

多花黄精转录组 SSR 位点分析及分子标记开发

陈友吾¹, 廖荣俊², 叶碧欢¹, 宋其岩¹, 杨 阳³, 李 楠¹, 李海波^{1*}

1. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023

2. 衢州市林业推广站, 浙江 衢州 324002

3. 浙江农林大学, 浙江 杭州 311300

摘 要: **目的** 基于转录组测序数据鉴别和分析多花黄精 EST-SSR 位点, 开发可用于多花黄精种质资源评价与利用的 SSR 标记。**方法** 利用 MISA 工具从多花黄精转录组 126 544 条 Unigenes 中鉴定 SSR 位点并分析; 利用 Primer 3.0 设计 SSR 引物, 随机选择 50 对 SSR 引物进行有效性验证。**结果** 从 9 982 条 Unigenes 中鉴定出 12 317 个包含 2~6 个核苷酸重复类型的 SSR 位点, SSR 的分布频率为 9.73%, 发生频率为 1/5.91 kb; SSR 位点中的主导类型是二核苷酸重复, 占总 SSR 的 53.14%, 其次是三核苷酸重复, 占 33.31%。SSR 引物的有效性筛选显示, 50 个 SSR 引物对中有 29 个 (58%) 可从多花黄精中扩增出预期大小的 SSR 条带。SSR 荧光标记的毛细管电泳检测显示在多花黄精的 7 个 SSR 位点共鉴定出了 9 种基因型, 进一步验证了 SSR 引物的有效性。**结论** 多花黄精转录组 SSR 位点出现频率高, 重复类型丰富, 多态性较高, 这将为多花黄精遗传多样性分析和遗传图谱构建提供大量有价值的候选标记, 也可为黄精属内种间物种的分子鉴别、多花黄精优良品种的分子辅助育种提供技术手段。

关键词: 多花黄精; 转录组; EST-SSR; 分子标记; 多态性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)01-0182-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.024

Analysis on SSR loci in transcriptome and development of molecular markers in *Polygonatum cyrtonema*

CHEN You-wu¹, LIAO Rong-jun², YE Bi-huan¹, SONG Qi-yan¹, YANG Yang³, LI Nan¹, LI Hai-bo¹

1. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China

2. Quzhou City Forestry Popularization Station, Quzhou 324002, China

3. Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China

Abstract: **Objective** EST-SSR loci were identified and analyzed based on the transcriptome sequencing data in *Polygonatum cyrtonema*, in order to develop SSR markers suitable for evaluation and application of germplasm resources on *P. cyrtonema*. **Methods** SSR loci were identified and analyzed in all of 126 544 Unigenes by using MISA tool. SSR primers were designed by using Primer 3.0 software and 50 pairs of SSR primers were randomly selected for validation test. **Results** A total of 12 317 SSR loci, including the types of 2—6 nucleotide repeats with occurring frequency of 1/5.91 kb, were identified from 9 982 Unigenes in *P. cyrtonema* transcriptome. The distribution frequency of SSRs was 9.73%. Dinucleotide repeat was the main type, accounting for as much as 53.14% of all SSRs, followed by trinucleotide repeat (33.31%). The validation test on 50 pairs of SSR primers showed that 29 of them (58%) generated fragments with expected molecular size from *P. cyrtonema*. The capillary electrophoresis using fluorescence-labeled SSR markers showed that nine genotypes were identified at seven SSR loci in *P. cyrtonema*, which further demonstrated the validity of these SSR primers. **Conclusion** There are numerous SSRs in *P. cyrtonema* transcriptome with high frequency, rich repeat types and relatively high polymorphic, which will provide abundant valuable candidate markers for genetic diversity analysis and genetic mapping construction in *P. cyrtonema*, also can be used as a technical tool for molecular identification among *Polygonatum* species and for molecular marker assistant breeding in superior cultivars of *P. cyrtonema*.

Key words: *Polygonatum cyrtonema* Hua.; transcriptome; EST-SSR; molecular markers; polymorphism

收稿日期: 2019-05-17

基金项目: 浙江省中央财政林业科技推广项目 (2017-TS04); 浙江省衢州市科技攻关项目 (2018-K45)

作者简介: 陈友吾 (1974—), 男, 副研究员, 研究方向为林下植物栽培。Tel: (0571)87798224 E-mail: 21853245@qq.com

*通信作者 李海波 (1969—), 男, 研究员, 研究方向为经济林育种。Tel: (0571)87798226 E-mail: lihaibo@126.com

黄精为百合科 (Liliaceae)、黄精属 *Polygonatum* Mill. 多年生草本植物, 全球有 60 余种, 主要分布于北温带和北亚热带, 我国有 31 种, 广泛分布于除南方热带以外的广大地区^[1]。滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *P. sibiricum* Red. 和多花黄精 *P. cyrtonema* Hua. 一同收录于《中国药典》2015 年版, 作为中药材黄精的基原, 在抗衰老、调节免疫力、调血脂、改善记忆力、抗肿瘤、抗菌等方面均显示出潜在的药用价值^[2-3]。我国黄精属植物种质资源非常丰富, 大多处于野生状态, 近年来的过度采挖不仅使得主产区资源锐减、濒临枯竭, 也对黄精的生境造成了严重破坏。因此, 有必要进行资源收集保护, 并开展人工栽培技术与遗传多样性研究, 为解决黄精植物的资源匮乏提供新途径, 为良种选育与新种质创制、种间分类依据和保护策略提供有效参考。

鉴定实验材料的遗传多样性是研究物种起源进化、发现新的基因资源、改良现有育种材料的基础工作。DNA 分子标记是研究种质资源遗传多样性的重要手段, 也是一种重要的分子辅助育种方法。近年来, 分子标记技术包括随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、简单序列重复区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 以及 DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术已被用于黄精属植物的亲缘关系研究、种质资源鉴别和遗传多样性分析^[4-8]。这些在分子水平上开展的研究为黄精属植物的准确鉴别与优良品种的选育提供了可参考的技术手段。

随着高通量测序技术的快速发展与测序成本的不断降低, 在许多物种的研究上, 利用新一代测序技术产生了丰富的转录组数据。基于 Illumina 转录组测序 (RNA-Seq) 获得的 EST 数据进一步挖掘有价值的简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 位点已在药用植物如裂叶牵牛、人参、党参、甘草、黄秦艽、厚朴等得到应用^[9-14]。简单重复序列又称微卫星 (microsatellite), 主要是以 2~5 个核苷酸为基本重复单位的串联重复序列, 微卫星标记为共显性标记, 能区分纯合子和杂合子, 能检测复等位基因, 且具有多态性丰富、操作简单、结果可靠、重复性好等优点。但目前公布的黄精属植物 SSR 标记中仅 40 个具有较高的多态性, 能够利用的黄精属 SSR 标记数量非常有限, 远远不能满足黄精属植物的遗传多样性分析、遗传图谱构建、品种

辅助选育等^[15]。

利用 Illumina 转录组测序技术, 课题组前期已获得了多花黄精幼叶的大量转录组数据。基于序列数据组装拼接后获得的 Unigenes 数据, 本研究将进行多花黄精 EST-SSR 位点的鉴别, 对 SSR 位点的组成、分布及特征进行分析, 并初步验证 SSR 标记的有效性, 以期为黄精属植物资源的遗传多样性分析、遗传图谱构建等研究提供有力工具, 为黄精属内种间物种的分子鉴别、优良品种的分子辅助育种提供技术手段。

1 材料与试剂

1.1 材料

多花黄精材料分别来自 2 个种源地, 一份采自海拔 1 240 m 的浙江省龙游县庙下乡 (N: 28°49'47.57", E: 119°09'14.76"), 树龄 5 年, 命名为 LYPc; 一份采自海拔 869 m 的浙江省开化县音坑乡 (N: 29°12'4.45", E: 118°24'51.41"), 树龄 3 年, 命名为 KHPc。2 份材料经浙江大学金孝锋教授鉴定为百合科多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua.。用于转录组测序的材料为 LYPc, 采集幼嫩叶片, 液氮速冻后进行 RNA 提取、cDNA 文库构建和 Illumina 转录组测序, 对原始数据进行过滤后得到的高质量数据使用 Trinity 软件 (r20131110) 进行组装, 拼接组装后得到 126 544 条 Unigenes, 总长为 72.84 Mb。用于 SSR 有效性验证的材料为 KHPc, 采集幼嫩叶片作为提取基因组 DNA 的供试材料, 放置于硅胶袋密封保存。

1.2 试剂

新型快速植物基因组 DNA 提取试剂 (北京百泰克)、PCR 扩增试剂 2×TSINGKE Master Mix (北京擎科有限公司), 在正向 SSR 引物的 5'端修饰的荧光染料是 FAM(blue), 荧光 SSR 引物和普通 SSR 引物合成 (北京擎科有限公司)。用于毛细管电泳检测的内标试剂是 Hi-DiTM Formamide (ABI)、GeneScanTM-500 Liz Size Standard (ABI)。

2 方法

2.1 多花黄精基因组 DNA 提取

将经硅胶干燥后的多花黄精幼嫩叶片彻底粉碎后用于提取基因组 DNA。DNA 提取方法参照新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明, 提取后的 DNA 经 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 测定浓度, 并经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 于-20 °C 保存备用。

2.2 多花黄精转录组 SSR 位点的鉴别及 SSR 引物设计

利用 MicroSATellite (MISA, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 工具对拼接组装得到的 Unigenes 进行 SSR 位点的识别定位。筛选标准: 二核苷酸重复的次数在 6 次或 6 次以上, 三至六核苷酸重复的次数在 5 次或 5 次以上。同时, 也筛选中间被少数碱基 (间隔小于 100 或等于 100) 打断的不完全重复的 SSR。利用 Primer 3.0 对筛选得到的 SSR 位点设计引物, 引物设计原则: 引物序列长度 18~22 bp, PCR 产物长度 100~300 bp, GC 含量 40%~60%, 退火温度 50~63 °C, 尽量避免出现发夹结构、二聚体、错配和引物二聚体。

2.3 SSR-PCR 分析

20 μ L SSR-PCR 的扩增体系: 2 $\times$ TSINGKE Master Mix 10 μ L, 荧光标记 (FAM) 的正向 SSR 引物 (10 mmol/L) 1.5 μ L, 反向引物 (10 mmol/L) 1.5 μ L, DNA 模板 (20 ng/mL) 3 μ L, 加 ddH₂O 补齐到 20 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 7 min 后; 94 °C 变性 45 s, 退火 45 s (不同 SSR 引物的最佳退火温度不同), 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后于 72 °C 补平 7 min, 终止温度为 4 °C。PCR 扩增后的产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶 (Gelred 染色) 电泳, 扩增图谱的摄取采用 Chemi Doc XRS imaging system (Bio-Rad)。

2.4 毛细管电泳检测

内标配制: 取 10 mL Hi-Di 和 80 μ L 500 LIZ 混匀, 离心, 以每孔 10 μ L 分装于 96 孔内标板, 离心。将 SSR-PCR 产物电泳, 根据电泳胶图做一定稀释 (最低可检测质量浓度为 0.1 ng/mL), 离心。取稀释产物 0.5 μ L 加入到分配好的内标板中, 混匀, 离心, 放入 PCR 仪, 于 96 °C 变性 5 min。20 °C 下迅速冷冻 2 min, 离心。置入 DNA 分析仪 (Applied Biosystems) 进行毛细管电泳检测。用 Data Collection 3.0 软件收集数据。

2.5 数据统计与分析

用 GeneMapper 4.1 软件对 Data Collection 软件收集的原始数据进行分析。软件系统将根据目标峰的位置与同一泳道中的内标 GeneScan™ 500 Liz 进行比较, 直接给出目标 SSR 片段的准确数值 (bp)。纯合位点的等位变异数据记录为 X/X, 其中 X 为该等位变异的数值大小; 杂合位点的等位变异数据记录为 X/Y, 其中 X、Y 为该位点 2 个不同等位变异

的数值大小。

3 结果与分析

3.1 SSR 位点的数量与分布

利用 MISA 工具对多花黄精转录组的 126 544 条 Unigenes (72.84 Mb) 的 cDNA 序列进行识别, 在 9 982 条 Unigenes 中找到 12 317 个符合条件的 SSR 位点, 发生频率 (含有 SSR 的 Unigene 数/总 Unigene 数) 为 7.89%。其中, 8 181 条 Unigenes 包含单个 SSR 位点, 1 801 条 Unigenes 包含 1 个以上 SSR 位点, 其中复合型的占 1 233 条。SSR 的分布频率 (SSR 的个数/总 Unigene 数) 为 9.73%。多花黄精转录组中平均 5.91 kb 发现 1 个 SSR 位点。

多花黄精转录组 SSR 种类较为丰富, 各重复类型均有, 但各种类型的出现频率有较大差异 (表 1), 二核苷酸重复类型的数量最多, 占 53.14%; 其次是三核苷酸重复类型, 占 33.31%。四、五、六核苷酸重复类型的数量很少, 只占到总 SSR 的 13.55%。

多花黄精转录组中 SSR 位点的序列总长度为 206 937 bp, 位点平均长度为 16.80 bp, 其中, 二、三、四、五和六核苷酸类型 SSR 位点的平均长度分别为 15.86、16.93、17.00、21.04 和 25.62 bp。多花黄精转录组中 SSR 位点的重复次数以 6 次最多 (3 436 个), 占总 SSR 的 27.9%, 其中以二核苷酸最多 (2 376 个)。其次为重复 5 次 (2 729 个, 22.16%)、重复 7 次 (1 939 个, 15.74%)、重复 4 次 (1 328 个, 10.78%) 和重复 8 次 (1 163 个, 9.44%)。重复次数相对较少的 SSR 位点为重复 9、10、 ≥ 15 和 11 次, 依次为 6.17%、3.57%、2.19% 和 1.49%。重复次数极少的 SSR 位点为重复 14、12 和 13 次, 依次为 0.27%、0.25% 和 0.03% (表 2)。

3.2 SSR 位点的分布特征

从多花黄精 SSR 核苷酸基序类型 (表 3) 来看, SSR 以二核苷酸 (6 545) 重复基序为主要类型, 其次是三核苷酸 (4 103)、四核苷酸 (878)、六核苷酸 (453) 和五核苷酸 (338) 重复类型。在二核苷酸重复基序中以 AG/CT 为主 (5 118, 78.20%), 且以 6~8 次重复为主; 在三核苷酸重复基序中以 AGG/CCT 为主 (802, 19.55%), 且以 5~6 次重复为主; 在四核苷酸重复基序中以 AAAT/ATTT 为主 (341, 38.84%), 且以 4~5 次重复为主; 在五、六核苷酸重复基序中分别以 AAAAT/ATTTT (86, 25.44%) 和 AACCT/AGGGT (31, 6.84%) 为主, 且均以 4 次重复为主。

表 1 多花黄精转录组 SSR 类型和出现频率

Table 1 Distribution of SSR motifs in *P. cyrtoneura* transcriptome

重复类型	数量	占比/%	分布频率/%	总长度/bp	平均长度/bp	平均距离/kb
二核苷酸	6 545	53.14	5.17	103 828	15.86	11.13
三核苷酸	4 103	33.31	3.24	69 471	16.93	17.75
四核苷酸	878	7.13	0.69	14 924	17.00	82.96
五核苷酸	338	2.74	0.27	7 110	21.04	215.51
六核苷酸	453	3.68	0.36	11 604	25.62	160.80
总计	12 317	100.00	9.73	206 937	16.80	5.91

表 2 多花黄精转录组 SSR 位点重复次数分布

Table 2 Distribution of number of repeats in SSR loci in *P. cyrtoneura* transcriptome

重复类型	SSR 位点个数											
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	≥15
二核苷酸	0	0	2 376	1 454	1 055	735	425	183	21	0	30	266
三核苷酸	0	2 441	1 022	472	106	25	15	1	10	4	3	4
四核苷酸	698	149	25	4	2	0	0	0	0	0	0	0
五核苷酸	277	52	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
六核苷酸	353	87	4	9	0	0	0	0	0	0	0	0
总计	1 328	2 729	3 436	1 939	1 163	760	440	184	31	4	33	270

表 3 多花黄精转录组中的 SSR 类型分布

Table 3 Distribution of SSR repeat types in *P. cyrtoneura* transcriptome

重复类型	基序	重复数	合计	重复类型	基序	重复数	合计
二核苷酸	AG/CT	5 118	6 545	四核苷酸	AAAT/ATTT	341	878
	AT/AT	776			AAAG/CTTT	105	
	AC/GT	625			AAAC/GTTT	48	
	CG/CG	26			AATC/ATTG	39	
三核苷酸	AGG/CCT	802	4 103	五核苷酸	ATCG/ATCG	38	338
	AAG/CTT	761			AATG/ATTC	37	
	AGC/CTG	655			其他	270	
	AAT/ATT	498			AAAAT/ATTTT	86	
	CCG/CGG	422			AAAAG/CTTTT	53	
	ATC/ATG	347			AAAAC/GTTTT	23	
	AAC/GTT	208			AGAGG/CCTCT	19	
	ACT/AGT	67			AAATC/ATTTG	14	
六核苷酸	AACCCT/AGGGTT	31	453		其他	143	
	AAAAAT/ATTTTT	17					
	AGGCGG/CCGCCT	14					
	AAAAAG/CTTTTT	13					
	AAGAGG/CCTCTT	10					
	其他	368					

3.3 SSR 标记的多态性评价与可用性分析

判断 SSR 分子标记可用性的重要依据之一是其多态性的高低。SSR 的长度是影响其多态性高低的重要因素, 当 SSR 长度 ≥ 20 bp 时多态性较高, 12~20 bp 的多态性中等, < 12 bp 的多态性极低。本研究中的多花黄精转录组 SSR 长度 ≥ 12 bp 的总 SSR 位点为 11 084 个, 其中 20 bp 以上的为 3 202 个 (28.9%), 12~20 bp 的为 7 882 个 (71.1%)。这表明多花黄精转录组 SSR 位点理论上具有中等程度的多态性。

为进一步在后续研究中利用多花黄精的 SSR 标记, 对包含了长度 ≥ 12 bp 的 11 084 个 SSR 位点的 EST 序列进行引物设计, 共设计了 EST-SSR 特异引物 8 909 对, 占总 SSR 位点的 73.9%。其中,

SSR 长度 ≥ 20 bp 以上的特异引物 2 138 对, 占多花黄精 SSR 位点总特异引物的 13.1%。随机挑选 50 对 SSR 引物, 以多花黄精 KHPc 的 DNA 为模板进行 SSR-PCR 以验证引物的有效性。结果显示, 50 对 SSR 引物中有 29 对 (表 4) 扩增出了预期大小的 SSR 条带 (图 1), 占 50 对 SSR 引物的 58%。进一步对 29 对引物中的 7 对 (0011643、0096227、0016356、0028164、0028723、0085001、0004036) 进行 5'端引物荧光染料 FAM 修饰, 对多花黄精 KHPc 进行 PCR 扩增, 在 7 个 SSR 位点共鉴定出 9 种基因型, 分别是纯合 259/259、纯合 217/217、纯合 256/256、纯合 227/227、杂合 259/272、纯合 154/154 和杂合 175/187 (图 2), 进一步验证了 SSR 引物的有效性。

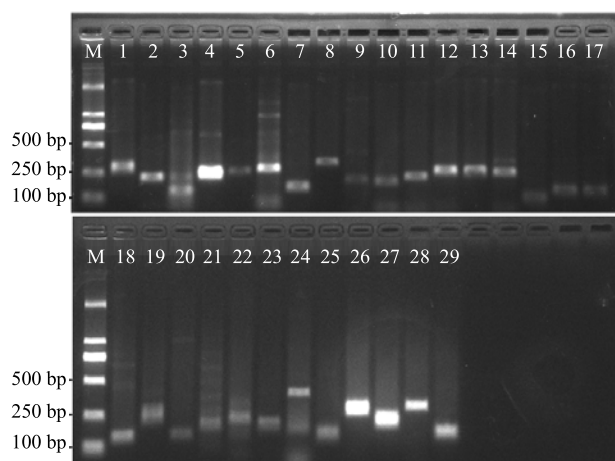
表 4 SSR 引物筛选

Table 4 Screening of SSR primers by PCR

Unigene 编号	SSR 基序	SSR 引物序列 (5'-3')	最适退火温度/℃	片段大小/bp
0011643	(AT) ₁₆	F: CCATGTATGGCCATCCTCTA R: GCAAGATGAATGAAATCG	52.0	262
0096227	(TG) ₁₀ (AG) ₆	F: GTCCGAGTTCTTTGACGAGC R: AAAACCATCTCCATCCTCCC	56.0	228
0123080	(GA) ₆ AC (AG) ₉	F: ATGGAAGGGAGAGAGGGAGA R: CCTTCCATCTACTGGAAACCC	57.5	122
0098494	(CCTCTC) ₄ (CT) ₆	F: CTGCTCTCTCACCAAACCT R: TAGAATCCTGGACCTCGTCG	57.0	176
0016356	(TACTGC) ₅	F: GCTACATAAAGAGCCTGCGG R: CATGGAGCACTCTAGACTCAAAG	56.0	270
0073389	(TAACCC) ₄	F: CGAAGAAGTCTCGATCCACC R: TCGAGGAGTGCTTGATGATG	56.0	255
0085001	(TCT) ₅ (TGC) ₅	F: ACCTCGAAAGGGTTGTCCTT R: CGAAGACGAAGACCGAGTTC	56.0	154
0016720	(GA) ₇ GGT (GA) ₆	F: GACCAAAAAGCTCCCCCTTC R: TTAACGCCTAACCCCACTG	55.0	243
0003599	(CT) ₁₂	F: TCTGTAAATCAGGAGGAGCGA R: AATCGATGAGATCGACCTGG	54.0	141
0092927	(ACC) ₉	F: CGAAACCCTCCTCAATCTCA R: GCGACAAGTGTGAAGGGTT	54.5	193
0028164	(AT) ₆	F: TCTTTGGTCCCACATCAACA R: GTGTCTGTCTCACTGCGTC	54.0	222
0028723	(AGAA) ₆	F: CCAACAAGGGAAAAGCAAG R: AATATGGGGGTGACTCCGTT	54.0	277
0061334	(AAG) ₈	F: CCGCTCTCTTCCCTCTCTT R: TCGTCGGAGCTAGTGAATCC	57.0	279
0029910	(AT) ₉ (AG) ₁₀	F: TGGGAAAAAGCGAAATGAAC R: GCGTGGGTTGTAATTGCTTC	52.0	275
0053597	(CCGTAC) ₄	F: ACCTAAAAGCCTCCAGCGAT R: AGGAGGAGGAGGATAGGGGT	55.0	118
0101510	(GCT) ₈	F: GTTGCCAGAGATCGAAAAGC R: TGCAATATCCATTACCTCGGA	53.0	210
0101643	(CTG) ₈	F: ACCCTCTCAATCGTCACCTG R: TCAATCAATTCCCCTTCAGC	53.0	178
0109275	(GC) ₆ (AC) ₆	F: TGCATGCTCAAAGTCACCTC R: CATTGCTTCAAGTTGTGTTGTT	52.5	113
0109549	(CCTCTG) ₄	F: GAGACGAAGAGCTGGGATTG R: GTGTGGGTAATGGGTATGGC	57.0	143
0088740	(CGGTGG) ₄	F: ACGGTGTAGATTGGGTCCAG R: TCTCCAATCCCCCTCTCTTT	55.0	149

续表 4

Unigene 编号	SSR 基序	SSR 引物序列 (5'-3')	最适退火温度/℃	片段大小/bp
0095066	(TG) ₈	F: GTATCCAACGGTCCAACCAC R: GCAGCAATAGGAATTTGACACC	55.0	240
0005439	(AAT) ₁₄	F: TGGAGAGATTTGGTTACGGTC R: GCATCCTAGTCTTCCGCTTG	53.5	246
0006074	(GGTGCT) ₅	F: GCAATACTTGGGCTGGGTAA R: GTGAGACACCCAACCTCGAT	56.0	265
0096643	(GAAGCA) ₄	F: CCCATTTCTCTTCTCCCCTC R: GGGAAGTGAGCGTTGGATTA	56.0	188
0082043	(TTAA) ₆	F: GCTCGCAACAACAAACAAAA R: GGGCTGAGAATTGAGAACCA	51.0	126
0026671	(TTA) ₈	F: ATGATATGCCGTTGGGAAAA R: GCTACCCTCGAACCTCTCCT	50.5	279
0004036	(AGGTGA) ₅	F: AGCAAGAAGGAGAGCGTGAG R: TTTACACAAAAGCCCATCCC	52.5	185
0070231	(ACCG) ₆	F: TACTTTCTCCCCGTTTCCCT R: GCTCCCCATCTCCAGAAATA	53.5	206
0081828	(CGG) ₈	F: TGACCCTCCACTTCATCTCC R: GACTCCTTCGAGTGGTACGC	57.0	271



M-Marker 1~29 分别代表表 4 所列 Unigene 0011643、0096227、0123080、0098494、0016356、0073389、0085001、0016720、0003599、0092927、0028164、0028723、0061334、0029910、0053597、0101510、0101643、0082043、0026671、0109275、0004036、0005439、0070231、0095066、0088740、0006074、0096643、0081828 和 0109549 的 SSR 引物

M-Marker Lanes 1—29 correspond to the SSR primers of Unigene 0011643, 0096227, 0123080, 0098494, 0016356, 0073389, 0085001, 0016720, 0003599, 0092927, 0028164, 0028723, 0061334, 0029910, 0053597, 0101510, 0101643, 0082043, 0026671, 0109275, 0004036, 0005439, 0070231, 0095066, 0088740, 0006074, 0096643, 0081828, 0109549 listed in table 4

图 1 多花黄精 KHPc 的 SSR-PCR 扩增图谱

Fig. 1 Electrophoretic profile of *P. cyrtoneura* KHPc amplified with SSR primers

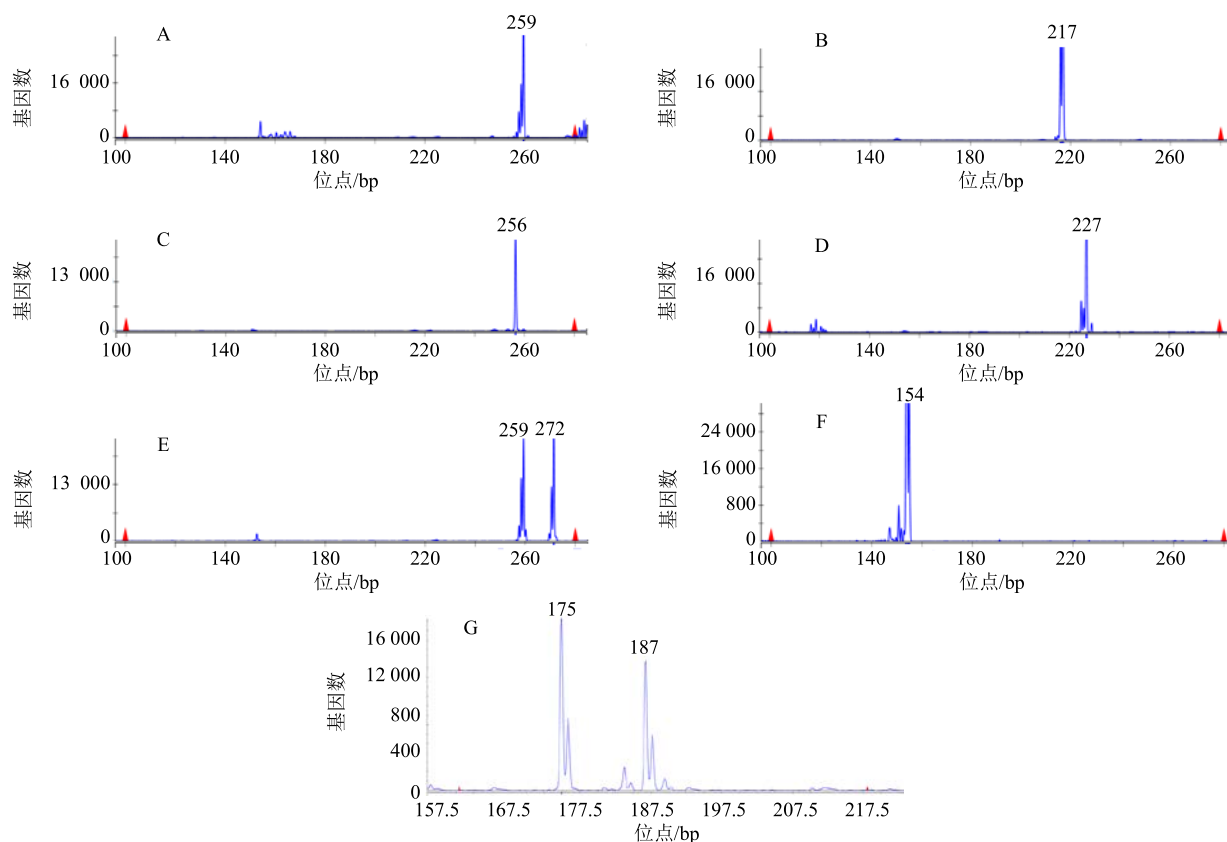
4 讨论

在本研究设定的 MISA 筛选条件下, 共从多花黄精转录组 126 544 条 Unigenes 中鉴定出 12 317 个含 2~6 个核苷酸重复类型的 SSR 位点, 分布频

率为 9.73%, 平均出现频率为 1/5.91 kb。与其他药用植物相比, 分布频率高于人参 (7.3%)^[10], 低于甘草 (60.10%)^[12] 和 黄秦艽 (30.73%)^[13]; 平均出现频率高于裂叶牵牛 (1/7.37 kb)^[9] 和 南方红豆杉 (1/18.01 kb)^[16], 低于党参 (1/4.52 kb)^[11]、厚朴 (1/3.43 kb)^[14]、冬凌草 (1/3.5 kb)^[17] 和 杜仲 (1/1.75 kb)^[18]。这些物种间 SSR 位点数据上的差异与物种的特异性以及 MISA 软件检索设置的 SSR 标准有很大关系。

从目前的报道来看, 大多数植物的 SSR 位点主要以二、三核苷酸重复类型为主, 但优势的重复基序存在差别。多花黄精的 SSR 以二核苷酸重复类型最多, 其次是三核苷酸。二核苷酸重复基序以 AG/CT 为主, 三核苷酸重复基序以 AGG/CCT 为主, 与挪威云杉^[19]、南方红豆杉^[16]、白姜^[20]、铁皮石斛^[21]、金钗石斛^[22] 等植物相同。

为确保 SSR 标记的应用价值, 对来自转录组数据的 EST-SSR 标记进行可用性验证非常关键。基于 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳和荧光标记毛细管电泳, 在随机对 50 对 SSR 引物的可用性验证中, 42% 未能扩增出预期的 SSR 条带。这可能是由于某些 EST 序列的错误组装, 也可能在对 SSR 位点扩增的 DNA 序列中包含内含子, 会出现跨越内含子的无效扩增。此外, DNA 序列中也会存在没有表达的基因序列, 在这些 SSR 位点也会导致无效扩增, 或者在同源性很高的非 SSR 位点处扩增^[23]。



A~G 分别代表 Unigene 0011643、0096227、0016356、0028164、0028723、0085001 和 0004036 的 SSR 引物
A—G correspond to the SSR primers of Unigene 0011643, 0096227, 0016356, 0028164, 0028723, 0085001 and 0004036

图 2 多花黄精 KHPc 在 7 个 SSR 位点的基因型
Fig. 2 Genotypes of *P. cyrtoneura* KHPc at seven SSR loci

SSR 引物的多态性反映微卫星座位上的遗传变异程度。从 SSR 的长度来看, 多花黄精 EST-SSR 位点理论上具有中等程度的多态性。同时, 二、三核苷酸重复类型出现的重复次数跨度很大, 二核苷酸重复 6~15 次以上, 三核苷酸重复 5~15 次以上, 理论上多态性更高。但其实际可用性尚需通过收集更多的多花黄精材料来进一步验证。此外, 本研究开发出的多花黄精 EST-SSR 标记是否在黄精属内, 包括长梗黄精、滇黄精等种间具有通用性(可转移性)也有待进一步研究。

综上所述, 本研究印证了利用多花黄精转录组数据开发 SSR 标记的可行性, 这些 SSR 标记不仅为多花黄精遗传多样性分析和遗传图谱构建提供了有价值的候选标记, 也为黄精属内种间物种的分子鉴别、优良品种的分子辅助育种提供分子技术手段。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 15 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.

[2] 张洁, 马百平, 杨云, 等. 黄精属植物甾体皂苷类成分及药理活性研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(5): 330-332.

[3] 陈晔, 孙晓生. 黄精的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(3): 328-330.

[4] 徐惠龙, 汪英俊, 陈鸣, 等. 基于 ISSR 标记的福建省多花黄精与长梗黄精种质鉴别及遗传多样性分析 [J]. 福建农业学报, 2017, 32(6): 619-624.

[5] Monika S, Jakub S, Kornelia P, et al. Comparison of three *Polygonatum* species from Poland based on DNA markers [J]. *Ann Bot Fenn*, 2006, 43(5): 379-388.

[6] 周晔, 唐铖, 张攻, 等. 随机扩增多态性 DNA 技术与简单序列重复标记法探讨部分黄精属药用植物亲缘关系的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1646-1647.

[7] 张红梅. 安徽省黄精种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.

[8] 杨培, 周红, 辛天怡, 等. 黄精属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 世界中医药, 2015, 10(8): 1173-1176.

- [9] 刘 越, 范增华, 孙洪波, 等. 裂叶牵牛获得表达序列标签资源的简单序列重复信息分析 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(23): 1790-1794.
- [10] Li C, Zhu Y, Xu G, *et al.* Transcriptome analysis reveals ginsenosides biosynthetic genes, microRNAs and simple sequence repeats in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *BMC Genom*, 2013, 14(1): 204-205.
- [11] 王 东, 曹玲亚, 高建平. 党参转录组中 SSR 位点信息分析 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2390-2394.
- [12] Liu Y, Zhang P, Song M, *et al.* Transcriptome analysis and development of SSR molecular markers in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143017.
- [13] Wang L, Wang Z, Chen J, *et al.* *De novo* transcriptome assembly and development of novel microsatellite markers for the traditional Chinese medicinal herb, *Veratrum baillonii* Franch (Gentianaceae) [J]. *Evol Bioinform Onl*, 2015, 11(S1): 39-45.
- [14] 代 娇, 时小东, 顾雨熹, 等. 厚朴转录组 SSR 标记的开发及功能分析 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 2726-2732.
- [15] 朱 巧, 邓 欣, 张树冰, 等. 黄精属 6 种植物的 SSR 遗传差异分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2935-2943.
- [16] 李炎林, 杨星星, 张家银, 等. 南方红豆杉转录组 SSR 挖掘及分子标记的研究 [J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 735-745.
- [17] 苏秀红, 李庆磊, 陈随清, 等. 冬凌草转录组 SSR 位点分析及多态性初步评价 [J]. 北方园艺, 2016(4): 93-96.
- [18] 吴 敏, 杜红岩, 乌云塔娜, 等. 杜仲基因组微卫星特征及 SSR 标记开发 [J]. 林业科学研究, 2015, 28(3): 387-393.
- [19] 程小毛, 宗媛媛, 黄晓霞. 挪威云杉 EST 资源的 SSR 信息分析 [J]. 现代农业科技, 2011(8): 185-186.
- [20] 邹 勇, 黄 科, 姜玉松, 等. 白姜转录组中的 SSR 位点信息分析 [J]. 作物杂志, 2016(3): 171-174.
- [21] 吴 超, 彭 娟, 向 林, 等. 基于高通量测序的铁皮石斛叶片转录组分析 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(12): 3334-3346.
- [22] 牛俊奇, 苏建睦, 王小敏, 等. 基于高通量测序的金钗石斛叶转录组数据分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(3): 745-746.
- [23] 李海波, 王 珊, 丁红梅, 等. 普通油茶转录组 EST-SSR 分子标记开发 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(7): 1267-1278.