

基于丹霞梧桐转录组数据的 EST-SSR 标记开发

武星彤¹, 陈璐¹, 王敏求¹, 张原¹, 李鑫玉¹, 林雪莹¹, 周宏², 文亚峰¹

(¹中南林业科技大学风景园林学院, 长沙 410004; ²广东省韶关市野生动植物保护办公室, 韶关 512000)

摘要: 以丹霞梧桐转录组序列为基础, 开发丹霞梧桐 EST-SSR 标记位点, 并利用其对丹霞梧桐群体进行遗传多样性分析, 评价丹霞梧桐群体的遗传多样性水平, 为丹霞梧桐的合理利用和保护提供依据。应用 Primer 3.0、GenAIEx6.3、FSTAT 和 MS-tools 等软件进行引物设计和相关遗传参数分析。17858 个 SSR 位点分布于 79920 个 unigene 序列, SSR 位点密度为 1/4.78 kb。SSR 重复基序中, 三核苷酸 (43.64%) 为优势核苷酸, 其次为四核苷酸 (23.52%) 和二核苷酸 (15.54%)。三核苷酸和二核苷酸优势重复基序分别为 AAG/CTT 和 AG/CT。以 16 个样本为材料, 从设计的 73 对引物中共筛选出 16 对多态性 EST-SSR 引物, 多态性信息含量 (PIC) 的平均值为 0.546, 所开发位点具有较高的多态性。主成分分析 (PCA) 表明, 这些位点具有很好地鉴别不同地区样本, 甚至单株的能力。3 个群体的遗传多样性参数对比结果表明, 丹霞梧桐群体具有中等程度的遗传多样性, 其期望杂合度 (H_e) 的变化范围为 0.550~0.605。地质、历史气候变化及人为干扰等因素可能是造成丹霞梧桐群体偏离哈代-温伯格平衡的主要原因。本研究开发的 EST-SSR 多态性位点可为丹霞梧桐遗传结构分析和分子辅助育种等相关研究奠定良好基础。

关键词: 丹霞梧桐; 转录组; EST-SSR; 多态性

Characterization and Development of EST-SSR Markers from Transcriptome Datasets of *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S.Kiu

WU Xing-tong¹, CHEN Lu¹, WANG Min-qiu¹, ZHANG Yuan¹, LI Xin-yu¹, LIN Xue-ying¹, ZHOU Hong², WEN Ya-feng¹

(¹College of Landscape Architecture, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004;

²Department of Wildlife Conservation of Shaoguan, Shaoguan 512000)

Abstract: The microsatellite markers in *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S. Kiu were developed by taking use of the transcriptome dataset. These markers were subjected for analyzing the genetic diversity of extant populations to provide basis for rational utilization and the protection of *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S. Kiu. Primer 3.0, GenAIEx6.3, FSTAT and MS-tools were deployed to explore primers and analyze the genetic parameters. As a result, 17858 SSRs were identified from 79920 unigenes with a frequency of 1/4.78 kb. Trinucleotide, tetranucleotide and dinucleotide accounted for 43.64%, 23.52% and 15.54%, respectively. AAG/CTT and AG/CT were the most abundant repeat motif for trinucleotide and dinucleotide, respectively. Out of seventy-three primers that were tested in 16 genotypes, 16 primers were polymorphic with an average value of polymorphic information content (PIC) 0.546. The principal component analysis (PCA) showed that these loci are efficient to identify individuals from different regions and each individuals. A moderate genetic diversity among three *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S. Kiu populations and the expected heterozygosity (H_e) varied from 0.550 to 0.605 were observed. The geology, historical climate change and human disturbance may be the main reasons for *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S. Kiu deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. Taken together, these newly developed EST-SSR markers will lay foundation for unlocking the genetic structure and the marker-assisted breeding of *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S. Kiu.

Key words: *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S. Kiu; transcriptome; EST-SSR; polymorphism

收稿日期: 2019-01-21 修回日期: 2019-02-10 网络出版日期: 2019-04-08

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190121001>

第一作者研究方向为园林植物与应用, E-mail: xinxin123tong@163.com

通信作者: 文亚峰, 研究方向为园林植物与应用, E-mail: wenyafeng7107@163.com

基金项目: 国家林业局野生植物保护项目和韶关市野生动植物保护办公室项目 (2016ZWZY06)

Foundation project: Wildlife Protection Project of State Forestry Administration and Department of Wildlife Conservation of Shaoguan (2016ZWZY06)

丹霞梧桐 (*Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S. Kiu) 为梧桐科 (Sterculiaceae) 梧桐属 (*Firmiana Marsili*) 物种, 国家二级重点保护野生植物, 目前仅在广东省韶关地区有分布。丹霞梧桐最早于 1987 年在丹霞山自然保护区被发现, 故取名丹霞梧桐, 是丹霞山最主要的特征种, 也是丹霞地貌的特有物种。2015 年, 南雄市全安镇苍石寨也发现丹霞梧桐, 其分布范围从丹霞山扩大到韶关东北部地区, 群体数量呈增加趋势^[1]。2017 年, 野外种质资源调查研究表明, 目前, 两地丹霞梧桐共 7000 株左右且分布范围有限。丹霞梧桐为二倍体植株, 多生长于崖壁、沟谷和石坡, 对土壤要求不严格, 喜光照和水分。叶翠绿, 近心形, 雌雄异花同株, 顶生圆锥花序, 花朵紫红色, 果实为蓇葖果, 秋色叶为黄色, 亦非常漂亮。古有“凤凰非梧桐不栖”, 其因寓意美好, 而为人们所喜爱, 多栽植于庭前屋后。因此, 如何将丹霞梧桐引出深山, 加快丹霞梧桐的培育进程, 作为道路绿化、庭院观赏树种是广大园林工作者的当务之急。

高通量测序技术的快速发展, 不仅降低了微卫星 (SSR) 标记的开发成本, 而且显著提高了位点开发效率^[2], 使得微卫星标记在解决许多关键问题上取得了较大的突破, 已广泛应用于谱系地理学^[3-4]、群体遗传结构和亲缘关系研究^[5-7]等, 为深入探讨物种的衰退或濒危原因、确定优先保护群体、制定物种保护策略提供了强有力的科技支撑。目前, 丹霞梧桐的研究多集中于资源调查、群落特征等方面^[1, 8-9]。由于标记位点数量有限, 丹霞梧桐群体遗传学研究基础极为薄弱^[10-11], 人们对其遗传信息了解较少, 不利于该珍稀濒危物种的有效保护、资源评价以及快繁等工作的开展。本研究利用转录组测序技术, 挖掘 SSR 序列并对其特征进行分析, 从中筛选多态性 EST-SSR 位点, 并对这些位点的有效性进行评估。这些位点可为丹霞梧桐种群的科学保护、资源评价及生态适应性等研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转录组测序样品为采自南雄市丹霞梧桐的花、茎、嫩叶、皮混合组织, 液氮速冻保存后进行 RNA 提取, 等量混合后, 转交武汉爱基百客公司进行转录组测序。筛选 SSR 位点的 16 个丹霞梧桐样本于丹霞山 5 个群体 (标号: DXS) (9 个样本) 和南雄 4 个群体 (标号: NX) (7 个样本) 中选取, 每个样本间距大于 50 m, 每个群体至少选取一个样本。所有样本均采自

无病虫害单株的幼嫩叶片, 硅胶干燥保存。用于群体遗传多样性分析的 3 个群体来自于丹霞山的锦湖 (JH) 和长老峰 (ZLF) 群体以及南雄的柴岭 (WT) 群体。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法提取丹霞梧桐叶片 DNA, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 质量, Nanodrop 和 Agilent 2100 检测样品的纯度和浓度, -20 °C 保存, 用于后续试验分析。

1.2.2 SSR 位点鉴别及引物设计 对高通量测序所获得的数据, 基于 *de novo* 法, 采用 Trinity 软件对数据进行组装; 以二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸的最小重复单元分别以 6、4、3、3、3 为标准, 采用 MISA 软件查找所有的 SSR 位点, 并得到 SSR 位点的频率、密度以及 SSR 重复基元的种类和比例等。根据 SSR 核心序列排列方式的不同, SSR 可分为完全型、不完全型和复合型 3 种。而复合型 SSR 是指 2 个或 2 个以上的串联核心序列由 3 个或 3 个以上的连续的非重复碱基分隔开, 但这种连续性的核心序列重复数不少于 5。根据相关的引物设计标准以及重复序列最小重复次数为 9^[12], 采用 Primer3.0 软件设计引物, 所有 SSR 引物由武汉擎科生物科技有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增及引物筛选 采用从不同群体中挑选出的 16 个样本进行 73 对引物的初步筛选。PCR 反应体系为 20.0 μ L, 其中包括: 2 \times Taq Master Mix 10 μ L; 正向引物 (F) 和反向引物 (R) 各 1 μ L; DNA 模板 (20~50ng/ μ L) 3 μ L; ddH₂O 5 μ L。PCR 扩增程序共 42 个循环, 采用 Touchdown 程序, 以减少非特异性扩增: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 40 s, 65 °C 退火 35 s (每个循环减 1 °C), 72 °C 延伸 30 s, 共 10 个循环; 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 32 个循环, 72 °C 延伸 10 min。首先, 采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物能否成功扩增; 其次, 采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选多态性引物; 最后, 选择多态性引物合成荧光引物, 进行毛细管电泳。多态性引物序列信息已提交 NCBI 数据库 (National Center for Biotechnology Information), 并获得相关登录号 (MH053446-MH053461)。

1.2.4 数据统计及分析 GeneMarker1.9 软件进行基因数据的读取。GenAlEx6.3 软件^[13]分析位点遗传多样性参数, 包括等位基因数 (N_a)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)。FSTAT^[14] 软件计算各位点的近交系数 (F_{IS}), MS-tools 软件计算各位

点的多态性信息含量 (PIC)。Genepop on the web (<http://genepop.curtin.edu.au/>) 进行 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 检验。基于遗传距离矩阵, 利用 GenAlEx6.3 对丹霞梧桐部分样本进行主成分分析 (PCA, Principle Component Analysis), 以评估位点的鉴别能力。

2 结果与分析

2.1 转录组中 SSR 分布特征与数量

丹霞梧桐转录组共得到 79920 个 unigene 序列 (总长度为 85507665 bp), 平均长度为 1069.916 bp。从转录组序列中共挖掘得到 17858 个 SSR 位点, SSR 出现频率 (SSR 个数与总 unigene 序列的比值) 为 22.34%, 平均每 4.78 kb 出现一个 SSR 位点。

搜索到的 SSR 位点分布于 12103 个 unigene 上, unigene 出现频率为 15.14%。其中, 4393 条 unigene 含有 1 个以上 SSR 位点, 含有复合型 SSR 位点的 unigene 为 1730 条。

丹霞梧桐转录组中 SSR 种类丰富。以三核苷酸数量最多, 为 7794 个, 占总核苷酸的 43.64%。其次, 为四核苷酸和二核苷酸, 分别占总核苷酸的 23.52% (4200 个) 和 15.54% (2776 个)。五核苷酸和六核苷酸所占比例较小, 分别为 8.31% (1484 个) 和 9.00% (1604 个)。丹霞梧桐转录组 SSR 重复单元重复次数在 3~25 之间, 3~10 次重复的 SSR 位点有 17521 个, 大于 10 次重复的有 337 个。其中, 以 4 次重复的 SSR 位点最多, 占 33.08% (5908 个), 其次, 为 3 次重复, 占 32.29% (5767 个) (表 1)。

表 1 丹霞梧桐 SSR 重复类型及其重复数量变异

Table 1 SSR motif types and frequency of *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S.Kiu

重复基序 Repeat motif	重复次数 Number of repeat									总计 Total	比例 (%) Ratio
	3	4	5	6	7	8	9	10	>10		
二核苷酸 Dinucleotide	—	—	—	819	469	339	362	456	331	2776	15.54
三核苷酸 Trinucleotide	—	4720	1437	769	764	96	4	1	3	7794	43.64
四核苷酸 Tetranucleotide	3506	457	170	55	2	4	5	0	1	4200	23.52
五核苷酸 Pentanucleotide	1121	304	44	9	4	0	0	0	2	1484	8.31
六核苷酸 Hexanucleotide	1140	427	15	11	10	1	0	0	0	1604	9.00
总计 Total	5767	5908	1666	1663	1249	440	371	457	337	17858	100
比例 (%) Ratio	32.29	33.08	9.33	9.31	6.99	2.46	2.08	2.56	1.90	100	

2.2 丹霞梧桐转录组 SSR 基序重复类型和频率特征

丹霞梧桐转录组 SSR 中, 17858 个 SSR 位点中共包含 763 种重复基序 (表 2)。从分布频率来看, 三核苷酸和二核苷酸优势重复基序分别为 AAG/CTT (1614 个, 9.04%) 和 AG/CT (1598 个, 8.95%), 四核苷酸优势重复基序为 AAAG/CTTT (564 个, 3.16%)。

2.3 SSR 多态性位点的筛选及特点

为进一步利用基于转录组测序所得的丹霞梧桐 EST-SSR 引物, 对含有 SSR 位点的 unigene 序列进行引物设计, 共筛选出 73 对 EST-SSR 引物 (详见 <http://doi.org.10.13430/j.cnki.jpgr.20190121001>, 附表 1)。以丹霞梧桐 16 个样本的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 以验证这些引物的有效性。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 52 对引物可成功扩增, 有效扩增率为 71.23%; 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, 16 对引物具有多态性 (表 3), 多态性概率为 30.77%。合成 16 对荧光引物, 进行毛细管电

泳检测, 各引物目的片段清晰, 结果可靠。其中, 多态性引物 unigene_21904 的毛细管电泳结果见图 1, 其在样本 JH6、JH7 中的 PCR 扩增产物片段大小分别为 159 bp、159 bp/163 bp。

基因分型表明 (表 4), 16 对多态性 EST-SSR 引物在 16 个丹霞梧桐样本中, 共检测到 68 个等位基因 (N_a), 每对引物检测出 2~10 个等位基因, 平均为 4.813。观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 的平均值分别为 0.656 和 0.608, 平均近交系数 (F_{IS}) 为 -0.048。多态性信息含量 (PIC) 是衡量引物多态性的主要指标。对 16 个位点而言, 10 个位点表现为高度多态 ($PIC > 0.5$), 其余位点均表现为中度多态 ($0.25 < PIC < 0.5$), 平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.546。其中, 引物 unigene_15157 的多态性最丰富, 引物 unigene_37667 的多态性最低。哈代-温伯格平衡检测 (HWE) 结果表明, 9 个位点呈现不同程度的偏离哈代-温伯格平衡 (HWE)。

表 2 丹霞梧桐转录组中 SSR 重复基序分布

Table 2 The distribution of SSR motif of *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S.Kiu

重复类型 Type	基序类型数 No. of motif	重复基序 Motif types	数量 No.	比例 (%) Ratio
二核苷酸 Dinucleotide	4	AC/GT	272	1.52
		AG/CT	1598	8.95
		AT/AT	903	5.06
		CG/CG	3	0.01
三核苷酸 Trinucleotide	18	AAC/GTT	406	2.27
		AAG/CTT	1614	9.04
		AAT/ATT	596	3.34
		ACA/TGT	159	0.89
		ACC/GGT	477	2.67
		其他	4542	25.43
四核苷酸 Tetranucleotide	65	AAAC/GTTT	191	1.07
		AAAG/CTTT	564	3.16
		AAAT/ATTT	559	3.13
		AAACA/TGTT	146	0.82
		AACC/GGTT	48	0.27
		其他	2692	15.07
五核苷酸 Pentanucleotide	189	AAAAC/GTTTT	32	0.18
		AAAAG/CTTTT	175	0.98
		AAAAT/ATTTT	174	0.97
		AAACA/TGTTT	24	0.13
		AAACC/GGTTT	24	0.13
		其他	1055	5.91
六核苷酸 Hexanucleotide	487	AAAAAC/GTTTTT	10	0.06
		AAAAAG/CTTTTT	58	0.32
		AAAAAT/ATTTTT	58	0.32
		AAAACA/TGTTTT	3	0.02
		AAAACC/GGTTTT	9	0.05
		其他	1466	8.21

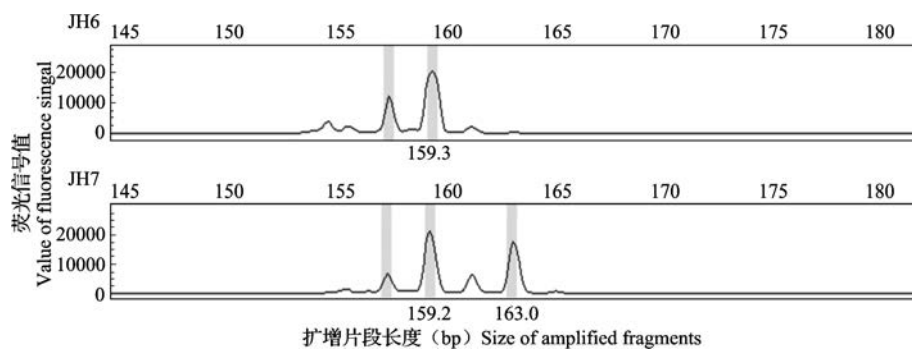


图 1 引物 unigene_21904 在丹霞梧桐样本中的荧光电泳图

Fig.1 Fluorescence electrophoresis by unigene_21904 in *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S.Kiu

表 3 丹霞梧桐 16 对多态性 EST-SSR 引物

Table 3 16 polymorphic EST-SSR primers of *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S.Kiu

序号 Number	SSR 位点 SSR locus	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	重复类型 Repeat motif	长度范围 (bp) Size range	登录号 Accession No.
1	unigene_21904	F: AGAGGTGCTGATCTGAGGGA R: ATTACCGTCATTCGTTTGC	(GA) ₁₀	150~170	MH053446
2	unigene_9882	F: TCAAAAAGAAACTGATGGGGC R: AAAATGGGTTTGGTGGTCAT	(CA) ₉	240~255	MH053447
3	unigene_33644	F: GGAGACTTCACTCGAGCCAC R: TCCCAGACAAATCTGCCTCT	(AG) ₉	195~210	MH053448
4	unigene_15157	F: CCTGCTATTGCCACATCTT R: GCTTGTTTTCTGGCTTCTG	(AT) ₁₀	230~250	MH053449
5	unigene_23055	F: AACAGACGCTGACTCACACG R: CAGCTGTCCTCCGTTAAGC	(TA) ₉	240~255	MH053450
6	unigene_60653	F: CATGCCAATACAGCAGCACT R: CAGCATATTCATGTGGTGGC	(CA) ₉	115~160	MH053451
7	unigene_30066	F: GCCTAGCCTGGGCATAATTT R: TTTGGGGTTTTGTTGGTGAT	(CT) ₁₀	230~240	MH053452
8	unigene_37667	F: CGGGTATGCCACAAGAAGTT R: TCCTTCTTTTTGATCCCCA	(CT) ₁₀	165~170	MH053453
9	unigene_25213	F: AATCCAAAGCCACACACACA R: GGTTCATGACATTGTAGGGA	(CT) ₉	110~120	MH053454
10	unigene_36790	F: GCATCTTCAGACGCAAATGA R: AAGCCTTGAAAAAGTGGCAA	(AT) ₁₀	240~255	MH053455
11	unigene_5197	F: CGACGGGTACGATCTTAAT R: TGCAGAGAGGAAAGACATGG	(TC) ₉	195~220	MH053456
12	unigene_48018	F: GATATCCCGAAACTCCAGCA R: CCAATGGTGTATTGCAGTTG	(AG) ₁₀	255~265	MH053457
13	unigene_31908	F: TGACGTGGTGGATTCTGTTC R: ACGAGATTCTGGTCTGTGCC	(AG) ₉	160~185	MH053458
14	unigene_25861	F: CTCGCTCAGTGACCATGTCT R: TCCTCACTGCTGGAGTTTTG	(TG) ₁₀	210~220	MH053459
15	unigene_42278	F: TGCACAAGAAACACGGAGAG R: CAGTCAGAGCAAAACAAGAGGA	(GA) ₉	140~160	MH053460
16	unigene_35652	F: TTCCAGCGTCAGATGAACAC R: AGGAGCTGCAGAGATCAAGC	(TA) ₁₀	270~290	MH053461

F: 正向引物; R: 反向引物

F: forward primer, R: reverse primer

2.4 多态性位点的有效性检验

主成分分析 (PCA) 结果表明 (图 2), 16 个丹霞梧桐样本可被清楚地区分开, 丹霞山群体 (DXS) 聚在一起, 南雄群体 (NX) 聚在一起, 表明同一地域的样本具有较近的亲缘关系。说明该位点具有良好的鉴别不同单株的能力。

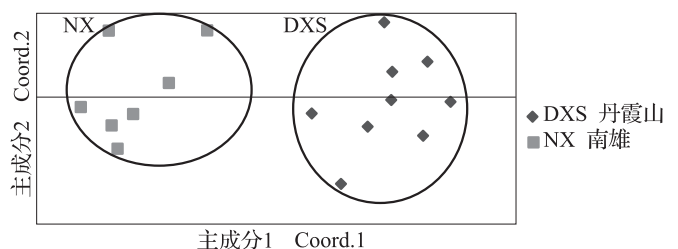


图 2 16 个丹霞梧桐单株的主成分分析

Fig.2 PCA for 16 *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S.Kiu samples

表 4 16 对丹霞梧桐 EST-SSR 标记相关参数分析

Table 4 Characterization of the 16 EST-SSR markers of *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S.Kiu

位点 Locus	等位基因 Number of alleles (N_a)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	近交系数 Inbreeding coefficient (F_{IS})	多态性信息含量 Polymorphism information content (PIC)
unigene_21904	4	0.938	0.607	-0.520**	0.527
unigene_9882	5	0.563	0.670	0.192**	0.612
unigene_33644	5	0.625	0.701	0.140	0.662
unigene_15157	7	0.625	0.777	0.227***	0.746
unigene_23055	3	0.688	0.529	-0.269	0.419
unigene_60653	4	0.625	0.680	0.112***	0.624
unigene_30066	3	0.750	0.633	-0.154	0.556
unigene_37667	2	0.375	0.305	-0.200	0.258
unigene_25213	3	0.875	0.557	-0.550**	0.474
unigene_36790	7	0.438	0.695	0.398***	0.649
unigene_5197	5	0.188	0.371	0.519**	0.348
unigene_48018	3	0.750	0.529	-0.390	0.419
unigene_31908	10	0.625	0.678	0.110	0.654
unigene_25861	3	0.938	0.529	-0.758***	0.419
unigene_42278	4	0.750	0.725	-0.003**	0.675
unigene_35652	9	0.750	0.734	0.011	0.698
平均 Mean	4.813	0.656	0.608	-0.048	0.546

** , *** 分别代表该位点偏离哈代 - 温伯格平衡 (HWE) 的程度 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

** , *** represent the deviation from HWE (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

2.5 群体遗传多样性分析

通过 16 对 EST-SSR 引物对 3 个丹霞梧桐群体 (76 个样本) 进行遗传多样性研究 (表 5), 从等位基因数 (N_a) 和多态性信息含量 (PIC) 进行分析, 长老峰 (ZLF) 群体 > 柴岭 (WT) 群体 > 锦湖 (JH) 群体, 说明长老峰 (ZLF) 群体的遗传多样性最丰富, 个体间遗传变异丰富。从观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 的比较来看, 3 个群体的观测杂合度均大于期望杂合度, 说明群体内无杂合子缺失现象, 群体内不存在近亲繁殖现象。3 个群体 (JH、ZLF、WT) 的平均近交系数 (F_{IS}) 分别为 -0.277、-0.110 和 -0.107, 表明丹霞梧桐群体均表现为杂合子过剩, 群体接近随机交配。哈代 - 温伯格平衡 (HWE) 检测结果表明, 3 个群体均不同程度的偏离哈代 - 温伯格平衡, 其可能来源于地质、历史气候变化及人为干扰等因素的影响。

3 讨论

对梧桐属植物而言, 丹霞梧桐目前仅在韶关丹

霞山和南雄有分布, 云南梧桐在绝迹近 20 年后于 2017 年在金沙江畔被发现, 海南梧桐也多生长于原始森林之中, 其天然群体多生于悬崖峭壁之上。恶劣的生境造成了除青桐之外其他梧桐属植物鲜为人知, 加之分布地域的特殊性、局限性以及数量少, 致使其相关研究寥寥, 尤其是分子方面的研究更少。

本研究表明, 丹霞梧桐 SSR 出现频率为 22.34%, 高于楠木^[15] (13.97%)、杉木^[16] (6.05%)、红松^[17] (4.24%)、华仁杏^[18] (19.21%), 低于榿树^[19] (23.76%)、长柄双花木^[20] (42.63%), 其可能与转录组测序样本的来源、建库方法、SSR 位点搜索标准具有一定关系。因此, 为更客观地对不同的转录组数据进行分析, 某种程度上来说, 亟需更加统一的参数设置标准。丹霞梧桐 SSR 位点的密度为 1/4.78 kb, 其高于大别山五针松^[21] (1/23.08 kb)、牡丹^[22] (1/9.24 kb)、非洲菊^[23] (1/5.6 kb), 低于茶树^[24] (1/3.55 kb)、橡胶树^[25] (1/2.55 kb), 转录组数据的大小、相关数据分析软件、软件参数设置标准等, 可能是造成不同物种的 SSR 位点密度存在差异的

表 5 16 对 EST-SSR 引物在 3 个丹霞梧桐群体中的遗传多样性分析
Table 5 Characterization of 16 EST-SSR markers for three *Firmiana danxiaensis* H.H.Hsue & H.S.Kiu populations

位点 Locus	精湖 JH (N=23)				长老峰 ZLF (N=29)				柴岭 WT (N=24)			
	等位基因 Number of alleles (Na)	观测杂合度 Observed heterozygosity (Ho)	期望杂合度 Expected heterozygosity (He)	多态性信息含量 Polymorphism information content (PIC)	等位基因 Number of alleles (Na)	观测杂合度 Observed heterozygosity (Ho)	期望杂合度 Expected heterozygosity (He)	多态性信息含量 Polymorphism information content (PIC)	等位基因 Number of alleles (Na)	观测杂合度 Observed heterozygosity (Ho)	期望杂合度 Expected heterozygosity (He)	多态性信息含量 Polymorphism information content (PIC)
unigene_21904	6	1.000	0.631	0.562	4	0.966	0.558	0.464	3	0.957	0.606	0.528
unigene_9882	3	0.909	0.522	0.407	4	0.724	0.601	0.518	5	0.333	0.567	0.502
unigene_33644	5	0.957	0.761	0.720	5	0.621	0.650	0.587	4	0.478	0.498	0.454
unigene_15157	7	0.714	0.840	0.819	7	0.600	0.801	0.773	7	0.750	0.672	0.617
unigene_23055	4	0.522	0.627	0.552	6	0.862	0.646	0.582	3	0.714	0.489	0.407
unigene_60653	2	0.348	0.287	0.246	3	0.241	0.653	0.579	5	0.667	0.734	0.687
unigene_30066	3	0.571	0.602	0.529	3	0.759	0.515	0.399	3	0.870	0.521	0.406
unigene_37667	3	0.909	0.515	0.404	2	0.828	0.485	0.367	3	0.250	0.223	0.206
unigene_25213	3	1.000	0.612	0.532	3	1.000	0.532	0.423	3	0.955	0.582	0.499
unigene_36790	4	0.571	0.507	0.462	8	0.393	0.726	0.694	6	0.478	0.707	0.658
unigene_5197	3	0.174	0.162	0.154	3	0.103	0.482	0.422	7	0.409	0.771	0.733
unigene_48018	2	0.522	0.454	0.351	5	0.862	0.561	0.479	2	0.870	0.499	0.375
unigene_31908	5	0.500	0.475	0.434	9	0.389	0.701	0.665	7	0.625	0.656	0.625
unigene_25861	2	1.000	0.500	0.375	3	0.966	0.530	0.422	3	0.826	0.530	0.443
unigene_42278	4	0.773	0.532	0.448	4	0.966	0.590	0.505	4	0.696	0.665	0.602
unigene_35652	7	0.955	0.773	0.739	4	0.655	0.647	0.575	6	0.381	0.370	0.353
均值 Mean	3.94	0.714	0.550	0.483	4.563	0.683	0.605	0.528	4.438	0.641	0.568	0.506

主要原因。丹霞梧桐优势核苷酸为三核苷酸。对大多数植物而言,其优势核苷酸均为二、三核苷酸^[16,26-27],也有单核苷酸为主的物种^[28-29],但其优势重复基序略有差异。其中AAG/CTT是丹霞梧桐三核苷酸中最丰富的重复基序,其与“芙蓉李”^[30]、黄皮^[29]、油茶^[31]等的三核苷酸的优势重复基序相同,此外,其也与Morgante等^[32]认为双子叶植物中AAG/CTT为主要三核苷酸重复基序的观点相符。

丹霞梧桐位点多态性概率为30.77%,低于刺梨^[33](52.17%)、牡丹^[22](39.9%),其多态性概率相对较低,可能与建库所用样本、内含子缺失、剪切拼接技术以及筛选引物的样本数量等有关。一定程度上,随着筛选引物样本数量的增加,其多态性引物比率增加的可能性较大。*PIC*值反映了所开发的等位基因的多态性水平,本研究中,16对引物的平均多态性信息含量(*PIC*)为0.546,表明所开发的EST-SSR位点呈高度多态性。

本研究开发的16对EST-SSR引物不仅为丹霞梧桐群体遗传结构分析和适应性进化研究提供了良好的候选标记,也为其保护、自然回归奠定了基础。根据丹霞梧桐的生境等条件,对丹霞梧桐的保护应通过建立自然保护区等以就地保护为主。同时,对遗传多样性较高的群体予以优先保护,并加强其宣传保护工作的开展。与此同时,由于EST-SSR标记良好的种间扩增性,其也是梧桐属及其近缘种开展相关研究的有利工具。

致谢: 本研究获韶关市野生动植物保护办公室委托项目资助(2016ZWZY06)。感谢广东省韶关市丹霞山管理委员会陈昉主任、陈再雄园长和广东省南雄市林业局钟平生主任在资源调查中给予的支持和帮助。

参考文献

- [1] 陈璐,周宏,王敏求,武星彤,林雪莹,张原,文亚峰.丹霞梧桐群落特征比较研究.中国野生植物资源,2018,37(2):46-49
Chen L, Zhou H, Wang M Q, Wu X T, Lin X Y, Zhang Y, Wen Y F. Community characteristics comparison of *Firmiana danxiaensis* species. Chinese Wild Plant Resources, 2018, 37(2): 46-49
- [2] Yu J N, Won C, Jun J, Lim Y, Kwak M. Fast and cost-effective mining of microsatellite markers using NGS technology: an example of a Korean water deer *Hydropotes inermis argyropus*. PLoS One, 2011, 6(11): e26933
- [3] 孙荣喜.中国枫香树遗传多样性及谱系地理研究.北京:中国林业科学研究院,2017
Sun R X. Genetic diversity and phylogeography of *Liquidambar formosana* Hance in China. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2017
- [4] 程蓓蓓.中国红豆杉属分子谱系地理学与遗传多样性研究.北京:中国林业科学研究院,2016
Cheng B B. Molecular phylogeographic and genetic diversity of *Taxus* L. (Taxaceae) in China. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2016
- [5] Li B J, Wang J Y, Liu Z J, Zhuang X Y, Huang J X. Genetic diversity and ex-situ conservation of *Loropetalum subcordatum*, an endangered species endemic to China. BMC Genetics, 2018, 19(1): 12
- [6] 包文泉,乌云塔娜,杜红岩,李铁柱,刘慧敏,王淋,白玉娥.基于SSR标记的西藏光核桃群体遗传多样性和遗传结构分析.林业科学,2018,54(2):30-41
Bao W Q, Wuyun T N, Du H Y, Li T Z, Liu H M, Wang L, Bai Y E. Genetic diversity and population structure of *Amygdalus mira* in the Tibet Plateau in China based on SSR markers. Scientia Silvae Sinicae, 2018, 54(2): 30-41
- [7] Feng X Y, Liu J, Chiang Y C, Gong X. Investigating the genetic diversity, population differentiation and population dynamics of *Cycas segmentifida* (Cycadaceae) endemic to Southwest China by multiple molecular markers. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1-14
- [8] 罗晓莹,陈秋慧,蔡纯榕,曾浩宁,任斌,郑万里,冯均尧.极小种群植物丹霞梧桐群落的地理区系成分分析.韶关学院学报,2015(12):28-31
Luo X Y, Chen Q H, Cai C R, Zeng H N, Ren B, Zheng W L, Feng J Y. Analysis on geographical elements of the community of plant species with extremely small populations *Firmiana danxiaensis*. Journal of Shaoguan University Natural Science, 2015(12): 28-31
- [9] 欧阳杰,黄进.中国丹霞地貌空间分布探讨.地理空间信息,2011,9(6):55-59
Ouyang J, Huang J. Spatial distribution of Danxia landforms in China. Geospatial Information, 2011, 9(6): 55-59
- [10] Fan Q, Chen S F, Li M W, He S Y, Zhou R C, Liao W B. Development and characterization of microsatellite markers from the transcriptome of *Firmiana danxiaensis* (Malvaceae). Applications in Plant Sciences, 2013, 1(12): 13-47
- [11] Chen S F, Li M W, Hou R F, Liao W B, Zhou R C, Fan Q. Low genetic diversity and weak population differentiation in *Firmiana danxiaensis*, a tree species endemic to Danxia landform in northern Guangdong, China. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 55: 66-72
- [12] Ueno S, Moriguchi Y, Uchiyama K, Ujino-Ihara T, Futamura N, Sakurai T, Shinohara K, Tsumura Y. A second generation framework for the analysis of microsatellites in expressed sequence tags and the development of EST-SSR markers for a conifer, *Cryptomeria japonica*. BMC Genomics, 2012, 13(1): 136
- [13] Peakall R, Smouse P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel, population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Resources, 2006, 6(1): 288-295
- [14] Goudet J. FSTAT (Version 2.9.3): a computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity, 1995, 86(6): 485-486

- [15] 时小东, 朱学慧, 盛玉珍, 庄国庆, 陈放. 基于转录组序列的楠木 SSR 分子标记开发. 林业科学, 2016, 52(11): 71-78
Shi X D, Zhu X H, Sheng Y Z, Zhuang G Q, Chen F. Development of SSR markers based on transcriptome sequence of *Phoebe zhennan*. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52(11): 71-78
- [16] 文亚峰, 韩文军, 周宏, 徐刚标. 杉木转录组 SSR 挖掘及 EST-SSR 标记规模化开发. 林业科学, 2015, 51(11): 40-49
Wen Y F, Han W J, Zhou H, Xu G B. SSR mining and development of EST-SSR markers for *Cunninghamia lanceolata* based on transcriptome sequences. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(11): 40-49
- [17] 张振, 张含国, 莫迟, 张磊. 红松转录组 SSR 分析及 EST-SSR 标记开发. 林业科学, 2015, 51(8): 114-120
Zhang Z, Zhang H G, Mo C, Zhang L. Transcriptome sequencing analysis and development of EST-SSR markers for *Pinus koraiensis*. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(8): 114-120
- [18] 赵罕, 高福玲, 郭欢欢, 乌云塔娜, 朱高浦. 华仁杏幼果转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发. 植物遗传资源学报, 2018, 19(5): 987-992
Zhao H, Gao F L, Guo H H, Wuyun T N, Zhu G P. *De novo* transcriptomic analysis and development of EST-SSRs for *Huaren apicot*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(5): 987-992
- [19] 张敏, 周彩红, 陈焱, 戴文圣, 张迟. 榿树转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发. 果树学报, 2017, 34(10): 1258-1265
Zhang M, Zhou C H, Chen T, Dai W S, Zhang C. Analysis of SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Torreya grandis*. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(10): 1258-1265
- [20] 孟艺宏, 徐瑀, 徐刚标. 基于转录组序列的长柄双花木 SSR 标记开发. 植物遗传资源学报, 2018, 19(4): 740-747
Meng Y H, Xu X, Xu G B. Development of SSR markers based on transcriptome sequences of *Disanthus cercidifolius* var. *longipes*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(4): 740-747
- [21] Xiang X Y, Zhang Z X, Wang Z G, Zhang X P, Wu G L. Transcriptome sequencing and development of EST-SSR markers in *Pinus dabeshanensis*, an endangered conifer endemic to China. *Molecular Breeding*, 2015, 35(8): 158
- [22] Wu J, Cai C F, Cheng F Y, Cui H L, Zhou H. Characterization and development of EST-SSR markers in tree peony using transcriptome sequences. *Molecular Breeding*, 2014, 34(4): 1853-1866
- [23] Gong L, Deng Z. EST-SSR markers for gerbera (*Gerbera hybrida*). *Molecular Breeding*, 2010, 26(1): 125-132
- [24] Sharma R K, Bhardwaj P, Negi R, Mohapatra T, Ahuja P S. Identification, characterization and utilization of unigene derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis* L.). *BMC Plant Biology*, 2009, 9(1): 53
- [25] Feng S P, Li W G, Huang H S, Wang J Y, Wu Y T. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Molecular Breeding*, 2009, 23(1): 85-97
- [26] Li Z Z, Tian H, Zhang J J. Characterization and development of EST-derived SSR markers in *Sinowilsonia henryi* (Hamamelidaceae). *Applications in Plant Science*, 2017, 5(11): 1700080
- [27] Ferrão L F V, Caixeta E T, Pena G, Zambolim E M, Cruz C D, Zambolim L, Ferrão M A G, Sakiyama N S. New EST-SSR markers of *Coffea arabica*: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. *Molecular Breeding*, 2015, 35(1): 31
- [28] 魏秀清, 许玲, 章希娟, 余东, 陈志峰, 张丽梅, 陈长忠, 许家辉. 莲雾转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发. 园艺学报, 2018, 45(3): 541-551
Wei X Q, Xu L, Zhang X J, Yu D, Chen Z F, Zhang L M, Chen C Z, Xu J H. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in Wax Apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(3): 541-551
- [29] 陆育生, 陈喆, 常晓晓, 邱继水, 林志雄, 潘建平. 黄皮转录组 SSR 挖掘及其可用性分析. 园艺学报, 2018, 45(1): 149-158
Lu Y S, Chen Z, Chang X X, Qiu J S, Lin Z X, Pan J P. Excavation and usability analysis of SSR from transcriptome of *Clausena lansium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(1): 149-158
- [30] 方智振, 叶新福, 周丹蓉, 姜翠翠, 潘少霖. ‘芙蓉李’ 转录组 SSR 信息分析与分子标记开发. 果树学报, 2016, 33(4): 416-424
Fang Z Z, Ye X F, Zhou D R, Jiang C C, Pan S L. Analysis on SSR information in ‘Furongli’ plum transcriptome and development of molecular markers in *Prunus salicina* Lindl. *Journal of Fruit Science*, 2016, 33(4): 416-424
- [31] 李海波, 王珊, 丁红梅, 陈友吾, 胡传久, 李楠, 魏海龙. 普通油茶转录组 EST-SSR 分子标记开发. 植物生理学报, 2017, 53(7): 1267-1278
Li H B, Wang S, Ding H M, Chen Y W, Hu C J, Li N, Wei H L. Development of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Camellia oleifera*. *Plant Physiology Journal*, 2017, 53(7): 1267-1278
- [32] Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 2002, 30(2): 194-200
- [33] 鄢秀芹, 鲁敏, 安华明. 刺梨转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发. 园艺学报, 2015, 42(2): 341-349
Yan X Q, Lu M, An H M. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Rosa roxburghii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(2): 341-349