究员, 主要研究方向为分子生物学。(E-mail) 1120375576@qq.com

通讯作者: 余 波, (Tel) 15085916661, (E-mail) yubonky@163.com

(VOO) contained 29 462, 40 840, and 29 280 Unigenes. These Unigenes included 7 515, 8 046, and 7 330 SSR loci, respectively. The occurrence frequency of SSR loci in the three *Valeriana officinalis* L. species was 25.50%, 19.71%, and 25.05%, with average distance of 4.16 kb, 4.20 kb, and 4.22 kb. The predominant type of single-nucleotide repeat units in SSR was A/T, accounting for 41.76%, 41.30%, 38.50% of the total SSR. The number of unique repeat units of VOL, VOI, VOO was 44, 45 and 25, respectively. The effective rate of SSR amplification by randomly designed primers was 77.78%, and the proportion of highly polymorphic SSR primers was 55.56%. In conclusion, the SSR loci of three *Valeriana officinalis* L. species exhibited characteristics such as high distribution density, high occurrence frequency, and diverse types of repeat units, indicating good polymorphism. The results of this study can provide a theoretical basis for the subsequent identification and molecular breeding of the three *Valeriana officinalis* L. species.

Key words: *Valeriana officinalis* L.; SSR loci; transcriptome; PCR

缬草 (*Valeriana officinalis* L.) 具有悠久的药用历史,主要药用部位为根茎,具有理气止痛^[1]、镇静安神、解挛止痛、抗抑郁和抗肿瘤等功效^[2]。缬草的用途广泛,例如其挥发油可用于药品^[3-5]和保健品中^[6-7]。缬草作为天然药物在欧洲销售额很高,并且居全球植物药销售额前 10。中国缬草资源丰富,共有 17 个种和 2 个变种^[2],贵州省以宽叶缬草 (VOV) 分布最广^[8]。随着市场对宽叶缬草需求的增加,缬草优良种子种苗的需求也日益增长。然而,缬草的品种会出现退化,导致药材质量下降等问题^[9]。不同种类的缬草功效各具特色,因此,开发分子标记可以为缬草优良品种的选育提供理论和技术支撑。相关学者已经意识到开发缬草分子标记的重要性。钱志瑶等^[10]采用试剂盒研究了缬草的扩增多态性 (RAPD) 方法,然而,这种方法存在一些缺点:首先,由于显性遮盖作用,RAPD 位点之间的遗传距离计算准确性较低;其次,RAPD 方法对反应条件相当敏感,如模板浓度和酶浓度,导致重复性较差。万新^[11]利用 ITS 研究了 6 种缬草属的遗传多样性,尽管 ITS 具有高度保守性,但大量研究结果表明 ITS 在区分近似物种方面效果不佳^[12-13]。

简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR) 是一种在非基因区域频繁出现的串联重复序列,一般由 1~6 个碱基组成;在真核和原核生物基因组中分布广泛^[14]。SSR 标记区分物种的能力高于 RAPD 标记和 ITS 标记。在许多作物中,QTL 数量性状位点作图的首选方法一直是 SSR 方法^[15]。目前,基因组^[16-17]和转录组^[18-19]是大量 SSR 位点信息的主要来源。最初,传统 SSR 开发过程繁琐且失败率高,造成成本和工作量的增加。EST-SSR 是基于转录组表达序列信息分析而来,极大地简化了传统 SSR 的开发程序。虽然已经有关于宽叶缬草转录组的报

道^[20],但 NCBI 等数据库中可查阅的缬草的 EST 序列非常有限,基于转录组的 SSR 位点信息尚未见报道。通常,为了能够检验 EST-SSR 的有效性,常常会设计随机引物进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳验证^[21-22],并开发出具有高多态性的引物为后续植株鉴定或者分子育种提供基础。

本研究旨在对 3 种缬草进行 SSR 分析,并设计引物进行凝胶电泳验证,以便从分子水平上区分这 3 个变种并辅助缬草的分子育种。

1 材料与方法

1.1 材料

3 种缬草变种来自中国贵州省铜仁市江口县黄柏山村 (海拔 337 m, 东经 105°51'15", 北纬 28°32'13"), 3 种缬草变种在同样环境的种植基地种植,生长旺盛,无病虫害发生,经过贵州大学植物物种鉴定中心鉴定,3 种供试缬草为不同的变种,分别为: *Valeriana officinalis* L. (VOL)、*Valeriana officinalis* var. *iatifolia* Miq. (VOI) 及 *Valeriana officinalis* var. *officinalis* Linn. (VOO)。

1.2 方法

对 3 种缬草的叶长、叶宽、株高进行测量,每组重复 3 次。对 3 种缬草叶片拍照进行外观差异比较。采集缬草新长出的叶子,每个样本重复 4 次,立即将其放入液氮中冷冻,并在冷冻管中保存,样品转录组由北京诺禾致源科技股份有限公司测序。之后,参考舒福兴等^[14]的方法,联合 MISA 在线网站 (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>) 和 Excel 软件对 SSR 位点进行分析。同时利用 Primer 3.0 软件设计 3 种缬草的 SSR 随机引物,并从每种缬草中随机挑选 3 对引物进行后续 SSR 凝胶电泳分析,引物信息见表 1。DNA 的提取方法、PCR 及琼脂糖凝

胶电泳方法参考忻雅等^[23]的方法。

1.3 统计分析方法

使用 Excel 软件和仙桃学术 (<https://www.xiantaozi.com/>) 在线分析软件绘制图表,3 种缬草的生物学性状数据以平均数±标准差的形式表示。

表 1 PCR 鉴定使用的引物信息表

Table 1 Information on primers used for PCR identification

缬草	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物大小(bp)
VOL	GGCCAAACCCAAGACTAGCA	AAGGAGAGCAACCACCTTCG	131
	ACAAAGGGGCGGTAAGAC	TGTTGCGCAGCAAGACGTAGG	159
	GGGGATGAAAGTGGGAATTTGC	TGCACACCAAAATGCACACT	273
VOI	CGCCTTGGTACGCCTTAAGA	AAATGCTTGCAAGGACTGGG	279
	TGTGTGCAAAATCATCAACTACA	TTTCTGGCCACCACCGATT	191
	TGGGACTATTTGCACTGTGT	GCAAGTACGACTGGTTGTTCC	125
VOO	GGAGGGAAATGGCTGCTGA	ACTGGACAGATAACAGAGAGCA	113
	ACTCCATCTGTCAACAACCTTCCT	ACTTGCTTTCCCTCTGGTC	271
	CTGGGTCGTCGTGTTCTCA	ACACCAATCCATCGACACAGA	227

VOL; *Valeriana officinalis* L.; VOI; *Valeriana officinalis* var. *iatifolia* Miq.; VOO; *Valeriana officinalis* var. *officinalis* Linn.。

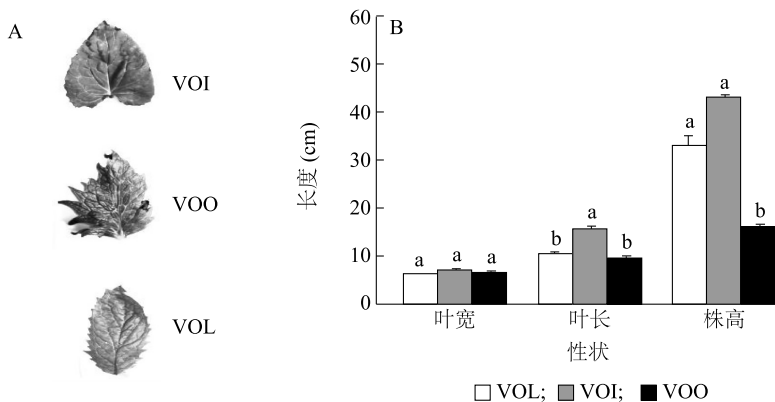
2 结果与分析

2.1 3 种缬草的生物学性状分析

从图 1A 可见,3 种缬草叶型外观有明显的区别。由图 1B 所示,VOL、VOI、VOO 的叶宽分别为 6.47±0.06 cm、7.17±0.29 cm、6.73±0.64 cm,三者之

采用单因素方差分析比较不同组间的差异性。同时,利用 Excel 和 MISA 软件对 SSR 重复单元的类型进行统计分析,利用韦恩图对 3 种缬草独有的 SSR 重复基元进行分析。

间差异不显著;VOL、VOI、VOO 的叶长分别为 10.57±0.51 cm、15.67±1.15 cm、9.57±0.97 cm,VOI 与 VOL、VOO 之间差异显著,VOL 和 VOO 之间差异不显著。VOL、VOI、VOO 的株高分别为 33.17±3.25 cm、43.17±0.76 cm、16.30±0.75 cm,VOL 与 VOO、VOI 与 VOO 之间存在显著差异。



VOL、VOI、VOO 见表 1 注。同一性状不同图柱上不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

图 1 3 种缬草的生物学性状

Fig.1 Biological traits of three species of *Valeriana officinalis* L.

2.2 3 种缬草转录组中 SSR 位点的分布特征

测序结果显示,3 种缬草转录组序列总长度从高到低顺序为 VOI>VOL>VOO,3 种缬草总序列数

量从高到底排序与序列总长度的排序一致。含有 SSR 的序列数从高到底的排序为 VOI>VOO>VOL。VOI 的各项数值均高于其他缬草变种(表 2)。

表 2 3 种缬草转录组中 SSR 位点分布特征

Table 2 Distribution characteristics of SSR loci in the transcriptome of three species of *Valeriana officinalis* L.

SSR 信息	缬草		
	VOL	VOI	VOO
序列总数(条)	29 462	40 840	29 280
序列总长度(bp)	31 253 766	33 795 128	30 941 295
SSR 位点总数(个)	7 515	8 046	7 330
含有 SSR 的序列数(条)	5 598	6 148	5 620
含有 1 个以上 SSR 的序列数(条)	1 358	1 412	1 277
含有复合 SSR 的序列数(条)	727	870	699

VOL、VOI、VOO 见表 1 注。

2.3 3 种缬草转录组中 SSR 位点的重复基元类型及占比

从表 3 可见,3 种缬草存在多种 SSR 重复基元类型,不同的基元类型在数量上有差异。其中,单碱基重复类型最多。在 VOL、VOI、VOO 中,分别有 3 150 个、3 336 个、2 848 个单碱基重复类型,分别占本变种 SSR 总量的 41.92%、41.46% 和 38.85%。3 种缬草中,VOI 的单碱基重复类型最多,VOO 最少。二碱基重复类型在各变种中数量居第 2 位,分别为

2 413 个、2 696 个和 2 737 个,分别占本变种 SSR 总数的 32.11%、33.51% 和 37.34%。VOO 的二碱基重复类型数量和比例都超过 VOL 和 VOI。三碱基重复类型在各变种中数量居第 3 位,分别为 1 592 个、1 678 个和 1 492 个,占本变种 SSR 总数的 21.18%、20.86% 和 20.35%。其他基元重复类型的比例较低,3 个变种中剩余 3 种基元重复类型的总和分别占本变种 SSR 总数的 4.79%、4.18% 和 3.47%。总体而言,基元中包含的碱基数越多,基元类型的数量就越少。从 SSR 的出现频率来看,VOL、VOI、VOO 分别为 25.50%、19.71% 及 25.05%。其中,具有单碱基重复基元的出现频率分别为 10.69%、8.17% 和 9.73%;二碱基重复基元的出现频率分别为 8.19%、6.60% 和 9.35%;三碱基重复基元的出现频率分别为 5.40%、4.11% 和 5.10%;其他类型重复基元出现频率很低。整体上,3 种缬草中的单碱基、二碱基和三碱基 SSR 是优势类群,在各种缬草变种本身及缬草变种之间的出现频率均不相同。VOL、VOI、VOO 的 SSR 平均距离分别为 4.16 kb、4.20 kb 和 4.22 kb。总体上,随着重复基元所含碱基数的增加,SSR 的遗传距离会变长。

表 3 3 种缬草 SSR 重复基元类型分布信息

Table 3 Distribution information of SSR repeat motif types of three species of *Valeriana officinalis* L.

重复基元类型	SSR 数量(个)			占总 SSR 数比例(%)			频率(%)			平均距离(kb)		
	VOL	VOI	VOO	VOL	VOI	VOO	VOL	VOI	VOO	VOL	VOI	VOO
单碱基	3 150	3 336	2 848	41.92	41.46	38.85	10.69	8.17	9.73	9.92	10.13	10.86
二碱基	2 413	2 696	2 737	32.11	33.51	37.34	8.19	6.60	9.35	12.95	12.54	11.30
三碱基	1 592	1 678	1 492	21.18	20.86	20.35	5.40	4.11	5.10	19.63	20.14	20.74
四碱基	189	171	134	2.51	2.13	1.83	0.64	0.42	0.46	165.36	197.63	230.91
五碱基	99	88	49	1.32	1.09	0.69	0.34	0.22	0.17	315.69	384.04	631.46
六碱基	72	77	70	0.96	0.96	0.95	0.24	0.19	0.24	434.08	438.90	442.02
合计	7 515	8 046	7 330	100.00	100.00	100.00	25.50	19.71	25.05	4.16	4.20	4.22

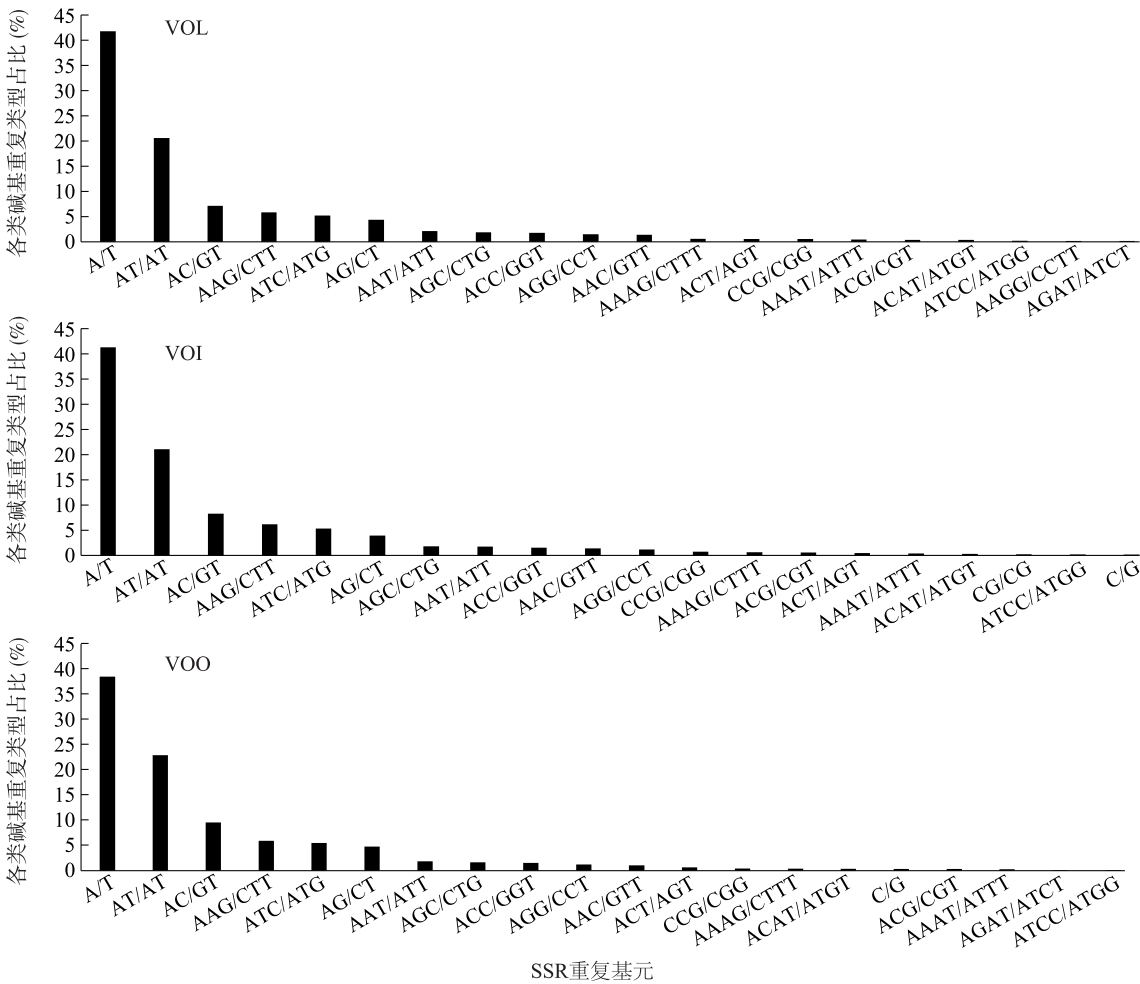
VOL、VOI、VOO 见表 1 注。

2.4 3 种缬草转录组中 SSR 重复基元碱基组成分析

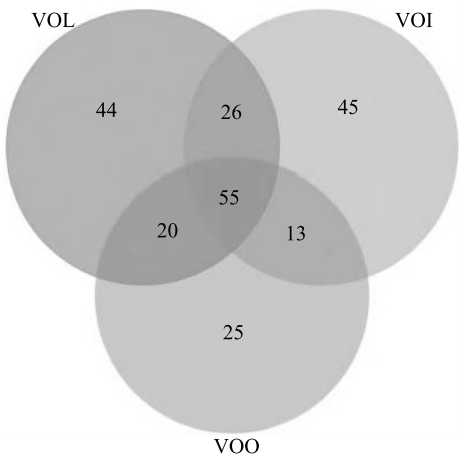
通过分析发现,在 VOL 的 SSR 重复基元中,共发现碱基组成类型 145 种。单碱基基元至六碱基基元的碱基组成类型分别有 2 种、4 种、10 种、24 种、49 种和 56 种。在 VOI 的 SSR 重复基元中,共有碱基组成类型 139 种。单碱基基元至六碱基基元的碱基组成类型分别有 2 种、4 种、10 种、20 种、40 种和 63 种。在 VOO 的 SSR 重复基元中,共发现碱基组成类型 113 种。单碱基基元至六碱基基元的碱基组

成类型分别有 2 种、4 种、10 种、22 种、26 种和 49 种。

对 3 种缬草中排名前 20 的碱基组成类型占比分析发现,A/T、AT/AT、AC/GT、AAG/CTT 入围前 4,其余类型占比较低(图 2)。3 种缬草共有 55 种重复基元的碱基组成类型相同,而 VOL、VOI、VOO 各自独有的重复基元的碱基组成类型分别为 44 种、45 种、25 种(图 3)。独有重复基元的碱基组成类型详见表 4。



VOL、VOI、VOO 见表 1 注。
图 2 3 种缬草中排名前 20 的 SSR 重复基元碱基组成信息
Fig.2 Base composition information of the top 20 SSR repeat motifs in three *Valeriana officinalis* L. species



VOL、VOI、VOO 见表 1 注。
图 3 3 种缬草共有及特有的 SSR 重复基元类型数量分布
Fig.3 The number distribution of common and unique SSR repeat motifs in three species of *Valeriana officinalis* L.

2.5 3 种缬草 SSR 多态性分析

2.5.1 3 种缬草 SSR 基元重复次数 从表 5 可见,3 种缬草中,不同碱基类型基元的数量和比例随着 SSR 基元重复次数的增加而逐步下降。VOL 的 SSR 重复基元的重复次数主要集中在 5~20 次,共 7 149 个,占总数的 95.13%。其中,有 4 979 个重复基元的重复数为 5~10 次(低重复),占总数的 66.25%;有 1 752 个重复基元的重复数为 11~15 次(中重复),占总数的 23.31%;有 418 个重复基元的重复数为 16~20 次(高重复),占总数的 5.56%。在所有基元类型中,重复次数排前三的依次是 10 次、6 次和 5 次,分别含有 1 265、1 222、1 074 个基元,各占 SSR 重复基元总数的 16.83%、16.26%、14.29%。VOI 的 SSR 重复基元的重复次数主要集中在 5~20 次,共 7 626 个,占总数的 94.78%。其中,低重复基元有 5 345 个,

表4 3种缬草部分特有 SSR 重复基元类型的碱基组成信息

Table 4 Base composition information of some unique SSR repeat motifs in three species of *Valeriana officinalis* L.

序号	VOL	VOI	VOO
1	ATCGC/ATGCG	AGCC/CTGG	AACGGT/ACCGTT
2	ACACC/GGTGT	AATGCC/ATTGGC	AATATG/ATATTC
3	ACCG/CGGT	AATATC/ATATTG	ACATGG/ATGTCC
4	AAGGG/CCCTT	AAATTG/AATTTT	AGGATC/ATCCTG
5	AGAGCC/CTCTGG	ACACGT/ACGTGT	AATGGT/ACCATT
6	ACCC/GGGT	ACGCC/CGTGG	AGAGGC/CCTCTG
7	AATCAC/ATTGTG	AAGCAC/CTGTGT	AAC TTC/AAGTTG
8	ACGAT/ATCGT	AAGAGT/ACTCTT	AACCCC/GGGGTT
9	ACACAG/CTGTGT	AGGGAT/ATCCCT	ACTGCT/AGCAGT
10	ACTAG/AGTCT	ACAGGG/CCCTGT	AATCAG/ATTCTG
11	AAACCT/AGTTT	ACTGGC/AGTGCC	AATGTC/ACATTG
12	AATGAC/ATTGTC	AAGCT/AGCTT	AATGGG/ATTCCC
13	AGCCTC/AGGCTG	AATCGT/ACGATT	AAACTG/AGTTTC
14	AAATTC/AATTTG	AACGAC/CGTTGT	ACGTC/ACGTG
15	AAAATT/AATTTT	AAAATG/ATTTTC	ATATCC/ATATGG
16	AAGGAC/CCTTGT	AGCATG/ATGCTC	AATCTG/AGATTG
17	AAC TTG/AAGTTC	AACCAG/CTGTTT	ATGC/ATGC
18	ACAGC/CTGTG	AGCCG/CGGCT	AAACAG/CTGTTT
19	AACCT/AGGTT	AAGTGG/ACTTCC	ACAGAG/CTCTGT
20	AGCCCG/CGGGCT	ATCCC/ATGGG	ACAGAT/ATCTGT
21	AAACAC/GTGTTT	ACTCT/AGAGT	AATACG/ATTCGT
22	ACTG/AGTC	AAGACG/CGTCTT	AATACT/AGTATT
23	ACGG/CCGT	AGCCT/AGGCT	AAACTC/AGTTTG
24	AAGGTC/ACCTTG	AATCTC/AGATTG	AAAAAC/GTTTTT
25	AAATCG/ATTTG	ACCGCC/CGGTGG	AACGG/CCGTT

VOL、VOI、VOO 见表1注。

占总数的 66.43%;中重复基元有1 856个,占总数的 23.08%;高重复基元有 425 个,占总数的 5.28%。在所有类型中,重复次数排前三的依次是 10 次、6 次和 5 次,分别含有1 412、1 313、1 145个基元,各占 SSR 重复基元总数的 17.55%、16.32%、14.23%。VOO 的 SSR 重复基元的重复次数主要集中在5~20 次,共7 130个,占总数的 97.27%。其中,低重复基元有 5 136 个,占总数的 70.07%;中重复基元有 1 655个,占总数的 22.58%;高重复基元有 339 个,占总数的 4.62%。在所有类型中,重复次数排前三分别是 10 次、6 次和 5 次,分别含有1 429、1 309、920 个基元,各占 SSR 重复基元总数的 19.50%、17.86%、12.55%。

2.5.2 缬草高多态性 SSR 分析 从图4可见,在 VOL 中,平均长度<12 bp 的重复基元数量占总数的 20.42%,12~20 bp 的占 53.45%,≥20 bp 的占 26.12%。在 VOI 中,平均长度<12 bp 的重复基元数量占总数的 20.32%,12~20 bp 的占 52.19%,≥20 bp 的占 27.49%。VOO 中平均长度<12 bp 的重复基元数量占总数的 23.27%,12~20 bp 的占 52.75%,≥20 bp 的占 23.99%。3 种缬草之间,符合高多态性 SSR 特征的比例从高到低排序为 VOI>VOL>VOO。在 VOL 中,复杂混合型重复单元最长为 306 bp,从单碱基基元到六碱基基元最长长度分别为 66 bp、58 bp、81 bp、44 bp、40 bp 和 72 bp。在 VOV 中,重复单元最长的是复杂混合型,长度为 244 bp,从单碱基基元到六碱基基元最长长度分别为 76 bp、68 bp、63 bp、60 bp、45 bp 和 84 bp。VOO 中,重复单元最长的是复杂混合型,长度为 269 bp,从单碱基基元到六碱基基元最长长度分别为 79 bp、62 bp、66 bp、76 bp、50 bp 和 78 bp。

表5 3种缬草 SSR 重复基元的重复次数分布

Table 5 Distribution of the number of repeats of SSR repeat motifs in three species of *Valeriana officinalis* L.

缬草	重复基元类型	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21~30	31~40	41~50	>50	合计
VOL	单碱基	0	0	0	0	0	1 101	555	316	216	141	159	109	74	63	49	44	240	42	25	16	3 150
VOI	单碱基	0	0	0	0	0	1 206	584	361	199	164	124	116	71	54	41	45	265	54	29	23	3 336
VOO	单碱基	0	0	0	0	0	1 200	512	291	207	115	86	97	62	44	35	24	132	18	13	12	2 848
VOL	二碱基	0	776	473	324	259	129	117	72	56	57	40	20	14	10	14	14	37	1	0	0	2 413
VOI	二碱基	0	888	491	359	266	174	124	86	61	64	49	21	24	15	14	12	42	6	0	0	2 696
VOO	二碱基	0	938	542	342	241	180	144	89	76	58	36	17	15	12	11	12	23	1	0	0	2 737
VOL	三碱基	837	375	190	80	46	32	3	6	5	0	6	2	1	0	3	1	5	0	0	0	1 592

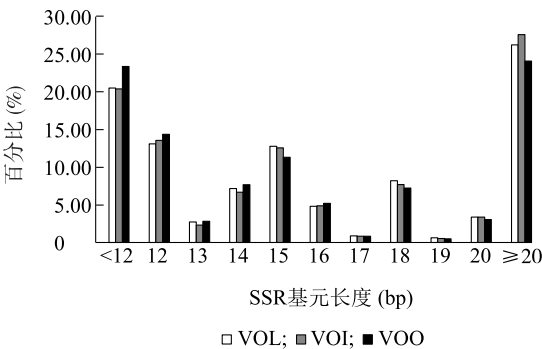
续表5 Continued5

缬草	重复基元类型	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21~30	31~40	41~50	>50	合计
VOI	三碱基	930	371	157	83	65	31	9	3	3	4	9	5	4	1	1	1	1	0	0	0	1 678
VOO	三碱基	769	323	176	75	59	47	6	14	6	4	3	2	1	2	4	0	1	0	0	0	1 492
VOL	四碱基	113	44	17	10	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	189
VOI	四碱基	99	34	25	5	1	1	3	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	171
VOO	四碱基	71	32	16	6	4	0	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	134
VOL	五碱基	74	19	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
VOI	五碱基	64	16	2	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88
VOO	五碱基	39	9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49
VOL	六碱基	50	8	5	4	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	72
VOI	六碱基	52	4	6	4	5	0	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	77
VOO	六碱基	41	7	8	4	5	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70
VOL	合计	1 074	1 222	687	422	309	1 265	677	395	277	198	205	131	89	73	66	59	282	43	25	16	7 515
VOI		1 145	1 313	681	455	339	1 412	722	452	265	234	183	142	99	70	56	58	308	60	29	23	8 046
VOO		920	1 309	742	427	309	1 429	663	399	291	177	125	116	78	58	51	36	156	19	13	12	7 330

VOL、VOI、VOO 见表 1 注。

2.6 引物的筛选及 SSR 标记的多态性

从图 5 可见,经过 PCR 扩增及凝胶电泳分析发现,本研究所设计的引物有效率为 77.78%;具有高多态性的引物占比达 55.56%。引物中除了 VOI3、VOO2 外,其余引物在 3 种缬草之间均扩增出大小不同的条带。其中 VOL1、VOL2、VOL3、VOI1 和 VOO3 扩增出的 SSR 条带多态性良好,能明确鉴定出 3 种缬草;而 VOI2 可以鉴定出 VOO,但对 VOI 和 VOL 无法进行有效区分;VOO1 能有效鉴定 VOO 与其他 2 种缬草的区别,但区分 VOI 与 VOL 的能力较差。



VOL、VOI、VOO 见表 1 注。

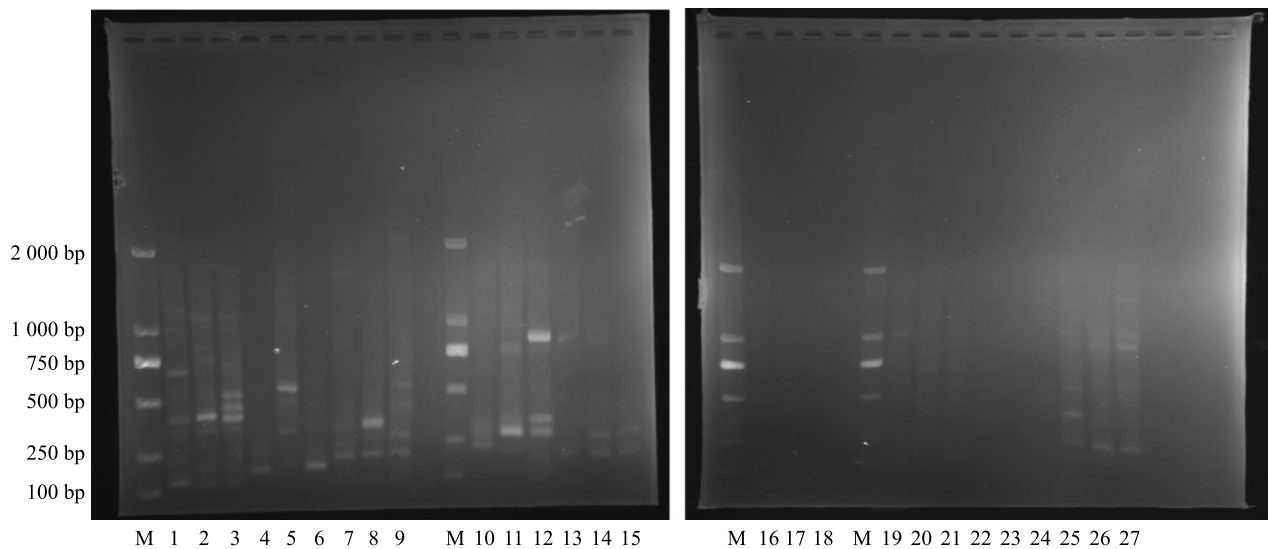
图 4 3 种缬草不同长度 SSR 重复基元分布及占比

Fig.4 Distribution and proportion of SSR repeat motifs with different lengths in three species of Valeriana officinalis L.

3 讨论

缬草中含有多种具有药用价值的成分^[24]。例如:缬草作为治疗胃肠道疾病和焦虑症的中药被收录于《中国药典》。对缬草 SSR 分子标记的研究及相关引物的开发对缬草杂交育种和混合样品的鉴定等有一定的理论和应用价值。然而,关于缬草 SSR 的研究目前尚未见报道。尽管有许多研究 SSR 的方法,例如 ISSR-PCR 方法^[25]、磁珠富集法^[26],但 these 方法在挖掘数量和可用性上远不如转录组法。利用转录组进行 SSR 位点分析已经在多种植物上得到应用^[27-36],尤其是针对无基因组信息的植物,转录组法可以提供大量的标记信息。由此可见,有必要通过缬草转录组分析 SSR 位点。

从生物学性状上看,3 种缬草在叶型上存在很大的差异,由于其生境相同,排除地理隔离引起的差异,叶型差异可能是由于遗传因素引起,那么其核酸水平可能存在差异。转录组序列分析结果显示,VOL、VOI、VOO 3 种缬草测得的序列长度分别为 31 253 766 bp、33 795 128 bp、30 941 295 bp,对应 29 462 个、40 840 个、29 280 个序列总数,分别获得 7 515 个、8 046 个、7 330 个 SSR,出现频率分别为 25.50%、19.71%、25.05%。VOL 和 VOO 的 SSR 出现频率高于柴胡 (20.08%)^[37] 及杂花苜蓿



M: DNA marker; 1: VOO 缬草 VOL1 引物扩增的条带; 2: VOI 缬草 VOL1 引物扩增的条带; 3: VOL 缬草 VOL1 引物扩增的条带; 4: VOO 缬草 VOL2 引物扩增的条带; 5: VOI 缬草 VOL2 引物扩增的条带; 6: VOL 缬草 VOL2 引物扩增的条带; 7: VOO 缬草 VOL3 引物扩增的条带; 8: VOI 缬草 VOL3 引物扩增的条带; 9: VOL 缬草 VOL3 引物扩增的条带; 10: VOO 缬草 VOI1 引物扩增的条带; 11: VOI 缬草 VOI1 引物扩增的条带; 12: VOL 缬草 VOI1 引物扩增的条带; 13: VOO 缬草 VOI2 引物扩增的条带; 14: VOI 缬草 VOI2 引物扩增的条带; 15: VOL 缬草 VOI2 引物扩增的条带; 16: VOO 缬草 VOI3 引物扩增的条带; 17: VOI 缬草 VOI3 引物扩增的条带; 18: VOL 缬草 VOI3 引物扩增的条带; 19: VOO 缬草 VOO1 引物扩增的条带; 20: VOI 缬草 VOO1 引物扩增的条带; 21: VOL 缬草 VOO1 引物扩增的条带; 22: VOO 缬草 VOO2 引物扩增的条带; 23: VOI 缬草 VOO2 引物扩增的条带; 24: VOL 缬草 VOO2 引物扩增的条带; 25: VOO 缬草 VOO3 引物扩增的条带; 26: VOI 缬草 VOO3 引物扩增的条带; 27: VOL 缬草 VOO3 引物扩增的条带。

图5 不同 SSR 引物扩增的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified by different SSR primers

(20.03%)^[38], 低于大麻 (33.10%)^[39] 及睡莲 (33.98%)^[40], 而 VOI 的 SSR 出现频率均低于上述植物。VOL、VOI、VOO 3 种缬草的转录组 SSR 分布的平均距离分别为 4.16 kb、4.20 kb、4.22 kb, 与其他植物相比, VOL、VOI、VOO 转录组 SSR 分布的平均距离高于苜蓿^[38]、白及^[41]、南美蟛蜞菊^[42], 低于半夏^[14]、红花^[43]。这可能与植物遗传背景和转录状态有关。同时, 我们也发现 3 种缬草在 SSR 出现频率上表现出差异性, VOL 和 VOO 的差异不大, 但是二者与 VOI 之间的差异较大。这说明缬草不同变种之间转录水平不同, 因此有必要对其他缬草变种进行研究。总体来说, 3 种缬草的 SSR 种类和数量都比较丰富, 可以为缬草育种提供依据。

3 种缬草的 SSR 均以单碱基最多, 这与南美蟛蜞菊^[42]、睡莲^[40]、大麻^[39]一致, 而柴胡的 SSR 以二碱基最多, 这种差异可能来自种属之间的差异。3 种缬草中单碱基 A/T 型是最多的重复基元类型, 与大多数植物的 SSR 优势重复类型一致^[44-46]; 二碱基、三碱基的优势重复基元仅有轻微差异, 而四碱

基、五碱基、六碱基基元重复类型数量上三者之间出现非常大的差异, 3 种缬草独有的重复基元全部集中在四碱基、五碱基、六碱基重复基元类型上。这说明具有这些重复基元的 SSR 具有区分 3 种缬草的分子标记的潜力, 而这些 SSR 所在序列的表达可能是 3 种缬草生长发育或者代谢产物差异的重要基础。

大量的研究结果表明, SSR 重复基元长度 < 12 bp, 多态性极低。SSR 重复基元重复的次数 ≥ 12 次时, 多态性标记的开发潜力随着重复次数的增加逐渐增大^[47]。本研究中, VOL、VOI、VOO 3 种缬草不同 SSR 重复基元重复次数主要集中在 5~20 次, 所占比例分别为 95.13%、94.78%、97.27%, 重复基元长度 ≥ 20 bp 的比例分别为 26.12%、27.49%、23.99%。这表明 3 种缬草转录组 SSR 位点理论上具有较大开发潜力。本研究发现 3 种缬草之间存在独有的 SSR 重复基元类型, 这些类型对 3 种缬草的分子育种具有重要作用。但是根据之前在各个物种中利用转录组分析的 SSR 均采取了随机引物验证,

本研究也通过随机设计的引物及 3 种缬草 DNA 为模板进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳分析,发现引物有效率为 77.78%,其中引物 VOL1、VOL2、VOL3、VOI1 和 VOO3 扩增出的 SSR 条带多态性良好,能明确鉴定出 3 种缬草;而引物 VOI2 可以鉴定出 VOO,但对 VOI 和 VOL 无法进行有效区分;引物 VOO1 能有效鉴定 VOO 与其他 2 种缬草的区别,但区分 VOI 和 VOL 的能力较差。在山东银莲花中引物有效率为 68%,高多态性引物只占 11%^[22];在辣椒中引物有效率为 93.10%,多态率为 17.24%^[21],本研究的引物高多态率(55.56%)比银莲花和辣椒高,引物有效率居中。可为后期缬草分子育种及鉴定等方面提供理论依据及具体引物。

4 结 论

3 种缬草的转录组中,SSR 位点分布密度大、重复基元类型丰富、出现频率高,本研究筛选出高多态性标记 SSR 随机引物 5 对,可以为进一步研究缬草遗传多样性和分子标记辅助育种提供理论基础及具体引物。

参考文献:

- [1] 张进芳. 铜仁宽叶缬草的研究现状与展望[J]. 广东化工, 2021,48(18):107-147.
- [2] 李文杰,李美阳. 药用植物缬草的研究进展[J]. 北方园艺, 2019(12):139-145.
- [3] 刘庆军,沈鹤霄,李国龙,等. 缬草在制备促进肠道有益菌增殖的产品中的应用;CN113768996B[P]. 2022-08-26.
- [4] 彭建玉,李宗悟,贾金迪,等. 一种心神安胶囊的中药组成物及其制备方法;CN115040604A[P]. 2022-09-13.
- [5] 熊义涛,喻小军,蔡凯,等. 一种治疗痛经的中药及其制备方法和用途;CN112472755B[P]. 2022-06-07.
- [6] 胡祥正,丁增尼玛. 一种具有安神抗菌效果的香水及其制备方法;CN116139047A[P]. 2023-05-23.
- [7] 谢小丽,于福来,王凯,等. 一种含缬草油与艾纳香油的复合微乳面膜液及其制备方法;CN114306154B[P]. 2023-05-19.
- [8] 聂鲜钰,陆春云,文大成,等. 宽叶缬草种苗分级及其对产量质量的影响[J]. 种子,2020,39(10):151-154.
- [9] 王茹静,黄青,雍妍,等. 缬草属植物的化学成分及生物活性研究概况[J]. 中国中药杂志,2016,41(8):1405-1414.
- [10] 钱志瑶,周镁,黄秀平,等. 黔产宽叶缬草的 RAPD 分析[J]. 中成药,2015,37(8):1751-1756.
- [11] 万新. 缬草属常用药用植物形态特征、光谱鉴别及 ITS 序列研究[D]. 北京:北京中医药大学,2007.
- [12] 王滑,阎亚波,张俊佩,等. 应用 ITS 序列及 SSR 标记分析核桃与铁核桃亲缘关系[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2009,33(6):35-38.
- [13] 董岩,陈辉,赵明文,等. 真姬菇栽培菌株的 ITS 和 SSR 分析[J]. 上海农业学报,2009,25(3):59-64.
- [14] 舒福兴,黄瑶,贾启,等. 胡萝卜果胶杆菌侵染下半夏转录组中 SSR 位点信息分析[J]. 种子,2023,42(2):116-120.
- [15] DUHAN N, KAUNDAL R. LegumeSSRdb: a comprehensive micro-satellite marker database of legumes for germplasm characterization and crop improvement[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021,22(21):11350.
- [16] 李卓蔚,邱迁,郎佳琪,等. 尖刀唇石斛和翅梗石斛叶绿体全基因组分析[J]. 中草药,2022,53(16):5159-5169.
- [17] 李卫岗,张文生,吴洁珊,等. 一组用于鉴别茶枝柑品种的 SSR 引物组成及其应用;CN116574835A[P]. 2023-08-11.
- [18] 颜凤霞,王莲辉,田凡,等. 长瓣兜兰花 2 个不同时期转录组分析[J]. 种子,2021,40(5):91-97.
- [19] 李怡鹏,石林,杨梦飞,等. 基于 EST-SSR 标记的 19 份子莲品种资源遗传多样性分析[J]. 种子,2022,41(2):65-69.
- [20] PARK Y J, LI X, NOH S J, et al. Transcriptome and metabolome analysis in shoot and root of *Valeriana fauriei* [J]. BMC Genomics, 2016,17:303.
- [21] 聂智星,傅鸿妃,李高青,等. 辣椒花药转录组 SSR 位点信息分析及标记开发[J]. 分子植物育种,2023,21(23):7803-7810.
- [22] 杨也,李胜辉,张素勤,等. 蜜本南瓜 EST-SSR 标记开发及多态性分析[J]. 分子植物育种,2024,22(6):1934-1943.
- [23] 忻雅,崔海瑞,卢美贞,等. 白菜 EST-SSR 信息分析与标记的建立[J]. 园艺学报,2006,(3):549-554.
- [24] 孟繁旭. 欧洲缬草根的活性成分分析及其挥发性成分鉴定[D]. 延吉:延边大学,2022.
- [25] 钱志瑶,周道堂,黄秀平,等. 黔产宽叶缬草 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 生物技术通报,2015,31(7):69-75.
- [26] 富贵,李军乔,包锦渊,等. 磁珠富集法开发蕨麻 SSR 标记引物[J]. 草业学报,2018,27(2):124-134.
- [27] 刘小飞,任桂萍,余超然,等. 基于 SSR 标记的 12 个非洲菊品种指纹图谱构建及杂交 F₁ 后代鉴定[J]. 广东农业科学, 2023,50(9):16-24. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2023.09.002.
- [28] 张兴,冯嘉馨,陈佳,等. 雄性不育枸杞花药比较转录组分析[J]. 基因组学与应用生物学,2022,41(6):1274-1285.
- [29] 伍越,王甜甜,李泽秀,等. 木瓜转录组数据 SSR 标记的开发及其遗传多样性分析[J]. 植物生理学报,2021,57(4):847-861.
- [30] 肖雨沙,陈秀清,李红春,等. 基于南美蟛蜞菊转录组测序的 SSR 分子标记开发及鉴定[J]. 分子植物育种,2021,19(7):2293-2299.
- [31] 罗芊芊,李峰卿,肖德卿,等. 两个南方红豆杉天然居群的交配系统分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2023,47(5):80-86.
- [32] 钱丽华,严建立,吴晓疆,等. 基于滇黄精转录组序列的 SSR 标记开发及其在黄精属资源分析中的应用[J]. 江苏农业学报, 2023,39(5):1120-1131.

- [33] 吴民华,叶晓霞,谭靖怡,等. 密花豆叶绿体基因组序列特征及密码子偏好性分析[J]. 南方农业学报, 2023, 54(6): 1633-1645.
- [34] 杨宇婷,张 强. 甜叶菊多倍体变异机制的转录组及 SSR 分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(2): 44-50.
- [35] 吕 锋,解孝满,韩 彪,等. 基于 SSR 标记的麻栎天然群体遗传多样性分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2022, 46(3): 109-116.
- [36] 刘 迪,欧阳艳飞,徐 鹏,等. 柴胡转录组 SSR 的分布及序列特征分析[J]. 南方农业学报, 2022, 53(3): 676-683.
- [37] 王彬彬,高妍夏,郭欣慰,等. 基于高通量测序的北柴胡根转录组 SSR 位点信息分析[J]. 西北农业学报, 2024, 33(4): 707-717.
- [38] 徐 舶,石凤翎,乌日娜,等. 草原 1 号杂花苜蓿花蕾转录组 SSR 序列特征[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(8): 17-24.
- [39] 陶 杰,张江江,常 丽,等. 盐胁迫下大麻 SSR 标记的分布特征分析[J]. 中国麻业科学, 2022, 44(1): 5-12.
- [40] 苏 群,田 敏,刘 俊,等. 基于生物信息学的睡莲 SSR 位点特征分析[J]. 西南农业学报, 2021, 34(10): 2076-2083.
- [41] 陈红波. 基于白及转录组数据的 EST-SSR 分子标记开发、验证及应用[D]. 遵义:遵义医科大学, 2019.
- [42] 肖雨沙,陈秀清,李红春,等. 基于南美蟛蜞菊转录组测序的 SSR 分子标记开发及鉴定[J]. 分子植物育种, 2021, 19(7): 2293-2299.
- [43] 陈贤军. 基于 SSR 和 InDel 标记的红花遗传图谱构建与遗传多样性分析[D]. 武汉:中南民族大学, 2020.
- [44] 梁燕妮,黄银霞,魏诗琴,等. 紫芽六堡茶转录组 SSR 位点序列分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(3): 42-48.
- [45] 蒋路园,吴文丽,张恺恺,等. 南方红豆杉转录组 SSR 位点分析及其分子标记开发[J]. 中草药, 2024, 55(3): 928-936.
- [46] 陈凯凌,武 涛,徐逸群,等. 燕麦全基因组 SSR 位点鉴定及多态性标记开发[J]. 生物技术通报, 2024, 40(2): 120-129.
- [47] THAO D V, YAMASHITA M, WATANABE A, et al. Development of tetranucleotide microsatellite markers in *Pinus kesiya* Royle ex Gordon [J]. Conservation Genetics Resources, 2013, 5(2): 405-407.

(责任编辑:黄克玲)