

粗叶榕转录组 SSR 位点分析及分子标记开发

燕 青¹, 秦雅楠^{1,3}, 张华林¹, 李文秀¹, 叶亚娜¹, 黄安瀛², 罗 萍^{1*}

1. 中国热带农业科学院湛江实验站/湛江市橡胶林下经济工程技术研究中心, 广东湛江 524013; 2. 中国林业科学研究院速生树木研究所, 广东湛江 524300; 3. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 650201

摘 要: 五指毛桃 (*Fici Hirtae Radix*) 是一种中药材, 其来源于粗叶榕 (*Ficus hirta* Vahl.) 的干燥根部。开发利用药用植物粗叶榕 SSR 分子标记, 为其种质遗传多样性分析、遗传图谱构建、辅助育种等提供理论依据及数据支撑。以粗叶榕全缘、三裂、五裂、七裂 4 种典型叶片为试材, 经转录组测序后进行位点特征分析及分子标记开发。结果表明: 基于 34 375 条转录组 unigene 序列, 筛选到 16 851 个 SSR 位点, 分布于 12 094 条 unigene, 分布频率为 35.18%, 平均每 2638 bp 有 1 个 SSR 位点, 分布密度为 3.68 kb。共观察到 5 种不同核苷酸基序类型, 其中最常见的是重复 6 次的基序, 占 SSR 总数的 20.92%, 且长度基本小于 29 bp。双碱基重复序列占主导地位, 其次是三碱基和四碱基重复类型。其中, (AG/CT)*n* 是最常见的基元, 占有所有 SSR 的 26.05%; 其次是(AT/AT)*n* 基元, 占 18.69%。随机选取 100 条 EST-SSR 引物, 以粗叶榕 4 种不同叶型的基因组 DNA 扩增目标产物, 其中 89 条引物在粗叶榕 4 个种质间表现出多态性。选取 9 对条带清晰的引物, 对不同地区的 31 个粗叶榕种质进行 DNA 扩增和指纹图谱构建, 这些引物组合多态性条带比例均值达 72.04%, 并对 31 个种质进行了有效鉴别, 成功建立了 DNA 指纹图谱。研究结果证明粗叶榕转录组 SSR 位点信息丰富, 利用性高, 可为后续研究提供数据支撑。

关键词: 粗叶榕; 五指毛桃; 转录组; EST-SSR; DNA 指纹图谱

中图分类号: S567.19 文献标志码: A

Comprehensive Analysis of SSR Loci Within the *Ficus hirta* Vahl. Transcriptome and the Developmental Application of Molecular Markers

YAN Qing¹, QIN Yanan^{1,3}, ZHANG Hualin¹, LI Wenxiu¹, YE Yana¹, HUANG Anying², LUO Ping^{1*}

1. Zhanjiang Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Zhanjiang Rubber Understory Economic Engineering Technology Research Center, Zhanjiang, Guangdong 524013, China; 2. Research Institute of Fast-growing Trees, Chinese Academy of Forestry, Zhanjiang, Guangdong 524300, China; 3. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 650201, China

Abstract: *Fici Hirtae Radix*, a Chinese herbal medicine, is prepared from the dry roots of *Ficus hirta* Vahl. This study aimed to provide theoretical and empirical support for the genetic diversity analysis, genetic map construction, and assisted breeding of *F. hirta* Vahl. by developing SSR molecular markers. Four typical leaves of *F. hirta* Vahl. were selected as the samples, and site feature analysis and molecular marker development were performed after transcriptome sequencing. A total of 16 851 SSR loci were identified from 34 375 transcriptome unigene sequences, distributed across 12 094 unigene sequences, resulting in a distribution frequency of 35.18%. The average frequency was one SSR locus every 2638 bp, with a density of 3.68 kb. Five distinct nucleotide motifs were observed, with the motif repeating six times being the most prevalent, constituting 20.92% of all SSRs, and typically less than 29 bp in length. Di-nucleotide repeats were predominant, followed by tri- and tetra-nucleotide repeats. (AG/CT)*n* was the most abundant repeat motif, representing 26.05% of all SSRs, while (AT/AT)*n* was the second most common, accounting for 18.69%. 100 EST-SSR

收稿日期 2024-12-10; 接受日期 2025-01-22

基金项目 国家天然橡胶产业技术体系湛江综合试验站项目 (No. CARS-33-GD2); 广西自筹经费林业科技项目 (No. 2023GXZ-CLK13)。

作者简介 燕 青 (1997—), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 南药种质资源收集、鉴定与创新利用。*通信作者 (Corresponding author): 罗 萍 (LUO Ping), E-mail: luoping428@163.com。

primers were randomly selected to amplify target product using genomic DNA from four different leaf types of *F. hirta* Vahl. 89 primers exhibited polymorphism across the germplasms. Nine primer pairs, distinguished by the high definition and clarity, were selected to perform DNA amplification and construct DNA fingerprints for 31 specimens sourced from different regions. The average percentage of polymorphic bands observed across these primers was 72.04%. The substantial degree of polymorphism facilitated the unambiguous identification of each of the 31 germplasm samples, and robust DNA fingerprint profiles were successfully established for each specimen. This study demonstrated that SSR loci within the transcriptome of *F. hirta* Vahl. were rich in information and highly utilizable, offering valuable data support for future research endeavors.

Keywords: *Ficus hirta* Vahl.; *Fici Hirtae Radix*; transcriptome; EST-SSR; DNA fingerprinting

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.05.007

微卫星标记，又称简单重复序列（simple sequence repeat, SSR），是一种在植物遗传多样性研究、基因定位、目标性状定位以及标记辅助选择育种中被广泛使用的标记系统。它具有突变率高、分布广、密度大的优点，已经广泛应用于种质资源鉴别、遗传多样性分析以及指纹图谱的构建等领域^[1]。SSR 主要是由串联重复单元构成，其核心单位含 1~6 个核苷酸，因重复次数和程度的差异，呈现出高度的多态性。SSR 标记具有共显性特征，稳定性强且等位基因多样性丰富，根据序列获得方式不同，可分为基因组 SSR（genomic SSR, g-SSR）和转录组 SSR（expressed sequence tags SSR, EST-SSR）^[2]。与 g-SSR 相比，EST-SSR 并不需要对整个基因组进行测序，而是位于基因编码区内，具有方便快捷、效率高、成本低廉及与表型性状相关性好等优点。传统的 SSR 开发方法难度大、成本高、劳动密集，高通量测序技术的进步和测序成本的降低减少了转录组测序的成本，推动了通过转录组测序开发 SSR 标记的快速发展与广泛应用。转录组测序后生成的序列数据中包含大量的有效基因，为评估物种多样性提供了新方法。目前，通过转录组数据开发 EST-SSR 标记已在黄连、冬虫夏草、白木香、川贝母、穿心莲等诸多植物中得到广泛应用^[3]，极大促进了植物的育种进程。

粗叶榕（*Ficus hirta* Vahl.），属于桑科榕属的无花果亚属，是一种木本植物，主要分布于亚洲的亚热带地区，中国的热带及亚热带地区均有分布^[4]。中药材五指毛桃（*Fici Hirtae Radix*）药食同源，来源于粗叶榕的干燥根，又称五指牛奶、南芪、土北芪、五爪龙等，具有益气、健脾、润肺、祛风湿等功效，在海南、广东等地被广泛应用，药用和食用价值较高^[5]。粗叶榕的高遗传多样性与低群体分化决定了其更高的适应性与进化潜力^[6]，在长期适应不同生境及遗传漂移的过程

中形成了复杂的变型。从已收集的种质资源来看，粗叶榕不同种质间表型差异大，仅通过表型鉴定无法准确及时对其进行区分，同时不同种质间遗传背景不清晰，遗传距离不明了，极大限制了植物新品种选育，影响其育种进程。因此，表型评价结合分子标记技术无疑是一个极佳的解决手段，通过转录组测序开发粗叶榕 SSR 标记，对不同种质资源进行精准鉴定，对后续粗叶榕资源评价及基因组选择育种具有重要意义。

当前对粗叶榕的报道多集中于传统分类学^[7]、化学成分^[8-9]、繁育^[10]与药理作用^[11]等方面，少有品种选育与精准鉴别方面的研究，缺少丰富的分子标记资源和准确的 DNA 指纹图谱信息。国内外对大豆^[12]、玉米^[13]、水稻^[14]等作物的研究表明，SSR 标记可有效检测位点多态性，对育种工作具有较好的推动作用。而关于粗叶榕转录组 SSR 分子标记开发利用方面的研究报道较少，仅有 LU 等^[6]基于同属植物无花果（*Ficus carica* Linn.）的 9 对 SSR 引物对 18 个粗叶榕居群开展的遗传多样性分析。截至目前，已有学者开展了全缘、三裂、五裂、七裂 4 种叶型五指毛桃果实的氨基酸组成比较及营养价值评价^[15]，尚无通过不同叶裂类型粗叶榕转录组测序开发 SSR 标记的研究。本研究以不同叶裂粗叶榕叶片转录组测序为基础，利用生物信息学方法分析其 SSR 位点序列分布特征、碱基重复类型等，开发了 4 种典型叶型粗叶榕中均具有的多态性的叶片 SSR 标记，并在 31 种不同来源种质中进行验证。为粗叶榕种质遗传多样性分析、遗传图谱构建、辅助育种等提供理论及数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为河源全缘、河源三裂、河源五裂、

河源七裂 4 个粗叶榕典型种质（图 1）及 31 份不同来源粗叶榕种质（表 1），经中国热带农业科学院湛江实验站罗萍研究员鉴定为粗叶榕。样品来自中国热带农业科学院湛江实验站粗叶榕种质圃，该

种质圃位于广东省东南部，年均气温为 23.8℃，年均降水量为 1396.3~1759.4 mm。选取生长良好，已分化且分化明显的不同种质新鲜叶片各 3 片，液氮快速冷冻后置于-80℃冰箱保存，备用。

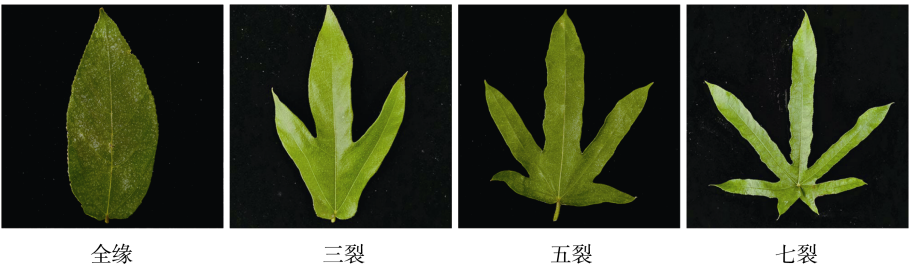


图 1 典型粗叶榕叶片形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of canonical leaf blade in *F. hirta* Vahl.

表 1 种质资源样品信息

Tab. 1 Information of germplasm resource samples

编号 No.	来源 Source	种质名称 Germplasm name
1	广东	翠洋楼 1-5 (CYL1)
2	广东	翠洋楼 3-3 (CYL3)
3	广东	翠洋楼 5-3 (CYL5)
4	广东	牛栏坡 1-1 (NLP1)
5	广东	牛栏坡 3-6 (NLP3)
6	广东	红旗 1-1 (HQ1)
7	广东	红旗 3-1 (HQ3)
8	广东	红旗 5-4 (HQ5)
9	广东	金埗 1-3 (JY1)
10	广东	金埗 3-1 (JY3)
11	广东	金埗 5-1 (JY5)
12	广东	团结 1-1 (TJ1)
13	广东	团结 3-1 (TJ3)
14	广东	团结 5-4 (TJ5)
15	广西	宁潭 1-3 (NT1)
16	广西	宁潭 3-2 (NT3)
17	广西	宁潭 5-3 (NT5)
18	广西	山埗 1-4 (SY1)
19	广西	山埗 3-8 (SY3)
20	广西	山埗 5-10 (SY5)
21	福建	分路亭 1 号 (FLT1)
22	福建	分路亭 5-2 (FLT5)
23	福建	分路亭 7-1 (FLT7)
24	云南	景洪 1 号 (JH3)
25	云南	景洪 4 号 (JH1)
26	云南	沧源 1 号 (CY1)
27	云南	补蚌村 1 号 (BB1)
28	云南	曼丹村 1 号 (MD1)
29	云南	清凉 2 号 (QL2)
30	云南	曼烟 1 号 (MY1)
31	云南	曼乃 1 号 (MN1)

1.2 方法

1.2.1 转录组测序及组装 采集典型种质河源全缘、河源三裂、河源五裂、河源七裂 4 个种质各 3 份叶片，提取 RNA 后分别反转录构建 cDNA 文库，然后利用 Illumina HiSeq TM 2000 平台测序。使用 Trinity 软件对原始数据进行过滤、重组、去除冗余和同源转录本聚类，从而得到 unigene 序列。

1.2.2 DNA 提取 取不同叶型及不同来源的 12 个粗叶榕种质叶片分别研磨，采用改进的 CTAB 方法提取 DNA，并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检查其完整性。使用时检测浓度与纯度，最后将其稀释到一致的浓度后再使用。

1.2.3 转录组 SSR 位点鉴别及 EST-SSR 引物设计 利用 MISA 1.0 软件对粗叶榕的转录组数据查找 SSR 位点时，重复序列的要求为：二核苷酸≥6；三核苷酸≥5；四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸均≥4。此外，如果 2 个 SSR 之间的距离小于 100 bp，则认为是 1 个 SSR。使用 Primer 3.0 软件设计引物，设计预测产物长度为 100~280 bp，序列长度为 8~25 bp，GC 含量为 40%~60%，退火温度为 (60±5)℃，上下游引物的退火温度之间的差异不超过 5℃。

1.2.4 EST-SSR 引物筛选及遗传多样性分析 (1) EST-SSR 引物筛选。从引物组中随机选取 100 对长度超过 20 bp 的 SSR 序列，以全缘、三裂、五裂、七裂 4 种不同种质粗叶榕叶片 DNA 为模板进行扩增。PCR 扩增体系为 10 μL：上下游引物各 0.4 μL，1 μL DNA，5 μL Mix，3.2 μL ddH₂O。PCR 扩增程序为：98℃预变形 5 min，98℃变性 10 s，60℃退火 15 s，72℃延伸 45 s，

35 个循环, 72 ℃ 延伸 2 min。使用 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测, 设定电压为 200 V, 电流为 120 A, 电泳 2 h。电泳结束后, 进行银染洗脱, 记录结果。

(2) EST-SSR 引物多态性分析。选取来自广东、广西、福建和云南 4 个省(区)的 31 份粗叶榕种质资源(表 1)进行 EST-SSR 引物验证。以上述种质 DNA 为模板, 对 1.2.4-(1) 筛选得到的 9 对引物进行 PCR 扩增, 电泳后读带。将读带结果进行统计, 采用 Popgen 32 软件分析不同引物条带数量、观测等位基因数(observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数(effective number of alleles, N_e)、香农指数(Shannon's information index, I)、Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity index, H)及不同种质间的遗传距离; 采用 Genalex 软件分析期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)与无偏期望杂合度(unbiased expected heterozygosity, uH_e)。将数据输入到 NTSYS 软件中, 利用非加权组平均法在 NTSYS 软件的相似性模块中建立聚类树, 具体方法: 从 NTSYS 软件的相似性模块中获取相似性矩阵或距离矩阵, 在 Clustering 模块中得到聚类树, 然后将种质相关资料输入二维码制作工具, 从而为各粗叶榕资源创建二维码形式的 DNA 分子身份标识^[16-17]。

2 结果与分析

2.1 转录组的组装

通过对河源全缘、河源三裂、河源五裂、河源七裂 4 种典型种质进行转录组测序, 共得到 12 组序列。对转录组组装质量统计分析, 共得到 34 375 条 unigene, 其总长度为 44 450 502 bp, 平均长度为 1 293 bp; 最长的 unigene 长度为

14 243 bp, 最短的 unigene 长度为 201 bp; GC 含量为 41.50%; N50 长度为 2 186 bp, 是平均长度的 1.69 倍; N50 数量为 6 808 条, 是总组装数量的 19.81%, 说明粗叶榕转录组的组装质量好。

2.2 粗叶榕叶片转录组中 SSR 位点分析

利用 MISA 软件进行分析, 在粗叶榕的 34 375 条转录组 unigene 序列数据中, 12 094 条 unigene 上含有 16 851 个 SSR 位点, 含 SSR 位点的 unigene 数占 unigene 总数的 35.18%, 而 SSR 位点的数量则占 unigene 总数的 49.02%, 平均每 2 638 bp 有 1 个 SSR 位点。此外, 还发现有 4 756 个 unigene 包含至少 1 个以上的 SSR 位点。

2.3 粗叶榕叶片转录组 SSR 重复类型分析

从表 2 可以看出, 在粗叶榕的转录组 SSR 位点中, 双碱基和三碱基重复类型的频率较高, 分别占 24.83%和 10.71%。四碱基、五碱基和六碱基重复类型的频率相对较低, 分别仅占 3.14%、1.48%和 1.63%。平均每 19.88 bp 碱基长度出现 1 个双碱基重复序列, 平均每 19.56 bp 碱基长度出现 1 个双碱基至四碱基, 而每 24.16 bp 碱基长度时才可能会出现五、六碱基, 可见双碱基、六碱基与其他类型碱基间的平均分布长度差异较大, 特别是双碱基在长度分布上占有很高的优势地位。双碱基和三碱基的总长度达到了 20 多万的数量级, 剩余类型碱基长度总和也有 236.48 kb, 但四碱基、五碱基、六碱基类型总长度只有 45.38 kb 左右。在总的 unigene 序列上平均每 2.64 kb 出现 1 个重复基序, 各种类型的基序出现距离由双碱基、三碱基、四碱基、五碱基到六碱基依次增加。

2.4 粗叶榕叶片转录组中 SSR 位点类型

在粗叶榕转录组中, 单一出现频率高于 2%的主要有 7 种重复单元, 其中包含双碱基重复 3 种, 即 AC/GT 重复、AG/CT 重复、AT/AT 重复, 尤

表 2 粗叶榕 SSR 位点重复类型信息
Tab. 2 Repeat type information of SSR loci of *F. hirta* Vahl.

重复类型 Repeat type	数量 Quantity	比例 Scale/%	频率 Frequency/%	总长度 Overall length/bp	平均长度 Average length/bp	平均分布距离 Mean distribution distance/kb
双碱基	8535	50.65	24.83	169 644	19.88	5.21
三个碱基	3680	21.84	10.71	70 851	19.25	12.08
四个碱基	1081	6.42	3.14	19 532	18.07	41.12
五个碱基	510	3.03	1.48	11 020	21.61	87.16
六个碱基	560	3.32	1.63	14 832	26.49	79.38
其他	2485	14.75	7.23	191 093	76.90	17.89
总计	16 851	100.00	49.02	476 936	28.30	2.64

以 AG 重复数量最多, 为 4389 个, 比例达 26.05%。三碱基重复基元重复次数较多的共 8 种, AAG/CTT 重复最多, 出现频率为 7.62%, ATC/ATG 重复较少, 频率为 1.41%; 四碱基重复中, 数量最多的是 AAAT/ATTT, 出现频率为 3.41%; 五碱基重复数量最多的为 AAAAT/ATTTT 单元。其他类型出现频率低于 0.90% 的重复单元共占总 SSR 的 21.97% (图 2)。

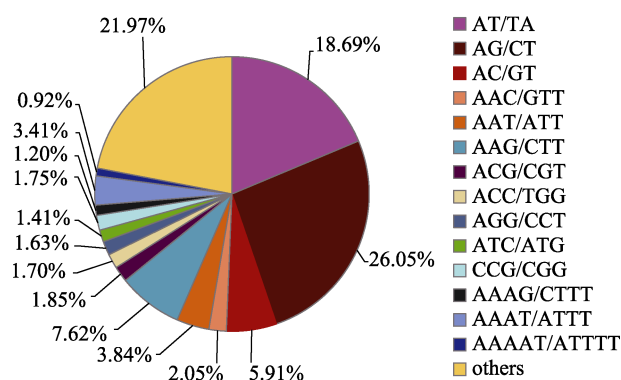


图 2 不同重复单元在总 SSR 中所占比例

Fig. 2 Proportional of different repeat units in the total SSR

2.5 粗叶榕叶片转录组 SSR 重复次数分析

利用 MISA 软件对转录组中的所有 unigene 进行搜索, 并分析 SSR 基元的重复次数。SSR 重复单元的重复次数分布在 4~13 次之间, 其中 4~9 次重复的有 14 235 个, 占 78.46%; 10~13 次重复的 SSR 位点有 3908 个, 占 21.54%。6 次重复基元出现的频率最高, 占总 SSR 位点数的 20.92%; 其次为 5、7 次重复基元出现的频率, 分别占总 SSR 位点数的 14.98%、13.49%。从 SSR 的重复

次数来看, 双碱基主要集中在 6~11 次, 占双碱基分布总数的 86.01%; 三碱基主要集中在 5~7 次, 占三碱基分布总数的 81.30%; 四碱基主要集中在 4~6 次, 占四碱基分布总数的 96.21%; 五碱基主要集中在 4~5 次, 占五碱基分布总数的 95.51%; 六碱基主要集中在 4~5 次, 占六碱基总数的 94.84% (图 3)。

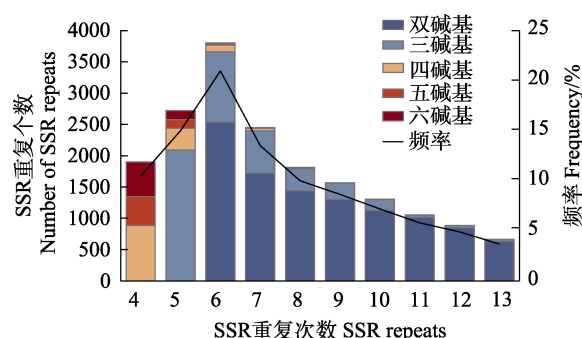


图 3 SSR 位点重复次数分析

Fig. 3 Analysis of SSR repeat frequencies

2.6 粗叶榕叶片转录组 SSR 可用性评价

筛选的 SSR 基序长度分布在 12~407 bp 范围内, 在该范围内, 基序长度为 12~19 bp 的中度多态性位点共有 7631 个, 占比为 45.29%; 基序长度 ≥ 20 bp 的高度多态性位点有 9220 个, 占 54.71% (图 4)。说明可以从该叶片转录组中开发出具有高度多态性的 SSR 引物。

2.7 EST-SSR 引物筛选与遗传多样性分析

2.7.1 EST-SSR 引物筛选 利用 16 851 个 SSR 位点, 最终设计得到 12 336 对 EST-SSR 引物。以全缘、三裂、五裂、七裂 4 种不同叶型粗叶榕 DNA

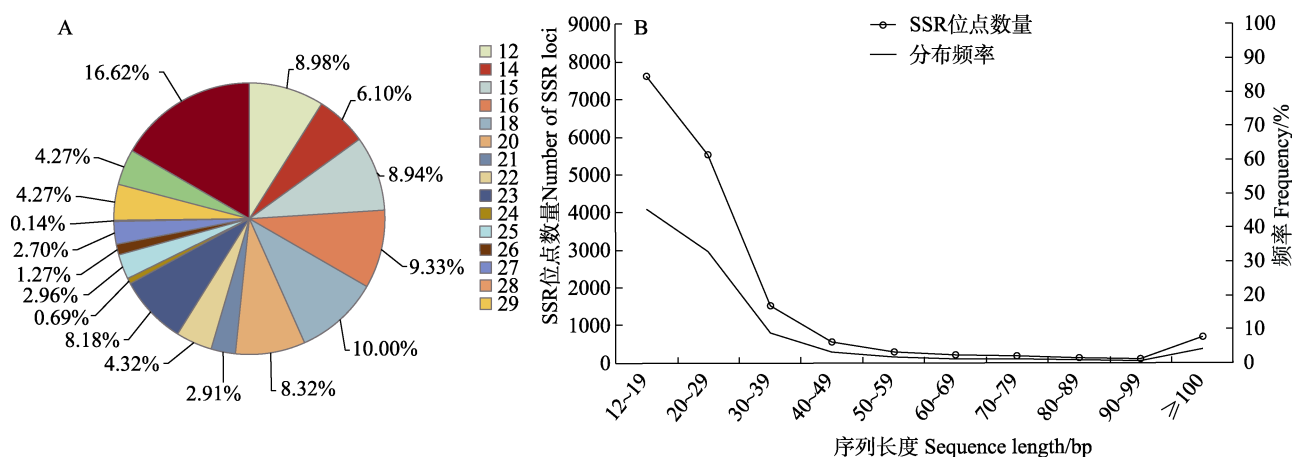


图 4 SSR 位点重复序列长度所占比例 (A) 及分布特征 (B)

Fig. 4 Proportion of repeat sequence length (A) and distribution characteristics (B) of SSR loci

为模板进行验证，随机选择 100 对 EST-SSR 引物进行扩增。结果显示，有 89 对引物可扩增出目标产物，其中 55 对引物在 4 种不同叶型粗叶榕中表现出多态性，筛选出 9 对条带清晰的引物（表 3）。
2.7.2 EST-SSR 引物遗传多样性分析 以 31 份不同粗叶榕种质 DNA 为模板，对筛选出的 9 对 EST-SSR 引物进行扩增及遗传多样性分析，并构建系统进化树及 DNA 分子身份证。利用 9 对 EST-SSR 引物对 31 份不同粗叶榕种质进行扩增，计算获得遗传多样性指标和多态性信息含量（表 4）。9 对引物的观测多态性条带数在 3~5 条之间，

平均多态性条带数量为 4.44 条；观测等位基因数（ N_a ）在 0.903~1.839 之间，平均值为 1.577；有效等位基因数（ N_e ）为 1.273~1.656，平均值为 1.476；香农指数（ I ）介于 0.235~0.543 之间，平均值为 0.405；期望杂合度（ H_e ）介于 0.158~0.372 之间，平均值为 0.274；无偏期望杂合度（ uH_e ）介于 0.181~0.414 之间，平均值为 0.309；Nei's 基因多样性指数（ H ）为 0.158~0.372，平均值为 0.274。多态性条带比例分布范围在 41.94%~90.32%之间，平均值为 72.04%。结果表明，筛选的 9 对引物在 31 份种质中的多态性较高。

表 3 EST-SSR 多态性引物序列
Tab. 3 Polymorphic primer sequences for EST-SSR

引物名称 Primer name	正向引物序列（5'-3'） Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列（5'-3'） Reverse primer sequence (5'-3')
S13	ACCTTTGACCCTTTTGTGGA	CGCCAAATAGGAAAATCAGAA
S22	CCATCGCAAAGTGAATACGA	ATAAAACCCAGCAAAGCAGC
S25	GGAATTGGGATTTGAGGACA	ATAATTCTGCGGGAAAGCAA
S41	AGTTCAAAAGCGTGGAGCAT	GAGCGACCATCCAATCTTGT
S51	TCTTTTTCCTTGGTGGGTTG	AGGGTTCACACAATAACGGC
S57	AACCCTAAACTCGCCGAAAT	CGGTCGGAGAGAGAGAAAGA
S71	GTAAAACTTGTTGCCGCCAT	TACCCAACAACCTCTACGG
S79	AGCAGTGTACCATGAGCTG	GGATTCTTTTGTGTTGGTGCT
S98	TTTCTGTGCAAGGAAATCGG	CAAAGCAAAGTCAGCATCCA

表 4 粗叶榕 9 对引物遗传多样性分析
Tab. 4 Nine primer pairs for genetic diversity analysis in *F. hirta* Vahl.

引物名称 Primer name	条带数 Number of bands	观测等位基 因数 N_a	有效等位基 因数 N_e	香农指数 I	期望杂合度 H_e	无偏期望杂 合度 uH_e	Nei's 基因多样 性指数 H	多态性条带比例 Polymorphic band ratio/%
S13	4	0.903	1.273	0.235	0.158	0.181	0.158	41.94
S22	5	1.806	1.656	0.543	0.372	0.414	0.372	90.32
S25	4	1.484	1.224	0.292	0.172	0.197	0.172	74.19
S41	3	1.484	1.351	0.367	0.234	0.281	0.234	74.19
S51	5	1.774	1.486	0.437	0.289	0.321	0.289	83.87
S57	4	1.581	1.521	0.391	0.275	0.315	0.275	61.29
S71	5	1.839	1.633	0.511	0.353	0.392	0.353	83.87
S79	5	1.645	1.571	0.426	0.302	0.335	0.302	64.52
S98	5	1.677	1.573	0.447	0.310	0.345	0.310	74.19
平均值	4.44	1.577	1.476	0.405	0.274	0.309	0.274	72.04

31 份粗叶榕种质的遗传相似系数在 0.35~0.90 之间，种质间均存在遗传差异。CY1 与 FLT7 的遗传相似系数最小（0.35），遗传差异最大；FLT1 与 FLT5 的遗传相似系数最大（0.90），遗

传差异最小。基于 NTSYS 软件进行聚类分析构建系统进化树（图 5），结果表明，31 个种质被有效区分，且结果稳定可重复，表明基于 EST-SSR 分子标记体系能对粗叶榕种质资源进行遗传多样

性分析,通过聚类分析能有效区分与鉴定不同种质的遗传多样性。同时可构建不同粗叶榕种质指

纹图谱,为粗叶榕资源创建二维码形式的 DNA 分子身份标识(图 5 为部分种质指纹图谱)。

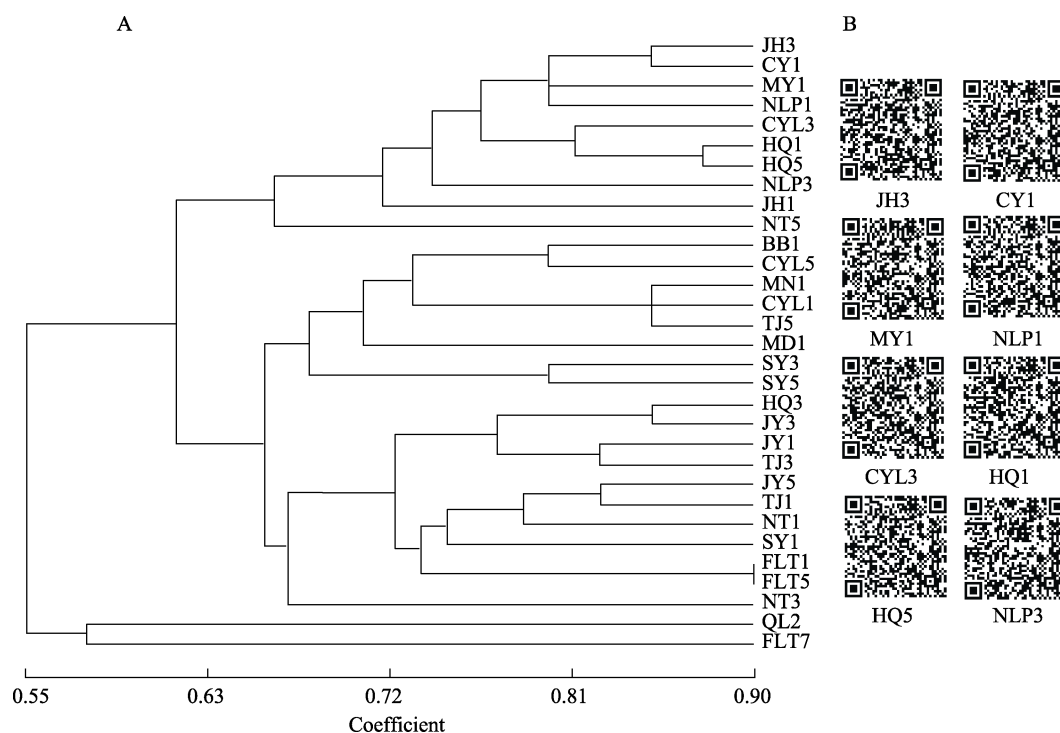


图 5 31 个种质聚类分析 (A) 及部分指纹图谱 (B)

Fig. 5 Cluster analysis (A) and partial genetic fingerprinting (B) of 31 germplasm accessions

3 讨论

本研究对 4 种不同叶型的粗叶榕叶片进行转录组测序,开发了 SSR 分子标记。研究显示,4 种叶型粗叶榕叶片转录组中的 SSR 位点总数为 16 851 个,出现频率为 49.02%,分布于 12 094 条 unigene 上,平均每 2.64 kb 有 1 个 SSR 位点。出现频率高于同桑科植物桑树 (17.09%)^[18],并高于防风 (15.51%)^[19]、白三叶 (13.25%)^[20]、八角 (18.85%)^[21]等药用植物,平均分布距离高于辣椒花 (7.9 kb)^[22]、苦荞 (3.04 kb)^[23]、海带 (7.07 kb)^[24]等植物,低于薏苡 (0.20 kb)、三七 (0.13 kb) 等^[25]。这种差异可能和物种之间 SSR 位点的表达差异有关,也可能是由于物种遗传特性、SSR 搜索标准的差异,数据量的大小以及选择分析软件的不同导致的^[26-29]。总体来看粗叶榕转录组中 SSR 位点的出现频率较高,平均分布距离较短,说明粗叶榕转录组中 SSR 位点的数量较多且种类丰富。

不同物种的 SSR 位点重复基元类型存在差异。主要体现在不同植物 SSR 位点数量、重复类型及占比有所不同。本研究中,粗叶榕转录组中

的 SSR 基元类型丰富多样,包括双碱基到六碱基的重复,其中双碱基和三碱基的重复占据主导地位,这 2 类基元类型构成的 SSR 位点共计 72.49%,而且以双碱基重复位点数量最多,6 次重复基元出现的频率最高。蒋爽等^[30]通过对枇杷转录组 SSR 重复类型进行分析,发现该转录组中的二核苷酸重复数量占总数的 71.1%,以 AT/TA 为主,三核苷酸重复类型占 15.0%,以 AAG/CTT 为主,双碱基和三碱基重复为主要类型,共占总 SSR 位点的 86.1%,这与本研究结果一致。本研究中双碱基重复类型较多,占总 SSR 位点的 50.65%,郭俊等^[31]通过对油梨转录组 SSR 重复类型进行分析,也发现该转录组的重复以二核苷酸和三核苷酸为主,占 SSR 总数的 87.15%。陈友吾等^[32]对多花黄精转录组 SSR 位点分析发现,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,占比达 33.31%,均与本研究结果相似。

评估分子标记的适用性需要考虑其多态性程度,而具有丰富多态性和高潜力的低级 SSR 重复基序是开发这些标记的关键条件^[20,28]。已有研究

表明,当基序长度<12 bp 时,SSR 的多态性较低;而当基序长度 ≥ 12 bp 时,随着基序长度的增加,SSR 的分布频率则降低;基序长度为 12~19 bp 时,SSR 的多态性显著下降;基序长度 ≥ 20 bp 时,多态性较高^[33]。在本研究中,粗叶榕转录组中基序长度超过 20 bp 以上的 SSR 位点有 9220 个,占 SSR 总数的 54.71%,这部分多态性较高的 SSR 具有良好的开发应用价值,大多可作为后续研究的基础。随机选择 100 对引物进行验证,结果显示,89 对引物可扩增出目标产物,有效性达 89%;55 对引物具有多态性,多态性引物比例达 55%,说明该转录组多态性潜能高。55 对多态性引物中挑选 9 对条带清晰的引物进行引物遗传多样性分析,成功将来源不同的 31 个粗叶榕种质进行合理区分并成功构建指纹图谱,且 9 对引物在 31 份种质中多态性条带比例高,均值达 72.04%。

综上所述,本研究对粗叶榕转录组测序后进行位点特征分析及分子标记开发,证实粗叶榕转录组 SSR 位点信息丰富,可利用性高。本研究结果可用于后续种质资源评价及遗传多样性分析等研究,是对现有粗叶榕转录组数据的进一步发掘和利用,所获得的分子标记对丰富榕属植物的分子标记类型及开展特定性状的辅助选择具有重要意义。

参考文献

- [1] 钱润,周骏辉,杨健,黄璐琦,袁媛. 中药材分子标记辅助育种技术研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4812-4818.
QIAN R, ZHOU J H, YANG J, HUANG L Q, YUAN Y. Study progress on molecular marker-assisted breeding of Chinese medicinal materials[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(20): 4812-4818. (in Chinese)
- [2] 王娟娟,赵明,韩雨威,吴蒙蒙,刘瑞振,沈超,祁哲晨. 微卫星 DNA 标记开发技术进展及其在经济植物研究中的应用[J]. 生命科学研究, 2016, 20(3): 260-266.
WANG J J, ZHAO M, HAN Y W, WU M M, LIU R Z, SHEN C, QI Z C. Advances in development of microsatellite DNA markers and their applications in economic plant research[J]. Life Science Research, 2016, 20(3): 260-266. (in Chinese)
- [3] 崔亚杰,史荷凤,聂广楼,廖海迪,李学刚,庞蕾. 黄连转录组 SSR 位点信息分析及分子标记开发[J]. 中草药, 2024, 55(19): 6713-6720.
CUI Y J, SHI H F, NIE G L, LIAO H D, LI X G, PANG L. Site information analysis and molecular marker based development of SSR in *Coptis chinensis* transcriptome[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(19): 6713-6720. (in Chinese)
- [4] 陆婧. 中国榕属绵毛榕组粗叶榕复合群的系统分类学研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2015.
LU J. Phylogeny and taxonomy of the 'hairy-fig' complex of *Ficus* sect. *Eriosycea* (Moraceae) in China[D]. Shanghai: East China Normal University, 2015. (in Chinese)
- [5] 马雅静,刘焕,史晶晶,尚明英,李耀利,刘广学,徐凤,蔡少青. 五指毛桃的质量标准研究[J]. 中草药, 2017, 48(4): 782-791.
MA Y J, LIU H, SHI J J, SHANG M Y, LI Y L, LIU G X, XU F, CAI S Q. Study on quality standard of *Ficus hirta* Radix[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(4): 782-791. (in Chinese)
- [6] LU Y, CHEN J L, CHEN B, LIU Q Q, ZHANG H L, YANG L Y, CHAO Z, TIAN E W. High genetic diversity and low population differentiation of a medical plant *Ficus hirta* Vahl., uncovered by microsatellite loci: implications for conservation and breeding[J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 334.
- [7] 杨丽薇,杜丽敏,林旭俊,李善志,李晓斌. 粗叶榕种质资源调查与收集浅析[J]. 热带林业, 2021, 49(4): 54-56.
YANG L W, DU L M, LIN X J, LI S Z, LI X B. Investigation and collection of *Ficus hirta* Vahl. resources[J]. Tropical Forestry, 2021, 49(4): 54-56. (in Chinese)
- [8] 杜丽敏,林旭俊,杨丽薇,黄国宁,李晓斌,郭霞. 不同表型粗叶榕根部营养成分特征分析[J]. 分子植物育种, 2024, 22(18): 6138-6145.
DU L M, LIN X J, YANG L W, HUANG G N, LI X B, GUO X. Analysis of nutrient components in roots of different phenotypes of *Ficus hirta* Vahl.[J]. Molecular Plant Breeding, 2024, 22(18): 6138-6145. (in Chinese)
- [9] 郑蓉蓉,轧霁,王文婧,杨寒冰,张庆文,张晓琦,叶文才. 五指毛桃的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3696-3701.
ZHENG R R, YA J, WANG W J, YANG H B, ZHANG Q W, ZHANG X Q, YE W C. Chemical studies on roots of *Ficus hirta*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(21): 3696-3701. (in Chinese)
- [10] 易明涛,李明兰. 粗叶榕组织培养常见问题及对策[J]. 热带农业工程, 2024, 48(2): 117-119.
YI M T, LI M L. Analysis on the common problems and countermeasures of *Ficus hirta* Vahl. tissue culture[J]. Tropical Agricultural Engineering, 2024, 48(2): 117-119. (in Chinese)
- [11] 黄国婷,张青槐,揭洁,周刊. 基于壮医理论探讨壮药五指毛桃的药理作用及临床应用[J]. 中国民族民间医药,

- 2024, 33(17): 61-66.
- HUANG G T, ZHANG Q H, JIE J, ZHOU K. Based on the theory of Zhuang medicine, the pharmacological effects and clinical application of Zhuang medicine *Ficus hirta* Vahl. were discussed[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2024, 33(17): 61-66. (in Chinese)
- [12] GAO W R, MA R H, LI X, LIU J Q, JIANG A H, TAN P T, XIONG G X, DU C Z, ZHANG J J, ZHANG X C, FANG X M, YI Z L, ZHANG J. Construction of genetic map and QTL mapping for seed size and quality traits in soybean (*Glycine max* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(5): 2857
- [13] PATEL R, MEMON J, KUMAR S, PATEL D A, SAKURE A A, PATEL M B, DAS A, KARJAGI C G, PATEL S, PATEL U, ROYCHOWDHURY R. Genetic diversity and population structure of maize (*Zea mays* L.) inbred lines in association with phenotypic and grain qualitative traits using SSR genotyping[J]. Plants (Basel), 2024, 13(6): 823.
- [14] 刘树芳, 张先闻, 董丽英, 刘沛, 田维逵, 周伍民, 杨勤忠. 云南不同稻区稻瘟病菌群体遗传结构的 SSR 分析[J]. 中国农学通报, 2023, 39(12): 123-130.
- LIU S F, ZHANG X W, DONG L Y, LIU P, TIAN W K, ZHOU W M, YANG Q Z. SSR analysis of population genetic structure of *Magnaporthe oryzae* from different rice-growing regions in Yunnan[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2023, 39(12): 123-130. (in Chinese)
- [15] 陈荣珠, 王小平, 高伟城, 罗晓锋, 周建金, 林美珍. 4 种裂叶类型五指毛桃果实中氨基酸组成比较及营养价值评价[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(1): 238-246.
- CHEN R Z, WANG X P, GAO W C, LUO X F, ZHOU J J, LIN M Z. Comparative analysis of amino acids composition in fruits of four types *Ficus Hirta* with lobed leaf and evaluation of their nutritional value[J]. China Food Additives, 2024, 35(1): 238-246. (in Chinese)
- [16] 胡超琼. 基于 SCoT、IRAP 和 SSR 分子标记的柿属植物亲缘关系分析[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2018.
- HU C Q. Genetic relationship analysis of persimmon by SCoT, IRAP and SSR molecular markers[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018. (in Chinese)
- [17] 赵秋菊, 崔学强, 邓杰玲, 黄昌艳, 欧美景, 李红燕, 张自斌. 金钗石斛居群遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建[J]. 中草药, 2023, 54(19): 6434-6442.
- ZHAO Q J, CUI X Q, DENG J L, HUANG C Y, OU M J, LI H Y, ZHANG Z B. Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction of *Dendrobium nobile* populations[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(19): 6434-6442. (in Chinese)
- [18] 姚刘慧, 唐翠明, 戴凡炜, 王振江, 罗国庆. 基于桑树转录组测序的 SSR 标记开发和引物筛选[J]. 蚕业科学, 2015, 41(1): 18-27.
- YAO L H, TANG C M, DAI F W, WANG Z J, LUO G Q. Development and primer screening of SSR markers based on mulberry transcriptome sequencing[J]. Science of Sericulture, 2015, 41(1): 18-27. (in Chinese)
- [19] 李爽, 寇佩雯, 许祎珂, 刘长乐, 孙晓春, 李铂, 黄文静. 基于转录组的防风 SSR 分子标记开发及应用[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(3): 717-727.
- LI S, KOU P W, XU Y K, LIU C L, SUN X C, LI B, HUANG W J. Development and application of SSR markers of *Saposhnikovia divaricata* based on transcriptome[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2024, 49(3): 717-727. (in Chinese)
- [20] 张婷婷, 张鹤山, 宋康杰, 赵泽宇, 许本波, 刘洋. 白三叶转录组 SSR 位点特征分析及引物开发[J]. 草业科学, 2023, 40(9): 2266-2275.
- ZHANG T T, ZHANG H S, SONG K J, ZHAO Z Y, XU B B, LIU Y. Analysis of SSR site characteristics of *Trifolium repens* transcriptome and primer development[J]. Pratacul-tural Science, 2023, 40(9): 2266-2275. (in Chinese)
- [21] 余兴华, 杨艳梅, 李玉祥, 陶永宏, 孟凡来, 滕娟. 基于八角转录组序列的 SSR 分子标记引物开发[J]. 西南农业学报, 2022, 35(6): 1261-1268.
- YU X H, YANG Y M, LI Y X, TAO Y H, MENG F L, TENG J. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Illicium verum*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2022, 35(6): 1261-1268. (in Chinese)
- [22] 聂智星, 傅鸿妃, 李高青, 郭赛赛, 郑积荣. 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.
- NIE Z X, FU H F, LI G Q, GUO S S, ZHENG J R. SSR site information analysis and marker development of pepper (*Cap sicum annum* L.) anther transcriptome[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(23): 7803-7810. (in Chinese)
- [23] 蔡齐宗, 王佳蕊, 陈庆富, 李洪有. 苦荞全基因组 SSR 位点鉴定及分子标记开发[J]. 河南农业大学学报, 2022, 56(3): 392-400.
- CAI Q Z, WANG J R, CHEN Q F, LI H Y. Identification of SSR loci and molecular marker development in the whole genome of tartary buckwheat[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2022, 56(3): 392-400. (in Chinese)
- [24] 林锦彬, 伍永久, 韩艺娟, 陈松彪, 唐唯其. 海带全基因组 SSR 分子标记开发[J]. 分子植物育种, 2023, 21(12): 3964-3972.
- LIN J B, WU Y J, HAN Y J, CHEN S B, TANG W Q. Genome-wide development of SSR markers in *Saccharina ja-*

- ponica*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(12): 3964-3972. (in Chinese)
- [25] 揭应碧, 卢迎春, 宋婉玲, 韦坤华, 张广辉, 杨生超. 三七基因组 SSR 位点分析和多态性引物开发[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(7): 1351-1358.
- JIE Y B, LU Y C, SONG W L, WEI K H, ZHANG G H, YANG S C. Analysis of SSR loci information in *Panax notoginseng* genomes and polymorphic primers development[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39(7): 1351-1358. (in Chinese)
- [26] 陈巍. 三叶木通微卫星序列分析及其在核心种质构建中的应用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2023.
- CHEN W. Microsatellite sequence analysis of *Akebia trifoliata* and application in core collection construction[D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2023. (in Chinese)
- [27] 王彬彬, 高妍夏, 郭欣慰, 纪宏亮, 王敬, 王晖. 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.
- WANG B B, GAO Y X, GUO X W, JI H L, WANG J, WANG H. SSR loci analysis using high-throughput transcriptome sequencing in roots of *Bupleurum chinense* DC.[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2024, 33(4): 707-717. (in Chinese)
- [28] 周胜芳. 石斛 SSR 分子标记的开发及应用研究[D]. 南充: 西华师范大学, 2023.
- ZHOU S F. Development and application of SSR molecular markers for the *Dendrobium*[D]. Nanchong: China West Normal University, 2023. (in Chinese)
- [29] 刘强, 赵丽, 郭虹霞, 张丽光, 邓妍, 王陆军, 王创云. 玉米野生近缘种大刍草幼苗叶片的转录组SSR分析[J]. *玉米科学*, 2020, 28(2): 69-75.
- LIU Q, ZHAO L, GUO H X, ZHANG L G, DENG Y, WANG L J, WANG C Y. Transcriptome SSR analysis of seedling leaves in maize wild relative species *teosinte*[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2020, 28(2): 69-75. (in Chinese)
- [30] 蒋爽, 张学英, 安海山, 徐芳杰, 章加应. 枇杷全基因组 SSR 标记开发及其多态性研究[J]. *园艺学报*, 2021, 48(5): 1013-1022.
- JIANG S, ZHANG X Y, AN H S, XU F J, ZHANG J Y. Development and analysis of polymorphism of SSR markers in the whole genome of loquat[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(5): 1013-1022. (in Chinese)
- [31] 郭俊, 朱婕, 谢尚潜, 张叶, 叶蓓蕾, 郑丽燕, 凌鹏. 油梨转录组SSR分子标记开发与种质资源亲缘关系分析[J]. *园艺学报*, 2020, 47(8): 1552-1564.
- GUO J, ZHU J, XIE S Q, ZHANG Y, YE B L, ZHENG L Y, LING P. Development of SSR molecular markers based on transcriptome and analysis of genetic relationship of germplasm resources in avocado[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(8): 1552-1564. (in Chinese)
- [32] 陈友吾, 廖荣俊, 叶碧欢, 宋其岩, 杨阳, 李楠, 李海波. 多花黄精转录组 SSR 位点分析及分子标记开发[J]. *中草药*, 2020, 51(1): 182-189.
- CHEN Y W, LIAO R J, YE B H, SONG Q Y, YANG Y, LI N, LI H B. Analysis on SSR loci in transcriptome and development of molecular markers in *Polygonatum cyrtoneura*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(1): 182-189. (in Chinese)
- [33] TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, LIPOVICH L, CARTINHOUR S, MCCOUCH S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential[J]. *Genome Research*, 2001, 11(8): 1441-1452.