

基于文冠果(*Xanthoceras sorbifolium* Bunge.)基因组 SSR 标记的开发及初步验证

乐琳琳¹ 曹福亮^{1*} 杨晓明¹ 郁万文¹ 蔡金峰¹ 汪贵斌¹ 李守科² 赵祥树²

(1 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京, 210037; 2 山东沃奇农业开发有限公司, 潍坊, 262100)

摘要:【目的】基于文冠果全基因组信息开发文冠果 SSR 标记, 为文冠果种质资源鉴定和遗传图谱的构建奠定基础。【方法】以文冠果基因组为分析材料, 分别利用 Krait、Primer 软件查找 SSR 位点和设计 SSR 引物, 并利用 1%琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶进行初步筛选和多态性筛选。【结果】结果可知, 文冠果全基因组全长 477 586 502 bp, 共存在 253 336 个 SSR 位点, 平均每 1 870 bp 出现一个 SSR 位点, GC 含量为 34.96%; 不同染色体上的 SSR 位点数量不同, 其中, SSR 位点数量最多的是 1 号染色体, SSR 位点数量最少的是 15 号染色体。SSR 位点的平均长度为 18.92 bp, 且重复单元中单核苷酸到六核苷酸的数量呈下降趋势。SSR 位点的重复次数主要集中在 4~13 次重复范围内, 且同一重复类型, 重复次数越多, SSR 位点出现的频率越低。文冠果基因组中共存在 268 种 SSR 重复类别, 重复基元种类随重复次数增加而增加。单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的重复单元中, 出现最多的分别是 A/T, AT/AT, AAG/TTC, AAAT/TTTA, AAAAT/TTTAA, AAAACG/TTTTTCG, 显示出明显的 A/T 偏好性。虽然不同的 SSR 重复单元的序列长度有所不同, 但其均显示出 SSR 重复单元的序列长度的增加, 而 SSR 位点数减少的趋势。进一步利用 6 份不同种源的文冠果对待测引物进行多样性分析, 得到 30 对条带清晰、多态性好的 SSR 引物。【结论】文冠果基因组 SSR 位点具有较高的出现频率和分布密度, 基元类型和重复次数相对较高, 具有高多态性的潜能, 可以进行有目的的引物设计和开发。

关键词: 文冠果(*Xanthoceras sorbifolium* Bunge.); 基因组; SSR; 标记开发

Development and Preliminary Verification of SSR Markers Based on the Genome of *Xanthoceras sorbifolium* Bunge

Abstract: [Objective] To develop SSR markers based on the whole genome information of *Xanthoceras sorbifolium* and to lay the foundation for the identification of germplasm resources and the construction of a genetic map of *X. sorbifolium*. [Methods] Using the genome of *X. sorbifolium* as analysis material, SSR loci were searched and SSR primers were designed using Krait and Primer software, and 1% agarose gel and polyethylene-propylene gel were used for preliminary screening and polymorphism screening. [Results] The results showed that the whole genome of *X. sorbifolium* was 477 586 502 bp in length, and there were 253 336 SSR loci, with an average of one SSR per 1 870 bp. The GC content was 34.96%. The number of SSR loci on different chromosomes was different. The number of SSR loci on chromosome 1 was the most, and the number of SSR loci on chromosome 15 was the least. The average length of the SSR locus was 18.92 bp, and the number of single nucleotide to hexanucleotide in the repeating unit showed a decreasing trend. The number of repetitions of SSR loci mainly ranged from 4 to 13 times, and the frequency of SSR loci decreased with the increase in the number of repetitions in the same repeat type. A total of 268 SSR repeat categories were found in the *X. sorbifolium* genome, and the types of repeat motifs increased with the number of repeats. In single nucleotide, dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide, and hexanucleotide repeating units, A/T, AT/AT, AAG/TTC, AAAT/TTTA, AAAAT/TTTAA, AAAACG/TTTTTCG, which appeared the most times, exhibiting obvious A/T preference. The sequence lengths of different SSR repeat units were different, whereas they all showed a trend that the number of SSR sites decreased with the increase in length. The diversity analysis of the primers to be tested was further conducted with 6 different provenances of *X. sorbifolium*, and 30 pairs of SSR primers with clear bands and good polymorphism were obtained. [Conclusion] The SSR loci of the genome of *X. sorbifolium* have a high frequency of occurrence and distribution density, relatively high motif type and the number of repeats, and have the potential for high polymorphism, which can be designed and developed with purposeful primers.

Keywords: *Xanthoceras sorbifolium* Bunge; Genome; SSR; Mark development

文冠果系无患子科(Sapindaceae)文冠果属(*Xanthoceras* Bunge), 是一种落叶灌木或小乔木, 又可以被称为文冠花、文灯果等(韩传明等, 2011), 主要分布在中国北方黄土高原地区。文冠果耐干旱, 贫瘠, 易繁殖, 种子含油量高, 是中国当下重要的食用油及机械用油提取原料之一; 且具有较高的经济、生态、观赏

等价值,是中国重要的经济林树种之一(杨国臣,2021)。目前,关于文冠果的报道多集中于栽培技术(马启慧,2007),文冠果油品质评价(孔维宝等,2011)等方面,而有关文冠果种质资源鉴定的报道却较少。

分子标记是一种遗传标记,是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的,可以直接反映出 DNA 水平的遗传多态性。SSR (Simple sequence repeat)是指简单重复序列标记,是以 1~6 个核苷酸为重复单位组成的串联重复序列(杨梦婷等,2019)。SSR 标记被认为是研究种群遗传学,系统发育,分子生态学和植物中标记辅助选择研究的最强大的高分辨率工具之一,具有共聚性,良好的再现性和高多态性(Wang et al.,2019)。广泛应用于构建遗传图谱、种质资源鉴定、遗传多样性分析等多个领域(张涵等,2019),是目前最常用的分子标记技术之一。目前,SSR 分子标记已在马尾松(*Pinus massoniana*) (梅利那等,2017)、山樱花(*Cerasus serrulata*) (伊贤贵等,2018)等植物育种中有许多应用研究,主要集中在辅助育种、种质资源保护等方面,并取得了一些应用成果。

本研究基于文冠果全基因组信息,挖掘出 SSR 位点,分析不同染色体上 SSR 位点的分布模式及规律,并开发出具有多态性的 SSR 标记,以期为后续进行文冠果遗传多样性分析、种质资源鉴定、遗传图谱的建立等提供理论基础,进而有力地促进文冠果种质资源的开发和利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用的材料为 2020 年采摘的 6 个不同种源的同一发育时期的文冠果叶片。分别取其嫩叶,放于-80 °C 超低温冰箱保存,品种信息(表 1)。

1.2 DNA 提取

取文冠果嫩叶,迅速放入液氮内并研磨成粉末,用安全型植物 DNA 小量提取试剂盒(广州美基生物科技有限公司)提取文冠果基因组 DNA,在提取了文冠果 DNA 后,使用 1%的琼脂糖凝胶对其进行检测,随后使用分光光度计对 DNA 的浓度及纯度进行测定,并将质量良好的 DNA 保存于-20 °C 冰箱备用。

表 1 6 份不同文冠果品种的编号及来源

Tab. 1 Numbers and sources of 6 different varieties

编号 Number	来源 Source
1	内蒙古自治区赤峰市 Chifeng City, Inner Mongolia Province
2	河北省张家口市 Zhangjiakou City, Hebei Province
3	甘肃省张掖市 Zhangye City, Gansu Province
4	辽宁省朝阳市 Chaoyang City, Liaoning Province
5	青海省海东市 Haidong City, Qinghai Province
6	安徽省淮南市 Huainan City, Anhui Province

1.3 SSR 引物设计

本研究以文冠果基因组为分析材料,利用 Krait 软件查找 SSR 位点。查找标准:单核苷酸至六核苷酸 SSR 重复单元的最少重复次数分别设定为 12 次、6 次、5 次、4 次、4 次、4 次,不同位点间最少间距为 100 bp。

1.4 SSR 引物筛选及多态性检测

对设计出的 SSR 引物进行多态性检测,以文冠果 DNA 为模板,使用 2×Taq Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行 PCR 扩增,PCR 扩增程序为:95 °C 预变性 3min,95 °C 变性 10s,复性 56 °C 10s,72 °C 延伸 30 s (35 个循环),72 °C 延伸 5 min。

2 结果与分析

2.1 文冠果基因组中基元类型分布特征

本研究对文冠果基因组中的 SSR 位点进行分析。通过分析可知，文冠果全基因组全长 477 586 502 bp，共存在 253 336 个 SSR 位点，平均每 1 870 bp 出现一个 SSR 位点，GC 含量为 34.96%，SSR 位点的平均长度为 18.92 bp (表 2)。1~6 个核苷酸的位点都存在，单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸六种重复单元的数量分别为 106 450，91 915，38 912，11 030，3 421，1 608，分别占总重复单元数量的 42.02%，36.28%，15.36%，4.35%，1.35%，0.63% (表 3)。

表 2 文冠果基因组 SSR 位点分布特征
Tab. 2 SSR site distribution characteristics

位点特征 Site characteristics	数量 Number
基因组序列总长(bp) Total length of genome sequence (bp)	477 586 502
SSR 位点数 Number of SSR sites	253 336
SSRs 平均长度(bp) The average length of SSRs (bp)	18.92
GC 含量(%) GC content (%)	34.96

表 3 文冠果基因组中不同重复单元的数量，比例和平均长度
Tab. 3 The number, proportion and average length of different repeating units

核苷酸类型 Nucleotide type	数量 Number	百分比(%) Percentage (%)	平均长度(bp) Average length (bp)
单核苷酸 Mono-nucleotide	106 450	42.02	15.14
二核苷酸 Di-nucleotide	91 915	36.28	23.14
三核苷酸 Tri-nucleotide	38 912	15.36	19.29
四核苷酸 Tetra-nucleotide	11 030	4.35	17.19
五核苷酸 Penta-nucleotide	3 421	1.35	20.96
六核苷酸 Hexa-nucleotide	1 608	0.63	25.65

2.2 不同染色体 SSR 位点分析

不同染色体上的 SSR 位点数量不同，1-15 号染色体上的 SSR 位点数分别为 22 803、19 231、20 055、18 473、17 444、18 424、16 325、17 729、15 191、15 336、16 287、14 928、15 613、13 183、12 314 个，由此可见，1 号染色体上的位点数最多，占总 SSR 位点数的 9.00%，15 号染色体最少，仅占 4.86% (图 1)。

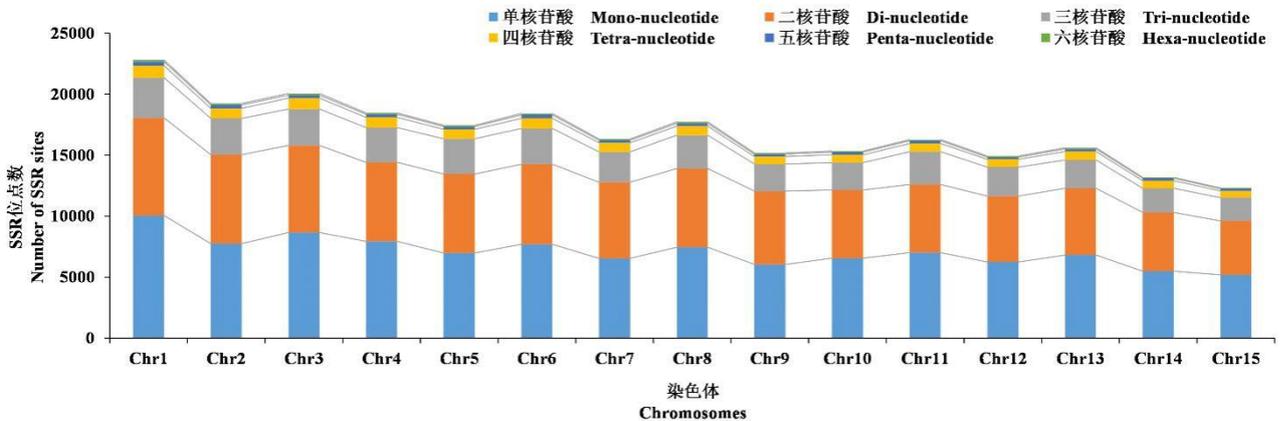


图 1 不同染色体 SSR 位点分布
Fig. 1 Distribution of SSR site in different chromosomes

SSR 位点数与染色体的长度紧密相关,通过对染色体长度与 SSR 位点数进行一元线性回归分析(图2),可以得到一元线性的回归方程 $y = 1705.3x + 3E + 06$, 其决定系数达到了 0.91, 说明染色体长度与 SSR 位点数的拟合效果较好, 二者之间存在线性关系, 与毛果杨的研究结果相符(崔哲等, 2020)。

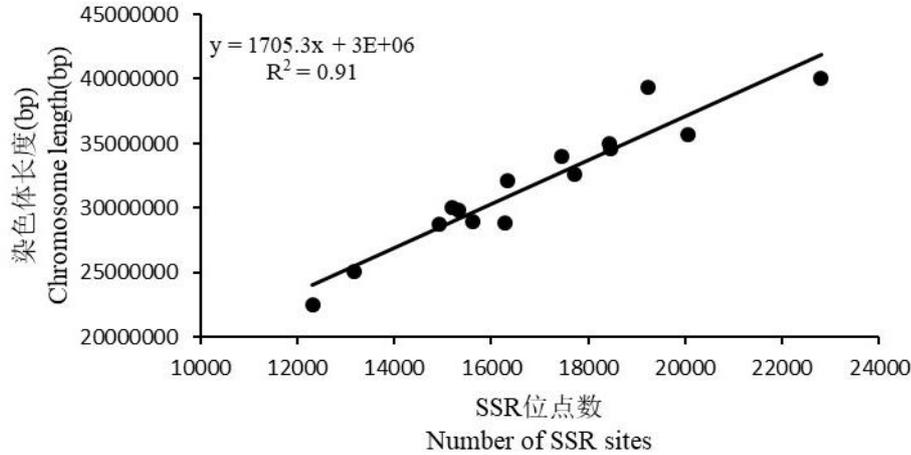


图2 染色体长度与 SSR 位点数一元回归方程

Fig. 2 One element regression equation of chromosome length and SSR locus

2.3 文冠果基因组 SSR 重复单元的分布特征

在文冠果基因组中共鉴定出 268 种 SSR 重复类别, 重复基元种类随重复次数增加而增加。其中, 单核苷酸的重复基元存在两种, A/T 重复基元占绝大多数, 占单核苷酸重复类别的 98.03%, 占 SSR 总数的 41.19%; 在二核苷酸重复基元中, 出现次数最多的是 AT/AT, 共 64 759 个, 占二核苷酸重复类别的 70.46%, 占 SSR 总数的 25.56%, 其次是 AG/CT, 共 19 873 个, 占 SSR 总数的 7.84%, 最少的是 CG/CG, 仅 62 个, 占 SSR 总数的 0.02%; 在三核苷酸重复基元中, 出现次数最多的是 AAG/TTC, 占三核苷酸重复类别的 61.29%, 占 SSR 总数的 9.41%, 其次依次是 AAT/TTA, ATC/TGA, AAC/TTG, 分别占 SSR 总数的 3.55%, 0.81%, 0.47%; 在四核苷酸重复基元中, 出现频率最高的是 AAAT/TTTA, 共 5 915 个, 占四核苷酸重复类别的 53.63%, 占 SSR 总数的 2.33%, 其次依次是 AAAG/TTTC, AATT/TTAA, 分别占 SSR 总数的 0.65%, 0.56%; 在五核苷酸重复基元中, 出现频率最高的是 AAAAT/TTTTA, 共 1 177 个, 占五核苷酸重复类别的 34.41%, 占 SSR 总数的 0.46%, 其次是 AAAAG/TTTTC, 共 484 个, 占 SSR 总数的 0.19%; 在六核苷酸重复基元中, 出现频率最高的是 AAAACG/TTTTCG, 共 255 个, 占五核苷酸重复类别的 15.86%, 占 SSR 总数的 0.10%, 其次是 AAAAAT/TTTTTA, 共 220 个, 占 SSR 总数的 0.09%, 其余重复单元出现频率均较低(表 4)。

表 4 文冠果基因组中 SSR 重复单元的分布特征

Tab. 4 Distribution characteristics of some SSR repeat units

核苷酸类型 Nucleotide type	重复单元 Repeats motif	数目 Number	比例(%) Percentage (%)
单核苷酸 Mono-nucleotide	A/T	104 358	41.19
	C/G	2 092	0.83
二核苷酸 Di-nucleotide	AT/AT	64 759	25.56
	AC/GT	7 221	2.85
	AG/CT	19 873	7.84
	CG/CG	62	0.02
三核苷酸 Tri-nucleotide	AAT/TTA	8 982	3.55
	AAC/TTG	1 189	0.47
	AAG/TTC	23 849	9.41
	ATC/TGA	2 061	0.81

	其他	2 831	1.11
	Others		
四核苷酸 Tetra-nucleotide	AAAT/TTTA	5 915	2.33
	AAAC/TTTG	337	0.13
	AAAG/TTTC	1 653	0.65
	其他	3 125	1.23
	Others		
五核苷酸 Penta-nucleotide	AAAAT/TTTTA	1 177	0.46
	AAAAC/TTTTG	129	0.05
	AAAAG/TTTTC	484	0.19
	其他	1 631	0.64
	Others		
六核苷酸 Hexa-nucleotide	AAAAAT/TTTTTA	220	0.09
	AAAACG/TTTTTCG	255	0.10
	其他	1 133	0.44
	Others		

2.4 文冠果基因组 SSR 位点数量及分布

通过对文冠果基因组数据中六种核苷酸的重复次数统计可知, SSR 位点的重复次数大多集中在 4~13 次重复范围内, SSR 个数共计 164 559 个, 占 SSR 总数的 64.96%, 其中, 占总 SSR 位点数最多的是 12 次重复, 共 29 860 个, 占总 SSR 位点数的 11.79%, 其次是 6 次重复和 13 次重复, 分别为 26 874 和 21 725 个, 占总 SSR 位点数的 10.61%、8.58%。在所有重复次数中, 单核苷酸的 12 次重复的数量最多(25 646 个), 三核苷酸的 5 次重复次之(18 621 个)。从统计数据中, 可以看出, 对于同一重复类型, SSR 位点的重复次数越多, SSR 位点数越少(表 5)。

表 5 SSR 位点的数量及分布
Tab. 5 Number and distribution of SSR sites

核苷酸类型 Nucleotide type	重复次数 Repeat number											
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	>13	
单核苷酸 Mono-nucleotide	—	—	—	—	—	—	—	—	25 646	18 2	62 5	80 24
二核苷酸 Di-nucleotide	—	—	17 2 77	12 299	10 463	8 427	6 337	4 84 0	3 785	3 18 6	25 3 01	
三核苷酸 Tri-nucleotide	—	18 621	9 07 5	4 428	2 365	1 314	900	577	425	257	950	
四核苷酸 Tetra-nucleotide	6 8 59	1 887	390	95	30	17	4	3	4	1	2	
五核苷酸 Penta-nucleotide	6 2 88	438	77	16	3	1	—	—	—	—	—	
六核苷酸 Hexa-nucleotide	6 1 28	242	55	18	4	1	1	—	—	1	—	
合计 Total	68 12 7	21 188	26 8 74	16 856	12 865	9 760	7 242	5 42 0	29 860	21 7 25	88 7 77	

2.5 文冠果基因组中不同 SSR 重复单元序列长度的分布特征

尽管文冠果基因组中不同的 SSR 重复单元的序列长度都有所不同，但是均显示出 SSR 重复单元的序列长度增加，而 SSR 位点数减少的趋势。二核苷酸重复单元的序列长度变化幅度最大(12~196 bp)，其中平均长度最大的序列为(AT/AT)_n 序列，长度为 25.47，平均长度最小的序列为(CG/CG)_n 序列，长度为 13.87。单核苷酸重复单元的序列长度变化幅度为 12~106 bp，其中(A/T)_n 序列的平均长度为 15.16，(C/G)_n 序列的平均长度为 22.58 (图 3)。

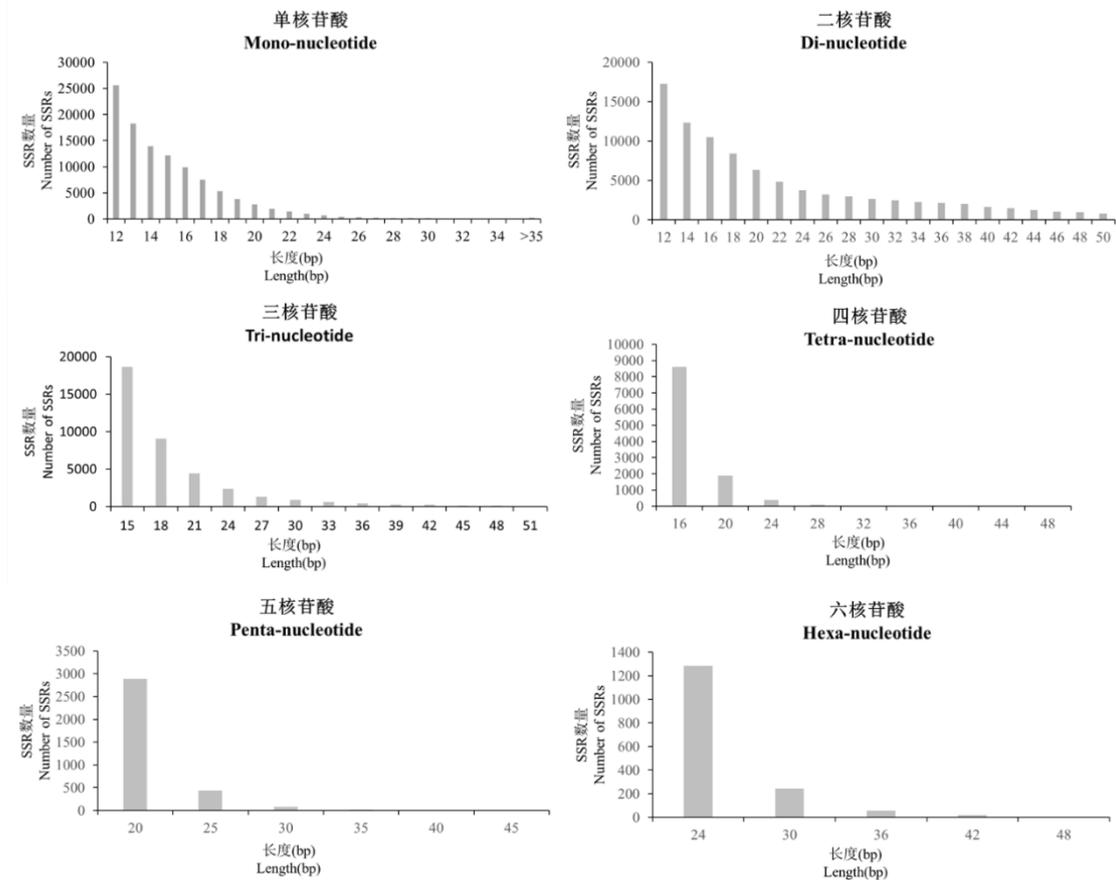


图 3 不同 SSR 重复单元的序列长度

Fig. 3 Sequence length of different SSR repeat units

2.6 文冠果基因组 SSR 标记的多态性

基于文冠果基因组的 SSR 序列信息，在每条染色体上随机挑选出每种重复类型的 SSR 位点 12~18 个，共设计出 246 对引物，利用 6 份不同种源的文冠果样品进行检测，筛选出 30 对(表 6)条带清晰，多态性良好，可用性较高的引物，用于后续文冠果的遗传多样性分析(图 4)。

表 6 30 对 SSR 引物序列信息

Tab. 6 SSR primer sequence information

引物编号 Primer number	重复单元 Repeat unit	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
X_LG1-P 2-03	(AT) ₁₉	TGCAATTGTGTCGGTAGTCC	TGGAGTTGAGGTTGAAATCG
X_LG2-P 2-01	(AT) ₂₅	CCCAGTTAGTCCTTTGTGC	CCTGAGGTTCCCAATTTCTG
X_LG2-P 4-01	(GTAT) ₇	GGGCATGTGGCAATTAAGAT	TGGTTTCTGGTTGCATGTGT
X_LG3-P 2-02	(AT) ₂₂	TCGGTTGAACAATCAAGCAG	GTCGCATCAAACCAATTTTC
X_LG3-P 5-02	(TCAA) ₅	TTCTACACCAAACAAGGGACAG	TCCCTACAATTCGGAAGACC

X_LG3-P	(CACAA) ₆	CATCCACTTGCAAAGACTCG	CGGAAAGTTGCAGAGAAAGG
5-03			TCAGATTCATAGTCCGCTGTA
X_LG4-P	(ATGAA	TCAAACAGTTGGGACCCACG	GC
6-03	G) ₄		
X_LG5-P	(CTT) ₁₂	TGGCTTCTCTACAAGTTTCACATC	CCTCCTTCTTCGTTGGTCTG
3-03			
X_LG5-P	(CTCC) ₇	ATTGCCATCTGCTGGAGAAC	AAACCAACCGAATTTTCATGC
4-02			
X_LG5-P	(AGAAG) ₅	TTTCTGTTGGCCTGGAAAAG	GAAGCAGAGCCCACGTCTAC
5-01			
X_LG6-P	(TAT) ₁₀	CAACAAAACCCGAAAACAAG	CTTGGAGGGATTTGGACCTC
3-01			
X_LG7-P	(TCT) ₇	CTCCTCCTCCCATGTTGCC	CAGTGTCTTTCTACTTGGTTTG
3-11			GG
X_LG7-P	(TTC) ₆	CATTCTTGTTGACGGAGGTTCC	TGAAAGAGCAAGACAGACTG
3-17			C
X_LG8-P	(AT) ₁₃	GGGCAGGAAACATCGATTAG	TTTGATGGGGTGAGGAGTTC
2-16			
X_LG8-P	(TTC) ₈	GCACCAGCCATGTCAAAAGG	TGCTACGTACACAACAATAAA
3-03			AACG
X_LG8-P	(CATA) ₇	GCGTGGGTTCTTTTTCTGC	CAAAACCACAATCATCACTTG
4-03			TTCC
X_LG9-P	(AAG) ₉	TTCATGTTCCCTCCCTCAACC	CTGCAACTCCAGCAACTTCA
3-01			
X_LG10-	(AT) ₁₈	TGACTACCAGTTTTCAAGTGAGG	GCATGGAAAAGCTACATCAAAA
P2-01			C
X_LG10-	(AT) ₁₅	CGAAACATGGAACACTGGAA	GAATTTGAGAGAGATTTGAGA
P2-07			GACC
X_LG10-	(AATT) ₇	GTTTAGGCTTGGGCGGTAAG	TCCAATCCCAATTACGAAGT
P4-01			
X_LG11-	(TC) ₁₈	GGCACAAGCCACAACCTTCTC	CGTGGCATGATGTGATTAGG
P2-01			
X_LG11-	(AT) ₁₇	CCTCCAGAGATTGGCTCAAC	GGCAACCCTTGCTATTCTTC
P2-06			
X_LG11-	(CTGGG	GTCGAGGTTGTGGGTTTCAT	CGTTTCTCTTCCCTCACCAG
P6-01	G) ₇	GAGGTATATCATAAAAGACCGTTG	CCATAAGGTGGGAGAAAGGT
X_LG12-	(TTA) ₉		
P3-01		G	
X_LG12-	(TGTA) ₇	TGAGGTCATCAACCACCAAG	CCACCAGTACCCTTCCCTTT
P4-01			
X_LG12-	(TTTTTC) ₆	CAATGCAGTCTCCATAACTTTC	GGCTCCTGCCAAGGTTAGAC
P6-01			
X_LG13-	(CTTGCT)	TCATCACCACCATCATTTGC	GCTCTGGCCTCTGTGTCTCT
P6-01			
X_LG14-	(AT) ₂₀	GGGAACAAGTCGCGATTAAG	CAATTTGCTCCCTCCTTGAC
P2-04			
X_LG14-	(TAA) ₁₀	GGCTAAAGACAATTACAGAAGTGC	GGTTGGAGGTCGTAGGATCA
P3-01			
X_LG15-	(AT) ₂₀	CAACGGTTTAAAGCTCCATGTC	GGTGAAGGGGTATTGGAATTG
P2-01			

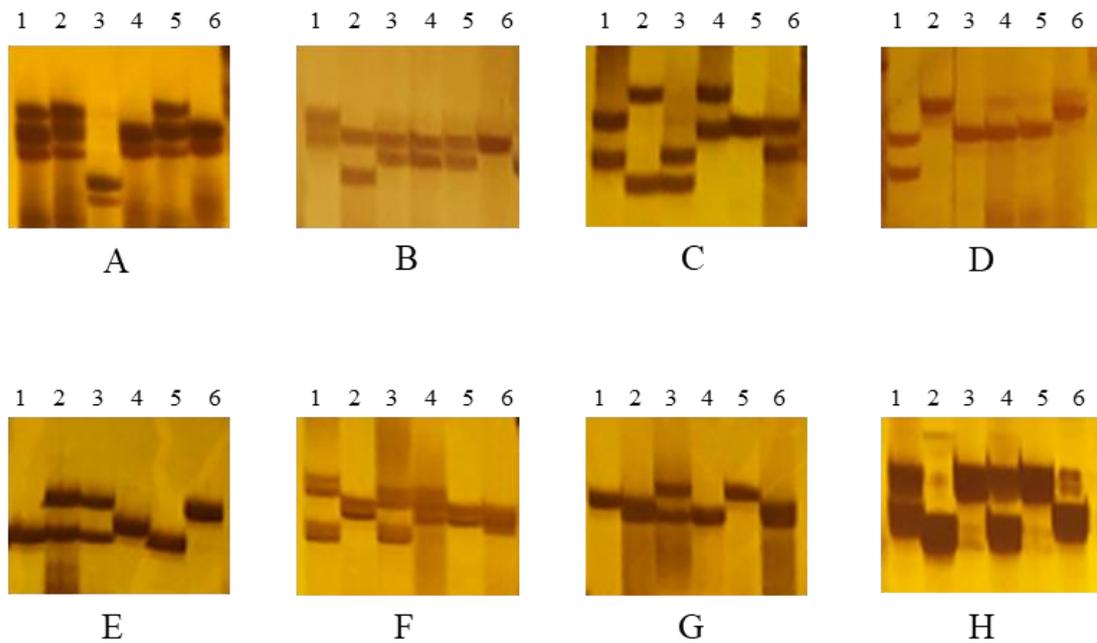


图4 文冠果8对SSR引物在6份种质资源中的多态性分析

注: 样品编号为1, 2, 3, 4, 5, 6 (表5); A: X_LG3-P5-03; B: X_LG5-P4-02; C: X_LG4-P6-03; D: X_LG5-P4-02; E: X_LG7-P3-11; F: X_LG8-P3-03; G: X_LG8-P4-03; H: X_LG10-P4-01

Fig. 4 Polymorphism analysis of 8 pairs of SSR primers of *Xanthoceras sorbifolium* in 6 germplasm resources
Note: The sample numbers are 1, 2, 3, 4, 5, 6 (Table 5). A: X_LG3-P5-03; B: X_LG5-P4-02; C: X_LG4-P6-03; D: X_LG5-P4-02; E: X_LG7-P3-11; F: X_LG8-P3-03; G: X_LG8-P4-03; H: X_LG10-P4-01

3 讨论

随着DNA测序方法的飞速发展,杨树(*Populus*) (Tuskan et al., 2006)、桑树(*Morus notabilis.*) (He et al., 2013)等越来越多的植物基因组完成测序。在对植物基因组范围内的大量亲本材料进行遗传距离的估测时,可以利用DNA分子标记技术,同时可以在此基础上进行植物种质资源的鉴定与分子评价,其中SSR分子标记凭借其丰富的多态性、共显性等特点,被广泛使用(王晓梅和杨秀荣, 2000)。Shen Zhan(2017)、张佳敏(2019)等选取了具有代表性的文冠果种质资源,初步筛选出了具有多态性的引物,但并未对文冠果基因组不同染色体的SSR分布模式进行分析。本研究以文冠果全基因组序列为基础,鉴定出253 336个SSR位点,平均每1.87kb出现一个SSR位点,SSR位点数量丰富,重复单元种类繁多,为后续开展SSR位点的分析与统计奠定了基础。在文冠果基因组SSR位点中,单核苷酸重复型SSR位点占总SSR位点数的比例最高,达到42.02%,而六核苷酸重复型SSR位点占总SSR位点数的比例最低,仅0.63%,这与草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.) (苗立祥等, 2020)、石榴(*Punica granatum*) (洪文娟等, 2019)等植物的研究结果相似,但与虎耳草属(杨雯等, 2018)植物二核苷酸重复和三核苷酸重复的数量最多的研究结果不符,这可能是由于不同物种的基因组序列长短差异所致。

文冠果基因组上拥有种类多样的SSR重复单元,但不同的SSR重复单元的数量差异较大,通过分析重复单元的分布得到结果,在单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸这六种重复单元中,出现最多的分别是A/T, AT/AT, AAG/TTC, AAAT/TTTA, AAAAT/TTTTA, AAAACG/TTTTC G,这说明在优势重复单元中A/T碱基的含量丰富,这与草本植物鸭茅(*Dactylis glomerata* L.) (李季等, 2017)的分析结果不同,特别是三核苷酸和四核苷酸,鸭茅最丰富的重复单元为CCG/CGG、AGAT/ATCT,这可能是由于木本植物和草本植物之间存在一定的差异。有研究表明,SSR基元的重复次数与多态性标记的开发潜力呈正相关(Thao et al., 2013)。文冠果基因组SSR位点的重复次数大多集中在4~13次重复范围内,其中重复次数≥12的SSR位点数有140 362个,占SSR总数的55.41%,由此可表明文冠果具有较高的多态性开发潜力。

本研究以文冠果全基因组为基础,利用生物信息学技术,统计分析出文冠果基因组SSR位点的长度、

数量、重复单元等多种生物信息学特征，并基于 SSR 位点信息开发出种类与数量都较为丰富的 SSR 分子标记。利用 6 份文冠果材料对部分引物的多态性进行了检测，发现具有较好的多态性，表明所筛选的引物具有较高的实用性，为今后进行文冠果的种质资源鉴定和品种选育、遗传多样性分析等奠定基础，进而促进文冠果种质资源的开发与利用。

4. 结论

文冠果基因组 SSR 位点具有较高的出现频率和分布密度，单元类型和重复次数相对较高，具有高多态性的潜能。基于基因组序列设计筛选的 30 对 SSR 引物在文冠果上可检测到较高的多态信息含量，进一步丰富了无患子科现有 SSR 标记数据库资源，可为无患子科植物在基因组水平上的遗传多样性分析和分子辅助育种等提供参考。

参 考 文 献

- 崔哲, 左力辉, 韩坤瑾, 等. 2020.毛果杨(*Populus trichocarpa*)全基因组 SSR 位点分布规律. 分子植物育种, 18(11): 3683-3692.
- (Cui Z, Zuo L H, Han K J, *et al.* 2020.Distribution rule of SSR loci in whole genome of *Populus trichocarpa*. Molecular Plant Breeding, 18(11): 3683-3692. [in Chinese])
- Thao D V, Yamashita M, Watanabe A, *et al.* 2013.Development of tetranucleotide microsatellite markers in *Pinus kesiya* Royle ex Gordon. Conservation Genetics Resources, 5(2): 405-407.
- 韩传明, 王翠香, 栾森年, 等. 2011.文冠果特性及丰产栽培技术. 中国园艺文摘, 27(1): 173-174.
- (Han C M, Wang C X, Luan S N, *et al.* 2011.The characteristics and high-yield cultivation techniques of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. China Horticulture Digest, 27(1): 173-174. [in Chinese])
- 洪文娟, 郝兆祥, 刘康佳, 等. 2019.基于石榴全基因组序列的 SSR 标记开发及鉴定. 北京林业大学学报, 41(8): 38-47.
- (Hong W J, Hao Z X, Liu K J, *et al.* 2019.Development and identification of SSR molecular markers based on whole genomic sequences of *Punica granatum*. Journal of Beijing Forestry University, 41(8): 38-47. [in Chinese])
- He N J, Zhang C, Qi X W, *et al.* 2013.Draft genome sequence of the mulberry tree *Morus notabilis*. Nature Communications, 4: 2445.
- 孔维宝, 梁俊玉, 马正学, 等. 2011.文冠果油的研究进展. 中国油脂, 36(11): 67-72.
- (Kong W B, Liang J Y, Ma Z X, *et al.* 2011.Research advance of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge oil. China Oil, 36(11): 67-72. [in Chinese])
- 李季, 黄琳凯, 金梦雅, 等. 2017.鸭茅基因组 Genomic-SSR 标记开发. 分子植物育种, 15(10): 4071-4079.
- (Li J, Huang L K, Jin M Y, *et al.* 2017.Development and verification of Orchardgrass Genomic-SSR. Molecular Plant Breeding, 15(10): 4071-4079. [in Chinese])
- 马启慧. 2007.能源树种文冠果的研究现状与发展前景. 北方园艺, (08): 77-78.
- (Ma Q H. 2007.Research status and development prospects of energy tree species *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. Northern Horticulture, (08): 77-78 [in Chinese])
- 苗立祥, 杨肖芳, 张豫超, 等. 2021.基于草莓全基因组 SSR 标记的开发和应用. 分子植物育种, 19(4): 1210-1222.
- (Miao L X, Yang X F, Zhang Y C, *et al.* 2021.Development of genomic SSR and application in Strawberry. Molecular Plant Breeding, 19(4): 1210-1222. [in Chinese])
- 梅利那, 范付华, 崔博文, 等. 2017.基于马尾松转录组的 SSR 分子标记开发及种质鉴定. 农业生物技术学报, 25(6): 991-1002.
- (Mei L N, Fan F H, Cui B W, *et al.* 2017.Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequences and germplasm identification in Masson Pine (*Pinus massoniana*). Journal of Agricultural Biotechnology, 25(6): 991-1002. [in Chinese])

- Shen Z, Duan J, Ma L Y. 2017. Genetic diversity of *Xanthoceras sorbifolium* bunge germplasm using morphological traits and microsatellite molecular markers. Plos One, 12(6): e0177577.
- Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, *et al.* 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science, 313(5793): 1596-604.
- 王晓梅, 杨秀荣. 2000. DNA 分子标记研究进展. 天津农学院学报, (1): 21-24.
- (Wang X M, Yang X R. 2000. Progress of studies on the molecular markers. Journal of Tianjin Agricultural College, (1): 21-24. [in Chinese])
- Wang Y, Zhou T T, Li D H, *et al.* 2019. The genetic diversity and population structure of *Sophora alopecuroides* (Faboideae) as determined by microsatellite markers developed from transcriptome. PLoS One, 14(12): e0226100.
- 杨国臣. 2021. 文冠果生理特性及丰产栽培技术. 中国林副特产, (1): 55-56+58.
- (Yang G C. 2021. Physiological characteristics and high yield cultivation techniques of *Xanthoceras sorbifolium* Bunge. China's forest by-products, (1): 55-56+58. [in Chinese])
- 杨梦婷, 黄洲, 干建平, 等. 2019. SSR 分子标记的研究进展. 杭州师范大学学报(自然科学版), 18(04): 429-436.
- (Yang M T, Huang Z, Gan J P, *et al.* 2019. Research progress of SSR molecular markers. Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition), 18(04): 429-436. [in Chinese])
- 杨雯, 蒋伟, 钟国跃, 等. 2018. 虎耳草属植物 SSR 分子标记的开发及应用. 中国中药杂志, 43(10): 2057-2066.
- (Yang W, Jiang W, Zhong G Y, *et al.* 2018. Development and application of polymorphic microsatellite markers in *Saxifraga* genus. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 43(10): 2057-2066. [in Chinese])
- 伊贤贵, 陈洁, 尤禄祥, 等. 2018. 山樱花群体遗传多样性的 SSR 分析. 南京林业大学学报(自然科学版), 42(05): 25-31.
- (Yi X G, Chen J, You L X, *et al.* 2018. Genetic diversity of *Cerasus serrulata* populations assessed by SSR markers. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 42(05): 25-31. [in Chinese])
- 张涵, 王芳, 白静, 等. 2019. 冬虫夏草转录组 SSR 位点信息分析研究. 中国中药杂志, 44(21): 4605-4611.
- (Zhang H, Wang F, Bai J, *et al.* 2019. SSR loci information analysis in transcriptome of *Cordyceps sinensis*. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 44(21): 4605-4611. [in Chinese])
- 张佳敏, 涂姝月, 德永军, 等. 2019. 基于 SSR 标记的文冠果引物筛选及体系优化. 分子植物育种, 17(18): 6053-6058.
- (Zhang J M, Tu S Y, De Y J, *et al.* 2019. Primer selection and system optimization of *Xanthoceras sorbifolia* based on SSR markers. Molecular Plant Breeding, 17(18): 6053-6058. [in Chinese])