

山白树微卫星特征分析及分子标记开发

王家, 周天华*

(陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001)

[摘要] **目的:** 山白树是中国特有珍稀濒危植物。分析微卫星特征, 开发其微卫星分子标记。**方法:** 采用 Illumina 二代测序技术建立山白树基因组文库和微卫星文库, 分析微卫星组成类型, 设计山白树引物, 用5个山白树种群进行扩增和检测以分析其多态性。**结果:** 二代测序共返回 38,942,660 条 100 bp 配对序列, 通过质量修剪及拼接得到 200,386 条拼接序列, 其中长度 >335 bp 的为 7 614 条; 在 7 614 条序列中检测出微卫星位点 694 个, 其中单核苷酸重复最多, 单核苷酸重复中 A/T 重复数量最多; 二核苷酸长度变异最大, 其中 AG/CT 重复数量最多, 重复长度变异情况与微卫星丰度呈正相关。为 36 条山白树微卫星重复次数高的序列设计引物, 经聚合酶链式反应 (PCR) 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 20 对引物多态性丰富且条带清晰, 等位基因数 (N_A) 在 3~6 之间, 平均为 4, 多态性信息含量 (PIC) 0.535 5~0.754 0, 平均值 0.615 5。对 5 个山白树种群的群体遗传分析发现, 该物种遗传多样性较高 ($h = 0.697 5, I = 1.436 8, H_E = 0.702 2$), 种群遗传分化显著 ($F_{st} = 0.374$)。**结论:** 通过部分山白树的群体遗传也可以说明本次开发的引物可用性较好。该研究开发了山白树微卫星分子标记引物, 为山白树分子遗传学奠定了基础。

[关键词] 山白树; 微卫星; 特征分析; 分子标记; 基因组; 多态性

[中图分类号] R284.1; R282.5; R289; R22; R931.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0143-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190320

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.0949.016.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 14:59

Development of Novel Microsatellite Markers and Characteristic Analysis for *Sinowilsonia henryi*

WANG Jia, ZHOU Tian-hua*

(School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the microsatellite characteristics and develop microsatellite markers for *Sinowilsonia henryi*, a rare and endangered plant endemic to China. **Method:** The Illumina second generation sequencing technology was used to establish the genome library and the microsatellite library of *S. henryi*. The compositions of the microsatellite were analyzed, and the primers of *S. henryi* were designed. Its polymorphism was analyzed by the amplification and detection of 5 *S. henryi* populations. **Result:** A total of 38,942, and 660 matched sequences of 100 bp were returned by the second generation sequencing. Among them, 200,386 splice sequences were obtained by mass pruning and splicing; the number of sequences with length greater than 335 bp was 7 614, and 694 microsatellite loci were detected in the 7 614 sequences, in which the single nucleotide repeats were most and the number of A/T repeated in the single nucleotide repeats was highest. Dinucleotide showed the greatest length variation; the number of AG/CT repeats was highest, and the variation in repeat length was

[收稿日期] 20180628(014)

[基金项目] 2017年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2017]66号);陕西省科技厅统筹创新工程项目(2015KTSSF01-02);2018年陕西省教育厅科研计划专项(18JK0156)

[第一作者] 王家,在读硕士,从事分子生态研究,E-mail:1070918852@qq.com

[通信作者] *周天华,博士,从事植物分子生态与遗传研究,E-mail:zhou3687@126.com

positively correlated with microsatellite abundance. The primers were designed for 36 *S. henryi* microsatellite sequences with high repetition. By PCR amplification and polyacrylamide gel electrophoresis, 20 pairs of primers showed rich polymorphism and clear bands. The number of alleles (N_A) ranged from 3 to 6, with average of 4; the polymorphism information content (PIC) ranged from 0.535 5 to 0.754 0, with average of 0.615 5. The population genetic analysis of 5 *S. henryi* populations showed that the genetic diversity of the species was high ($h = 0.697 5$, $I = 1.436 8$, $H_E = 0.702 2$), and the population genetic differentiation was significant ($F_{st} = 0.374$).

Conclusion: The population genetic analysis of *S. henryi* also showed that the primers developed by this study had a high usability. In this study, the primers of microsatellite markers of *S. henryi* were established, laying the foundation for the molecular genetics of *S. henryi*.

[**Key words**] *Sinowilsonia henryi*; microsatellite; characteristics analysis; molecular marker; genome; polymorphism

山白树为金缕梅科山白树属的多年生乔木,是中国特有属珍稀植物^[1],分布于我国的陕西、四川、重庆、山西、河南、湖北等地,海拔 1 100 ~ 1 600 m,生长在山坡、谷地、杂木丛林中,具有喜光、喜肥、喜水的特性^[2]。

山白树作为中国特有属植物,具有重要的研究价值,对研究我国植物区系的发生、演化和地理变迁以及被子植物的起源与演化均有重要的理论价值^[3]。山白树作为中国特有的珍稀植物,还具有很高的应用价值,研究发现,其花粉中含有人体必需的氨基酸,维生素等,并且,其种子中含有丰富的蛋白质和脂肪,并且还含有钾、钙、镁等多种对人体有益的矿物质元素,可作为经济植物进行开发利用。山白树作为园林绿化植物,不仅增加了城市园林绿地系统植物多样性,也在迁地保护以及提高人们环保意识等方面都具有非常重要的意义^[4]。山白树现存量少,已被列为陕西省重点保护植物^[1,5],被世界自然保护联盟列为易危物种(VU)。

分子标记是以以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记,揭示来自 DNA 的变异,能够反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性 DNA 片段。近年来,随着分子生物学的发展,分子标记技术已经应用在植物的遗传多样性、系统学及种质资源鉴定等方面。分子标记具有快速、微量等优点,并且不受生育阶段、环境条件、储藏等因素影响,因此,分子标记在遗传等方面的应用十分普遍^[6]。

微卫星 DNA(microsatellite DNA)也称为简单重复序列(simple sequence repeats, SSRs),是由 1 ~ 6 bp 的重复单元串联而成一段 DNA,广泛存在于各类真核生物基因组的的不同位置。SSR 分子标记是一种易于分析的标记,在基因组分析, QTL 定位,全基

因组关联和标记辅助选择等众多育种应用中被高度评价。SSR 标记由于其简单易用,从第二代测序数据或公共序列数据库中获得了大规模开发,成为人们高度青睐的标记^[7]。在众多的分子标记(如 ISSR, AFLP 等)中,SSR 标记由于其高重复性、高可变性、多等位性、共显性遗传、广泛的基因组覆盖、染色体特异性定位等优点而得到了广泛的应用^[8-9]。何燕妮^[10]使用 ISSR 技术对 8 个居群山白树的遗传多样性进行了研究,发现山白树在物种水平上遗传多样性较高,在居群间与居群内都存在遗传分化,且主要遗传分化来自居群内部。张婕等^[11]研究了川贝母转录组中的 SSR 位点信息,研究结果可以为川贝母分子辅助育种和种质资源保护提供一定的技术支撑。

本研究基于第二代测序建立山白树的基因文库,设计出微卫星引物,分析微卫星特征,筛选出适用于山白树分子遗传学的 SSR 分子标记。

1 材料

本研究材料来自于陕西省佛坪种群(FP),湖北神农架种群(SNJ),陕西省金丝峡种群(JSX),湖北武当山种群(WDS),陕西华龙山种群(HLS)。采集金缕梅科山白树(*Sinowilsonia henryi*)的新鲜幼嫩叶片,装入自封袋,用硅胶干燥, -20 °C 保存。

2 × Taq Master Mix(近岸蛋白质科技有限公司,批号 07971); DNA marker PUC18 DNA/Mspl(北京天根生化科技有限公司,批号 03430); ddH₂O, 0.1 × TE 缓冲液[10 mmol Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0), 稀释 10 倍]; 1 × TBE 电泳缓冲液[Tris 碱 54 g, 硼酸 27.5 g, 0.5 mol·L⁻¹ EDTA 20 mL(调节 pH 8.0), 加超纯水定容至 1 L, 稀释 5 倍]; NanoDrop 2000 型紫外分光光度计(赛默飞世尔科技公司); S1000TM 型聚合酶链式反应

(PCR)扩增仪, Gel Doc™ XR+ 型凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 山白树 DNA 提取 采用改良 $2 \times$ CTAB 法提取山白树样本的基因组 DNA, 溶解在 $100 \mu\text{L}$ $0.1 \times$ TE 缓冲液中, 放于 0°C 保存。其纯度检测采用紫外分光光度计。记录 DNA 浓度和吸光度在 $260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$ 处的比值, 若比值在 $1.8 \sim 2.0$, 则 DNA 可用做研究。各取 $10 \mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶实验检测其完整性, 实验采用 1% 琼脂糖凝胶, 用凝胶成像仪拍照并保存。

2.2 山白树基因文库的构建与微卫星特征分析 提取山白树种群 1 个个体的全基因组 DNA, 采用 Illumina 二代测序技术获取大量 100 bp 短序列片段, 构建山白树基因组文库。二代测序建库工作由北京 NOVogene 生物科技公司代理完成。

DNA 片段采用 CLC Genomics Workbench 软件进行组装^[12], 设置一定阈值, 初步筛选出适合微卫星位点开发的潜在序列集合 (长度大于 335 bp)。应用 MISA (Micro-Satellite identification tool, MISA, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 进行扫描, 对这些序列进行 SSR 区段筛选, 提取含微卫星位点的序列, 建立山白树的微卫星文库。筛选标准为, 单核苷酸重复至少 10 次, 二核苷酸重复至少 6 次, 三核苷酸与四核苷酸重复至少 5 次, 五核苷酸与六核苷酸重复至少 4 次。通过软件统计, 得到微卫星片段总数以及各个重复类型的数量, 利用 Excel 2007 软件对所得数据进行统计分析。

2.3 山白树微卫星引物设计和检测 选取 36 个含微卫星重复次数较长位的序列, 采用 Oligo v7 软件分别设计正反引物^[13], 送往生工生物工程 (上海) 股份公司合成引物。

采用设计的 36 对微卫星引物对佛坪种群 (FP) 的 24 个山白树样本进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。PCR 反应体系的总体积为 $10 \mu\text{L}$, 其中 Mix $5 \mu\text{L}$, 上下游引物各分别 $1 \mu\text{L}$, DNA 模板 $1 \mu\text{L}$, ddH_2O $2 \mu\text{L}$ ^[14]。PCR 反应在 PCR 扩增仪上的运行程序: 94°C 预变性 3 min ; 94°C 变性 30 s ; 退火温度下持续 45 s ; 72°C 延伸 45 s ; 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min ; 4°C 保存。在完成 PCR 循环 48 h 内, 取 PCR 扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 实验条件为, PCR 扩增产物 $2 \mu\text{L}$, 电压 140 V , 恒压, 电泳缓冲溶液为 $1 \times$ TBE, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10% , 电泳时间 14 h 。对电泳后的聚丙烯酰胺凝

胶进行银染和显影, 用凝胶成像系统采集图像并保存。选出条带比较明显, 且和预期长度相近的 SSR 引物。主要参考依据为, 能否扩增出条带, 是否含有较多的等位基因数目, 多态性是否丰富等。使用 Excel 2007 软件对电泳图进行条带统计, 采用人工读带的方式记录主要带型, 忽略弱杂带。使用软件 Powermarker 计算各位点的等位基因数目^[15], 多态性信息含量 (PIC), 检测各引物是否符合哈定-温伯格平衡。选出具有多态性的引物 ($A \geq 2$) 用于后续山白树种群遗传分析。

2.4 山白树种群遗传分析 用初筛选所得多态性引物对 SNJ, JSX, WDS, HLS 种群进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。统计条带数据, 并使用 Popgen32 软件分析各引物的等位基因数 (N_A), 观测杂合度 (H_0), 期望杂合度 (H_E), Nei's 遗传多样性指数 (H) 和香农多样性指数 (I)。应用软件 Arlequin 3.0 对山白树 5 个种群进行分子方差分析 (AMOVA), 计算种群的遗传分化指数 (F_{st}) 和基因流 (N_m)。用 GenAlEx 6.3 在 Excel 2007 中进行 PCA 聚类。

3 结果与分析

3.1 山白树 DNA 的提取 用 $2 \times$ 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取到的山白树 DNA 效果良好, 吸光度在 $260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$ 处的比值在 $1.8 \sim 2.0$, 用于本研究效果良好。

3.2 山白树的微卫星序列组成与相关特征 二代测序共返回 $38,942,660$ 条 100 bp 配对序列 (paired sequences), 采用 CLC Genomics Workbench 软件进行质量修剪 (quality trimming) 得到 $38,942,650$ 条配对序列, 然后组装得到 $200,386$ 条拼接序列 (contigs), 筛选出其中长度大于 335 bp 的序列共 7614 条。利用 MISA 软件从 7614 条序列中共发现微卫星片段 694 个, 含有微卫星的序列占总序列的 9.11% 。其中以单核苷酸重复最多, 占总微卫星序列数的 51.87% , 二核苷酸重复次之, 占总微卫星重复数量的 34.01% , 三核苷酸重复占总微卫星重复数量的 9.08% , 四核苷酸重复占 0.58% , 五核苷酸重复占 3.31% , 六核苷酸重复占 1.15% , 见表 1。

3.3 微卫星序列长度及变异情况 在单核苷酸中重复数量最多的是 A/T, 有 352 个, 占单核苷酸重复总数的 97.78% 。二核苷酸重复中, AG/CT 重复数量最多, 占二核苷酸重复总数的 68.22% , AT/AT 占 21.61% , 而 AC/GT 数量最少, 仅占 10.17% 。三核苷酸重复中, AAG/CTT 重复数量最多, 占三核苷酸

表 1 不同重复基元类型的 SSR 在山白树基因组的出现频率

Table 1 Occurrence frequency of SSR with different repeating element types in *Sinowilsonia henryi* genome

重复类型	数量	所占比例/%	出现频率/%
单核苷酸重复	360	51.87	4.73
二核苷酸重复	236	34.01	3.10
三核苷酸重复	63	9.08	0.83
四核苷酸重复	4	0.58	0.05
五核苷酸重复	23	3.31	0.30
六核苷酸重复	8	1.15	0.10

重复总数的 38.10%，AAT/ATT 的重复数量次之，占 26.98%，ATC/ATG 占 17.46%，这三种是三核苷酸主要的重复类型，其余重复类型占三核苷酸重复总数的比例较少。四核苷酸重复中，AAAT/ATTT 重复数量最多，占四核苷酸总重复数量的 50%。在五核苷酸重复中，AAACC/GGTTT 重复数量最多，占五核苷酸总重复数量的 52.17%。六核苷酸重复中，8 种六核苷酸的重复数量相同，都只有一个，占六核苷酸重复总数的 12.5%，分布很均匀。大多数山白树微卫星位点的重复类型都是 A/T，体现出了一些碱基的偏好性。碱基的重复类型情况见表 2。

从表 2 看来，山白树微卫星序列长度范围较大，在 10~80 bp，其中二核苷酸重复序列长度范围最大，在 12~80 bp。其他重复类型长度变化分别为，单核苷酸重复长度在 10~60 bp，三核苷酸重复长度在 15~48 bp，四核苷酸重复长度在 20~20 bp，五核苷酸重复长度在 20~30 bp，六核苷酸重复长度在 24~36 bp。其中，四核苷酸重复序列的长度全部都是 20 bp，长度并无变异。在所有重复单元中，所占比例最高的是 A/T (50.72%)，其次是 AG/CT (23.20%)，可以看出在山白树微卫星位点中出现频率最高的碱基对是 A/T。

在所有重复单元的微卫星长度变异情况中，二核苷酸重复的变异程度最高，共有 26 种不同的长度变化；其次是单核苷酸的重复长度变异，共有 23 种不同的长度变化；而四核苷酸重复的长度无变异。在各重复类型中，重复长度变异情况与微卫星丰度呈正相关。见图 1。

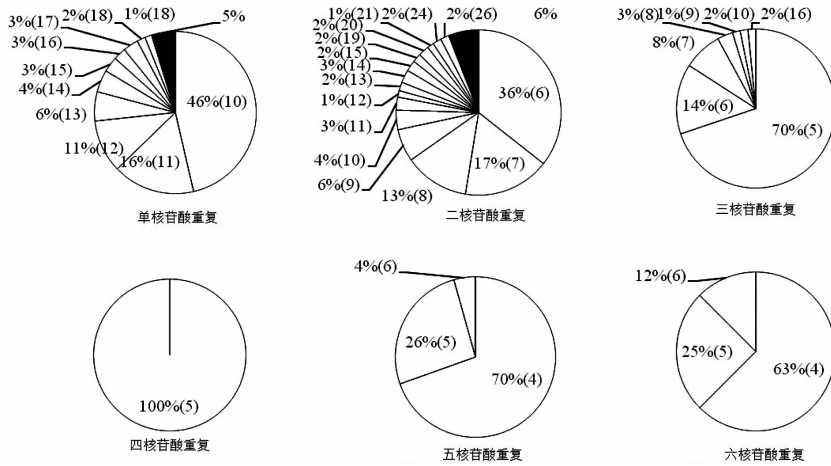
3.4 山白树 SSR 引物的筛选 本研究初筛选采用 24 个来自佛坪种群的山白树样本对 36 对引物进行扩增和检测，见表 3。结果表明，有 7 对引物未能在扩增出目标条带，有 9 对引物仅扩增出 1 条条带（没有多态性），其余 20 对引物能扩增出清晰稳定的条

表 2 山白树 SSR 引物不同重复基元数量长度比例

Table 2 Number, length and proportion of SSRs with different repeat motifs

重复类型	重复基元	数量 / 个	长度范围 / bp	平均长度 / bp	所占比例 / %
单核苷酸	A/T	352	10~60	12.78	50.72
	C/G	8	10~11	10.38	1.15
二核苷酸	AC/GT	24	12~80	31.17	3.46
	AG/CT	161	12~68	18.50	23.20
三核苷酸	AT/AT	51	12~20	13.96	7.35
	AAC/GTT	3	15~30	20	0.43
四核苷酸	AAG/CTT	24	15~48	17.63	3.46
	AAT/ATT	17	15~21	16.94	2.45
	ACC/GGT	5	15~24	17.4	0.72
	AGG/CCT	2	15	15	0.29
	ATC/ATG	11	15~21	16.09	1.59
	CCG/CGG	1	15	15	0.14
	AAAAG/CTTT	1	20	20	0.14
五核苷酸	AAAT/ATTT	2	20	20	0.29
	AAGT/ACTT	1	20	20	0.14
	AAAAT/ATTTT	3	20~25	21.67	0.43
	AAACC/GGTTT	12	20~30	22.5	1.73
	AAAGG/CCTTT	1	20	20	0.14
	AAAGT/ACTTT	1	20	20	0.14
	AAATC/ATTTG	1	20	20	0.14
六核苷酸	AAGAG/CTCTT	2	20	20	0.29
	AAGGG/CCCTT	2	20~25	22.5	0.29
	AGCCG/CGGCT	1	20	20	0.14
	AAAAAG/CTTTTT	1	24	24	0.14
	AAAAAT/ATTTTT	1	24	24	0.14
	AAAGAG/CTCTTT	1	30	30	0.14
	AAAGCC/CTTTGG	1	30	30	0.14
七核苷酸	AAATGG/ATTTCC	1	24	24	0.14
	AACCCT/AGGGTT	1	36	36	0.14
	AAGACC/CTTGCT	1	24	24	0.14
	AAGCTC/AGCTTG	1	24	24	0.14

带且具有多态性，可以用与后续研究，见图 2。用初筛选过所得条带清晰且具有多态性引物对 SNJ, JSX, WDS, HLS 种群进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。利用 Powermarker 软件统计这 20 对引物的等位基因数目等多态性信息，见表 4，这 20 个多态性位点的 N_A 共 74 个，变化范围为 3~6，平均值为 4；PIC 范围 0.535 5~0.754 0，平均值 0.615 5；



每一扇区对应不同长度的微卫星,若对应长度微卫星频率 $\leq 1\%$,则一起合并并在黑色扇区内。

图 1 山白树基因组序列中含不同长度重复单元的微卫星长度变异情况

Fig. 1 Length diversification of microsatellites in genome sequences of *Sinowilsonia henryi*

各引物均符合哈定-温伯格平衡 ($P < 0.05$)。

3.5 山白树种群的遗传多样性与遗传分化 筛选的 20 对引物在另外的 4 个种群应用方面,使用 20 对引物对 SNJ, JSX, WDS, HLS 种群进行 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测,统计数据,见表 5。从表 5 可以看出,4 个种群的 N_A 的平均值都在 2 个以上,WDS 种群和 JSX 种群的 N_A 平均值都在 3 个以上,并且 4 个种群的 H_E 平均值都在 0.42 以上。与 FP 种群相比, N_A 平均值差距不大,5 个种群的 N_A 平均值在 2.15 ~ 3.6 个;5 个种群的 H_E 在 0.423 9 ~ 0.548 4。这些标记对不同的山白树种群表现出较好的扩增和多态性。总的来说,另外 4 个种群的遗传信息特征与 FP 种群差异很小,表明所设计筛选的 20 对引物的通用性良好。部分引物的等位基因数目较少,可能与模板 DNA 浓度、纯度、扩增大小、PCR 条件等因素有关。

本研究对 5 个种群共 76 份样本进行种群遗传多样性分析,分子方差分析 (AMOVA) 结果表明,5 个种群间遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.374,表明山白树遗传分化强烈,有 62.6% 的变异来自种群内,37.4% 的变异来自种群间。5 个种群间的基因流 (N_m) 为 0.449 4,表明种群间的基因交流较弱。

图 3 是基于 20 对引物的 5 个种群的 PCoA 分析结果。结果表明,5 个山白树种群聚为了 4 个支。FP 种群,JSX 种群和 WDS 种群彼此分开,分别聚为一支;HLS 种群与 SNJ 种群聚为另一支,表现出了较近的遗传关系。

4 讨论

本研究从 7 614 条山白树基因组序列中共筛选

出微卫星位点 694 个。总的来说,含有微卫星位点的序列占总序列数量的 9.11%,与珍珠粟 (7.5%),扁豆 (6.95%) 相比,微卫星含量更丰富^[16-17];但与靛蓝 (34.8%),黄麻 (13.2%),豇豆 (10.8%),天麻 (19.83%) 等植物相比,微卫星含量较低^[18-21]。有研究报道,在不同植物中,不同重复类型的核苷酸的偏好性型也不同。在靛蓝中,单核苷酸重复所占比例最高,占核苷酸重复总数的 52.37%,与山白树相同;而在木兰中^[22],单核苷酸所占比例最多 (43.21%),四核苷酸重复数量所占比例次之 (27.13%),在黄麻中,则是三核苷酸重复所占比例最高 (60%),二核苷酸重复所占比例次之 (37.65%);山白树中,单核苷酸重复所占比例最高,二核苷酸次之,其体现了相同重复基元在不同植物微卫星中的偏好性。在黄麻,山白树以及其他双子叶植物中,二核苷酸重复中,AG/CT 的重复最为普遍^[23]。

本研究的微卫星分子标记是基于 Illumina 二代测序技术建立山白树的基因文库,在此基础上设计并筛选出微卫星引物,本研究首次将这项技术应用于山白树微卫星引物的开发,同时,首次建立了山白树的微卫星文库。

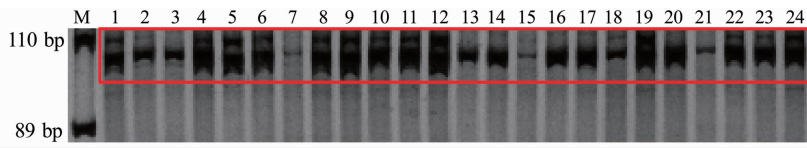
本次筛选的 20 对引物其多态性信息含量是从 0.535 5 ~ 0.754 0,平均为 0.615 5,与黄麻 (0.34),意大利谷子 (0.376) 相比^[19,24],山白树微卫星引物多态性信息含量平均值较高,表明本次开发的山白树的微卫星引物的多态性信息含量是比较丰富的。从表 4 中可以看到等位基因数在 3 ~ 6 个变化,其平均值为 4,表明合成出来的引物对 DNA 的检测是

表 3 本研究设计的 36 对山白树微卫星引物及初筛选

Table 3 Mcrosatellite primers of *Sinowilsonia henryi*

位点	引物序列(5'-3')		重复 序列	预期 长度 /bp	退火 温度 T_m /°C	等位 基因数 N_A /个
	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')				
SBSSSR01	AATTCTGGGTAGTTTGTATAT	TATACAAGATCCTCATAACAGT	(TCT)7	106	49.7	0
SBSSSR02	CATCAGTCAAATAAAATGGAT	ATTACTAAGAGACATACCAAT	(ATA)8	215	49.8	3
SBSSSR03	AAAGAAAATATTGAAGTGGCT	ACTCTTTAATCTTGCACCT	(GA)15	305	52.3	1
SBSSSR04	ATCAAAACCCACAAGTAGGT	CAAAACTCAAAAAGAACCAAT	(CT)15	107	54.6	3
SBSSSR05	TGGAGTCTCTAAAGCTACAAT	AACATCCAATGCTAATATGGC	(TCT)7	238	54.2	3
SBSSSR06	TTATAGAAGTCCCTGTCCGAT	CCCTTATGTTATGGCTCGTCT	(AT)9	166	56.5	4
SBSSSR07	ATTAAGACTTCAATCCCGTTT	TGACAAAAGTCCGACAAAAAT	(TC)13	320	53.2	4
SBSSSR08	CTTAATGTTTTCAAGTCTGCT	TGCATTTATTTGTTATFCAAT	(AT)9	166	50.3	1
SBSSSR09	AGCAACCCCTTCTTTCATFCTT	GTATGGATCTCCCCCTCTCTT	(GA)9	74	58.4	1
SBSSSR10	TAGGAAACTTTAAATGGGTTC	AATTTCTCTTAATATAATGCCAT	(TC)16	196	49.6	3
SBSSSR11	ATTCTAGCAACCCAAAACGCAT	TTCTTCATTTTCGTGGGCAAG	(TC)14	212	58.5	0
SBSSSR12	ACTTCACTTTACATCATGGCT	CAAACAACATTTTCTTTTTTCT	(GA)21	334	53.1	1
SBSSSR13	AGATATTTCAATTAAGAACGGAT	GGAAGATTTGGCTTGGCACAC	(AG)10	259	54.5	3
SBSSSR14	TTACTAGCTCCTCATCCGTG	TGTGCATAGTATACGTGAAAT	(TC)12	260	52.9	4
SBSSSR15	AGTGCCTGAATAGCCAAAAG	TCTCCATTTCTCGCTCGTTCT	(GA)10	277	59.1	0
SBSSSR16	ACTTCATCTTCTTTTCAAGT	AATCCTTCCACCGAGACAACCT	(AG)12	367	56.7	1
SBSSSR17	ATAGAGGAGGAAGAAGGGAGT	CCAGCCAAGAATCACCATCAT	(GA)9	66	58.5	0
SBSSSR18	GCTGGATCTGCCGGCGCACCT	AGAGACAGAGAGAAAGCACAG	(TC)12	89	63.0	3
SBSSSR19	CTCTCCCTTCTTGGTCTCCT	TGAAGTGTGGTTGTTTTAATT	(CT)14	123	57.6	4
SBSSSR20	ACAACAGTTAATTAGCCCACT	TTTGGCTGTCTAATTGTGAAT	(AG)13	332	54.9	1
SBSSSR21	CTTCTACCGTATTCTCCTAT	GCAACCAATCAATTATACACGT	(AGA)9	150	54.7	4
SBSSSR22	ACATGCATAAACTAACAACCT	TGAATCCTTTGTTAGTGCATT	(AAG)14	308	53.5	4
SBSSSR23	CAAATGTAGCTTCGTAGAGAT	AACAGGTACTTCCCTCCTCT	(GA)14	360	56.9	1
SBSSSR24	TATAAAAAGAAGCCCTAACTCT	AGTTATTCACTTATTTGCTCT	(GAA)14	202	50.1	0
SBSSSR25	TGCTCTTCAAATCCCAGAGAT	AGTCAAGCGCCTCCACAACCT	(GGT)8	101	61.2	3
SBSSSR26	AGATCGGACAGAAACAAAT	GATTTGAGGTAGGTTTCTAT	(AC)21	128	52.9	1
SBSSSR27	AGCCAACATCATAAAGTTCCT	AGGGAGAAGGGAGAGACCGT	(TC)20	324	55.0	0
SBSSSR28	GGAAAGAGCCTTGCATAATTT	TACTACAGCCATTAATTCTCT	(TC)13	132	53.0	4
SBSSSR29	TTGTAATAAGGGAGTAATGCT	TCAATAAATGCACCAACTCCT	(TTG)10	217	52.8	4
SBSSSR30	AATGTACCACAAACTTATACT	ATTTCAAAGAGTGTTCAGCTT	(GA)19	247	53.5	4
SBSSSR31	AGAACAGAGATTCAAGCGAGT	ATTTTTATCTCGCTGCTCCGT	(GA)11	197	58.3	3
SBSSSR32	CCGTGAATCTAAGAGACTGAT	ACCGCGTTAATAGAACAAAT	(AG)15	219	55.2	4
SBSSSR33	CTATCATGCTTACCTAACATCT	TCATCAACAAGAAGAGGCAAT	(AGA)11	297	53.9	0
SBSSSR34	GTATAAATATCTTGAGAGGGG	GTTTCATCAATTCTATGCCAAT	(GAAA)11	252	50.6	1
SBSSSR35	GTTTTACTTTCTCCTCCTTCT	GCCCCCTTTGTTACCTCATT	(TC)14	83	55.2	3
SBSSSR36	CATGTTCGTAGTACCACCG	AAACTCTCCTCGCATATTACT	(CT)11	141	54.6	3

可用的,与黄麻(2.7),葫芦(1.64),甜菜(3.22)等植物相比^[19,25-26],山白树微卫星引物平均等位基因



M. Marker

图 2 引物 SBSSSR25 对佛坪种群 24 个个体的扩增效果

Fig. 2 Amplification effects of SBSSSR25 on 24 individuals for population FP

表 4 山白树 SSR 引物的遗传分化参数

Table 4 Parameters of genetic differentiation among SSR primer pairs

位点	预期长度 /bp	等位基因数 N_A	观测杂合度 H_O	期望杂合度 H_E	多态性信息含量 PIC
SBSSSR002	215 ~ 221	3	0.461 8	0.454 5	0.554 7
SBSSSR004	105 ~ 109	6	0.480 4	0.272 7	0.539 2
SBSSSR005	232 ~ 238	3	0.424 6	0.272 7	0.549 9
SBSSSR006	162 ~ 168	4	0.424 6	0.272 7	0.668 9
SBSSSR007	316 ~ 324	4	0.297 5	0.363 6	0.684 7
SBSSSR010	167 ~ 169	5	0.457 6	0.318 2	0.571 1
SBSSSR013	257 ~ 263	3	0.510 3	0.363 6	0.576 9
SBSSSR014	256 ~ 266	4	0.457 6	0.318 2	0.691 5
SBSSSR018	87 ~ 91	3	0.429 8	0.363 6	0.535 5
SBSSSR019	119 ~ 125	4	0.453 5	0.318 2	0.754 0
SBSSSR021	147 ~ 159	4	0.424 6	0.363 6	0.733 8
SBSSSR022	303 ~ 311	4	0.424 6	0.318 2	0.617 4
SBSSSR025	101 ~ 107	3	0.424 6	0.363 6	0.569 7
SBSSSR028	130 ~ 136	4	0.512 4	0.326 8	0.671 3
SBSSSR029	211 ~ 220	4	0.586 0	0.444 4	0.621 8
SBSSSR030	245 ~ 251	4	0.625 0	0.444 4	0.687 4
SBSSSR031	195 ~ 199	3	0.563 2	0.500 0	0.549 9
SBSSSR032	215 ~ 211	6	0.646 6	0.722 2	0.639 1
SBSSSR035	81 ~ 85	3	0.623 4	0.555 5	0.538 7
SBSSSR036	141 ~ 145	6	0.578 7	0.666 6	0.554 7

数更高,表明本研究所开发的引物变异性较强。平均杂合度的高低代表了山白树分子标记的多态性的高低,种群的平均杂合度越高,表明用做分子标记的基因位点的多态性越高。由表 4 可以知道观测杂合度最高可以达到 0.646 6,最低是 0.297 5,这个种群的平均杂合度为 0.490 3,结果表明本研究开发出的引物多态性很好。

曹玲亚等^[27]基于 SSR 技术对中国部分党参属药用植物进行了研究,对其遗传多样性及遗传结构进行了评价,其中 $F_{st} = 0.157 7 < 0.25$,表明遗传

表 5 5 个山白树种群的遗传多样性

Table 5 Genetic diversity of 5 *Sinowilsonia henryi* populations

种群名称	等位基因数 N_A /个	期望杂合度 H_E	香农多样性指数 I	Nei's 遗传多样性指数 H
FP	3.60	0.548 4	0.957 6	0.537 0
HLS	2.15	0.433 3	0.598 5	0.390 0
WDS	3.05	0.445 7	0.705 6	0.434 0
SNJ	2.45	0.423 9	0.645 9	0.402 7
JSX	3.15	0.475 2	0.806 1	0.462 0
物种水平	6.50	0.702 2	1.436 8	0.697 5

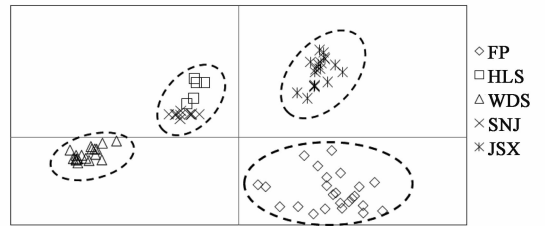


图 3 山白树 5 个种群 PCA 聚类分析

Fig. 3 PCA clustering results of five populations based on 20 pairs of markers

分化不强烈。本文通过分子方差分析(AMOVA)表明,山白树遗传分化强烈($F_{st} = 0.374$),物种间遗传差异显著,物种间基因流较弱($N_m = 0.449 4$)。主相关性分析结果表明,HLS 种群和 SNJ 种群聚为一支,然后 WDS 种群,FP 种群与 JSX 种群分别聚为一支,聚类结果基本符合山白树的地理分布范围。这也表明本研究所开发的微卫星引物有较高的多态性和鉴别区分度。

山白树属于珍稀濒危树种,其研究价值和保护价值巨大,但山白树容易受到外界环境的影响,从而导致不同环境中生长的山白树存在差异,通过山白树微卫星则可以准确地将同种山白树在不同的环境中的差异区分开来,从分子角度对其进行鉴定。本研究开发出了山白树 20 对微卫星引物,其等位基因数目、基因多样性指数、期望杂合度、观测杂合度等各项指标,都达到了预期要求,可用于后续的遗传多样性和指纹图谱研究,将对山白树的保护提供一定

的支撑。

[参考文献]

- [1] 国家环境保护局,中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危保护植物名录. 第一册[M]. 北京:科学出版社,1987.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1979:100-101.
- [3] 吴征镒,孙航,周浙昆,等. 中国植物区系中的特有性及其起源和分化[J]. 云南植物研究,2005,27(6):577-604.
- [4] 张立军. 中国特有属珍稀濒危植物山白树的保护生物学研究[D]. 汉中:陕西理工学院,2014.
- [5] 中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物信息系统[EB/OL]. <http://rep.iplant.cn/prot/Sinowilsonia%20henryi%20var.%20henryi>.
- [6] 冯尚国,朱宇佳,焦凯丽,等. DNA 分子标记技术在酸浆属药用植物中的应用研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(4):672-675.
- [7] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genomic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends Biotechnol, 2005, 23 (1): 48-55.
- [8] Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27 (4): 617-631.
- [9] XU Y, Crouch H J. Marker assisted selection in plant breeding: from publications to practice [J]. Crop Sci, 2008, 48(2):391-407.
- [10] 何燕妮. 濒危植物山白树遗传多样性分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [11] 张婕,李西文. 川贝母转录组中 SSR 位点信息分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(18):30-35.
- [12] 朱大强,李存,陈斌,等. 四种常用高通量测序拼接软件的应用比较[J]. 生物信息学,2011,9(2):106-112.
- [13] ZHOU T H, DONG S S, LI S, et al. Genetic structure within and among populations of *Saruma henryi*, an endangered plant endemic to China[J]. Biochem Genet, 2012, 50(1/2):146-158.
- [14] Akagi T, Norihiko K, Claus R B, et al. Functional analysis of a novel DNA polymorphism of a tandem repeated sequence in the asparagine synthetase gene in acute lymphoblastic leukemia cells[J]. Leuk Res, 2009, 33(7):991-996.
- [15] LIU K, Muse S V. Power marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9):2128-2129.
- [16] Supriya A, Senthilvel S, Nepolean T, et al. Development of a molecular linkage map of pearl millet integrating DArT and SSR markers [J]. Theor Appl Genet, 2011, 123(2):239-250.
- [17] Sen G D, PENG C, Gaurav S, et al. Development of a panel of unigene-derived polymorphic EST-SSR markers in lentil using public database information [J]. Crop J, 2016, 4(5):425-433.
- [18] GUO L N, ZHAO X L, GAO X F. De novo assembly and characterization of leaf transcriptome for the development of EST-SSR markers of the non-model species *Indigofera szechuensis* [J]. Biochem Systemat Ecol, 2016, 68: 36-43.
- [19] Dipnarayan S, Rajeev S R, Sukla C, et al. Development of a set of SSR markers for genetic polymorphism detection and interspecific hybrid jute breeding [J]. Crop J, 2017, 5(5):416-429.
- [20] CHEN H L, WANG L X, LIU X Y, et al. De novo transcriptomic analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) for genic SSR marker development [J]. BMC Genetics, 2017, 18:65-77.
- [21] 周天华,丁家玺,田伟,等. 天麻基因组微卫星特征分析与分子标记开发[J]. 西北植物学报,2017,37(9):1728-1735.
- [22] Srivastava D, Shanker A. Identification of simple sequence repeats in chloroplast genomes of magnoliids through bioinformatics approach [J]. Interdiscip Sci, 2016, 8(4):327-336.
- [23] Sonah H, Deshmukh R K, Sharma A, et al. Genome-wide distribution and organization of microsatellites in plants: an insight into marker development in *Brachypodium* [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21298.
- [24] ZHAO W G, Lee G A, Kwon S W, et al. Development and use of novel SSR markers for molecular genetic diversity in Italian millet (*Setaria italica* L.) [J]. Genes Genomics, 2012, 34(1):51-57.
- [25] Mehtap Y, Hugo E C, Suat S, et al. Transferability of Cucurbita SSR markers for genetic diversity assessment of Turkish bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) genetic resources [J]. Biochem Syst Ecol, 2015, 59:45-53.
- [26] Taški-Ajduković K, Nevena N, Živko Ćurčić, et al. Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers [J]. Electron J Biotechnol, 2017, 27:1-7.
- [27] 曹玲亚,谷聪,孙海峰,等. 基于 SSR 标记的党参属部分药用植物的遗传多样性和遗传结构评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(24):45-52.

[责任编辑 顾雪竹]