



罗浮柿EST-SSR分子标记开发和种群遗传多样性评价

汤瑞瑜, 李想, 黄钰琳, 冯钰, 张永华

引用本文:

汤瑞瑜, 李想, 黄钰琳, 等. 罗浮柿EST-SSR分子标记开发和种群遗传多样性评价[J]. 热带亚热带植物学报, 2026, 34(1): 63–71.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.5003>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

广东省猴耳环遗传多样性研究

Genetic Diversity of *Archidendron clypearia* in Guangdong Province

热带亚热带植物学报. 2021, 29(5): 539–546 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4337>

基于表型性状和SSR标记的57份辣椒种质遗传多样性分析

Genetic Diversity Analysis of 57 Germplasms of *Capsicum annuum* Based on Phenotypic Traits and SSR Markers

热带亚热带植物学报. 2020, 28(4): 356–366 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4185>

43个福建省茶树品种指纹图谱构建及遗传多样性分析

Constructing Fingerprints and Analyzing Genetic Diversity of 43 Tea Cultivars in Fujian Province

热带亚热带植物学报. 2017, 25(6): 579–586 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3743>

硬核资源遗传多样性的AFLP分析(英文)

Genetic Diversity of *Scleropyrum wallichianum* Based on AFLP Markers

热带亚热带植物学报. 2019, 27(1): 29–35 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3908>

云南木兰科48种野生植物资源的遗传多样性研究

Studies on Genetic Diversity of 48 Wild Species of Magnoliaceae in Yunnan

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 277–284 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4161>

向下翻页，浏览PDF全文

罗浮柿 EST-SSR 分子标记开发和种群遗传多样性评价

汤瑞瑜^{1,2}, 李想¹, 黄钰琳¹, 冯钰³, 张永华^{1*}

(1. 温州大学生命与环境科学学院, 浙江 温州 325035; 2. 重庆大学环境与生态学院, 重庆 400044; 3. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘要: 该研究基于罗浮柿(*Diospyros morrisiana*)幼苗转录组数据, 利用 CandiSSR 软件开发了 1 620 对具有多态性的 EST-SSR 分子标记, 并基于随机筛选的 15 对 EST-SSR 分子标记对 8 个天然种源地的 157 株罗浮柿野生植株的遗传多样性进行评价。结果表明, 转录组数据集包含 100 285 条 Unigene 序列, 总长为 98 738 602 bp; 其中含有 34 121 个 SSR 位点, 发生频率为 34.02%, 约每 2.89 kb 含 1 个 SSR 位点。从中随机选择的 15 对具有良好多态性的 EST-SSR 引物, 多态性信息含量(PIC)为 0.244~0.877, 均值为 0.623, 其中 12 个位点具有高度多态性(PIC: 0.543~0.788)。基于 15 对 EST-SSR 引物的 8 个罗浮柿野生种群的观测杂合度为 0.503~0.650, 期望杂合度为 0.574~0.610, Shannon 多样性指数为 1.072~1.245, 表现出中等遗传多样性。罗浮柿野生种群的遗传变异绝大部分在种群内(83.29%), 种群间存在广泛的基因流, 遗传关系较近。该研究为开展罗浮柿的种质资源评价、遗传多样性分析和分子标记辅助育种提供技术支持和科学依据。

关键词: 罗浮柿; 引物开发; EST-SSR; 遗传结构; 遗传多样性

doi: 10.11926/jtsb.5003 CSTR: 32235.14.jtsb.5003

Development of EST-SSR Molecular Markers for *Diospyros morrisiana* and Assessment of Population Genetic Diversity

TANG Ruiyu^{1,2}, LI Xiang¹, HUANG Yulin¹, FENG Yu³, ZHANG Yonghua^{1*}

(1. College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China; 2. College of Environmental and Ecology, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: Based on the transcriptome data of *Diospyros morrisiana* seedlings, 1 620 pairs of polymorphic EST-SSR molecular markers were developed using CandiSSR software. The genetic diversity of 157 wild plants from 8 natural provenances was evaluated using 15 pairs of EST-SSR molecular markers randomly selected. The results showed that the transcriptome dataset contained 100 285 Unigene sequences with a total length of 98 738 602 bp; among them, 34 121 SSR loci were identified, with a frequency of 34.02%, approximately one SSR locus every 2.89 kb. The 15 pairs of EST-SSR primers with good polymorphism had a polymorphism information content (PIC) ranging from 0.244 to 0.877, with an average of 0.623, and 12 loci were highly polymorphic (PIC: 0.543~0.788). The observed heterozygosity of the 8 wild populations of *D. morrisiana* based on 15 pairs of EST-SSR primers ranged from 0.503 to 0.650, the expected heterozygosity ranged from 0.574 to 0.610, and the Shannon diversity index ranged from 1.072 to 1.245, indicating moderate genetic diversity. The majority of the genetic variation in the wild populations of *D. morrisiana* occurred within the populations (83.29%), and there was extensive gene flow among the populations, with a relatively close genetic relationship. These would provide technical support and

收稿日期: 2025-01-07 接受日期: 2025-05-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31800309); 温州市基础性公益科研项目(N20240014); 百山祖国家公园科学研究项目(2021KFLY06)资助
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31800309), the Project for Basic Research of Wenzhou (Grant No. N20240014), and the Project for Science Research of Baishanzu National Park (Grant No. 2021KFLY06).

作者简介: 汤瑞瑜(2000年生), 女, 在读硕士, 主要从事分子生态学、农业对生物多样性影响研究。E-mail: try@stu.cqu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangyuhua@wzu.edu.cn

scientific basis for the evaluation of germplasm resources, genetic diversity analysis, and molecular marker-assisted breeding of *D. morrisiana*.

Key words: *Diospyros morrisiana*; Primer development; EST-SSR; Genetic structure; Genetic diversity

罗浮柿(*Diospyros morrisiana*), 又名山柿、山埤柿, 为柿科(Ebenaceae)柿属的半常绿小乔木或乔木, 高可达 20 m。罗浮柿的叶薄革质, 长椭圆形; 小枝灰褐色, 具有纵裂皮孔; 花单性, 雄花下弯, 成聚伞花序, 具 4 裂花冠, 花冠壶形, 带白色; 雌花单生, 花萼浅杯状, 外面有伏柔毛, 退化雄蕊 6 枚, 子房球形; 果实球状, 成熟时呈黄色, 直径 1.5~2.2 cm; 种子近长圆形, 侧扁, 栗色; 花期 5 月—6 月, 果期 11 月^[1]。该物种主要分布于中国华南及华东地区, 在越南亦有零星分布。作为二倍体雌雄异株植物, 罗浮柿具有虫媒传粉特性及动物传播种子的繁殖生态适应策略, 与山柿(*D. glaucifolia*)和君迁子(*D. lotus*)亲缘关系最近^[2], 是柿子优良品种培育潜在的野生近缘种基因库^[3]。柿属多个物种在药用历史上被广泛用于疾病治疗。明代李时珍《本草纲目》载有“柿乃脾肺血分之果也”。现代药学研究表明, 作为柿原生种之一的罗浮柿, 其叶和茎皮可以入药, 味苦、涩, 性凉, 具有解毒消炎、收敛止泻的功效, 主治食物中毒、腹泻、痢疾、水火烫伤等^[4]。罗浮柿未成熟的果实虽味道苦涩不能食用, 但可以用来制作柿漆以作涂料用于防水。除此之外, 国内外学者研究发现罗浮柿还极具生态价值, 罗浮柿作为阳生性树种, 具有较强的水土保持功能, 并且其生态位宽度相对较大, 与之共存物种的种间竞争不激烈, 因而其所在群落常处于相对稳定的状态^[5], 在中国南亚热带森林群落演替的初期与中期常处于优势地位^[6]。尽管罗浮柿在药用、文化和生态方面具有显著重要性, 但目前对其分子遗传信息的了解仍然非常有限。在基础研究层面, 罗浮柿的种群遗传结构和遗传变异的研究缺乏, 限制了对该物种进化历史和适应性的全面理解。在应用层面, 由于缺乏有效的分子标记, 妨碍了对罗浮柿作为药用资源和生态修复潜力物种的品种鉴定以及对其分子辅助育种方案的制定和改良。

DNA 分子标记是基于 DNA 序列的遗传标记技术, 能够从基因组或转录组层面揭示物种的遗传多样性特征。传统 DNA 分子标记包括限制性片段长度多态性(length limited fragment polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性(random amplified

polymorphic DNA, RAPD)、序列特征化扩增区域(sequence characterized amplified region, SCAR)和微卫星标记(simple sequence repeat, SSR)等^[7]。随着高通量测序技术的快速发展, 单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)、基因分型测序(genotyping by sequencing, GBS)和靶向测序基因分型(genotyping by target sequencing, GBTS)等新型标记技术逐渐成为研究热点^[8-9]。然而, SSR 标记因其数量丰富、多态性高、共显性遗传和实验成本低等优势, 在非模式物种的遗传多样性分析和资源评价中仍具有不可替代性^[10]。特别是基于表达序列标签开发的 EST-SSR (expressed sequence tag-simple sequence repeat)标记, 因其来源于功能基因的编码区或调控区, 不仅能够反映物种的遗传变异特征, 还可通过与表型性状的关联分析揭示适应性进化机制, 近年来在濒危植物保护和野生近缘种基因挖掘中广泛应用^[11]。CandiSSR 是一款专门用于 SSR 标记开发的生物信息学工具, 它通过多样本同源 SSR 序列比对, 可自动筛选具有种内多态性和种间保守性的 SSR 位点, 避免传统微卫星开发中因重复单元相似导致多无效引物设计问题^[12]。

本研究聚焦于罗浮柿核微卫星多态性分子标记的开发及区域种群遗传多样性分析, 旨在通过对海南尖峰岭和广东黑石顶的罗浮柿幼苗进行转录组测序与组装, 并利用 CandiSSR 工具跨样本比对, 筛选同源且具多态性的 EST-SSR 位点, 并自动设计开发多态性引物。随后, 使用开发的引物对广东省多个自然野生罗浮柿种群进行基因分型, 通过遗传多样性分析(如等位基因数、杂合度、群体结构等指标)验证标记的有效性与实用性。最终, 从区域尺度解析罗浮柿种群的遗传多样性格局、种群亲缘关系及种质资源特征, 为其种质资源可持续利用和保护策略的制定提供理论支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

从海南尖峰岭和广东黑石顶采集的罗浮柿

(*Diospyros morrisiana*)种子,经萌发培养 3 周后各取大小和长势都相似的 1 株幼苗样本,进行无菌清洗后于-80 ℃ 储存,用于后续根茎叶 RNA 的混样提

取。另采集来自 8 个天然种源地的野生罗浮柿种群共 157 株的幼嫩叶片(表 1),置于分装袋中并加入变色硅胶,带回实验室用于 DNA 提取。

表 1 8 个罗浮柿种群的地理信息

Table 1 Location information for eight *Diospyros morrisiana* populations

种群 Population	采样地 Sampling location	纬度 (N) Latitude	经度 (E) Longitude	数量 Number
黑石顶 SD	广东省封开县黑石顶	23°46′	111°90′	22
白云山 BY	广东省广州市白云山	23°18′	113°30′	17
深圳罗屋田 LW	广东省深圳市罗屋田水库	22°65′	114°44′	14
七目嶂 QM	广东省梅州七目嶂	23°84′	115°38′	20
天堂顶 TT	广东省广州市从化区天堂顶	23°59′	113°76′	26
天井山 TJ	广东省韶关天井山自然保护区	24°92′	113°02′	24
古兜山 GD	广东省江门古兜山自然保护区	22°24′	112°95′	22
惠州白盆珠 HP	广东省惠州白盆珠保护区	23°06′	115°23′	12

1.2 DNA 提取及测序

将-80 ℃ 冻存的罗浮柿幼苗样品用干冰保藏后送至深圳华大基因测序公司,提取根、茎、叶混合样的 RNA,并构建 cDNA 文库,利用 Illumina Nova-Seq 平台进行转录组测序。另采用改良 CTAB 法提取罗浮柿 8 个种群样本总基因组 DNA,经检测合格后作为模板 DNA 用于核微卫星的 PCR 扩增。

1.3 SSR 位点分析及引物合成验证

RNA 测序原始数据(Raw reads)经质量过滤后,采用 Trinity 2.4.0 (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>)进行 *de novo* 组装,获得转录本序列;随后使用 Tgicl 软件^[13]进行聚类去冗余,构建 Unigene 序列。利用 CandiSSR (<https://github.com/xiaenhua/CandiSSR>)对 2 个罗浮柿幼苗的转录组 Unigene 序列进行 SSR 检测与比对,识别多态性 SSR (polymorphic simple sequence repeats, PolySSRs)。设置检测参数: 1~6 个重复单元的 SSR 最小重复次数分别为 10、6、5、5、5、5 (单核苷酸最少重复次数为 10 次,二核苷酸最少重复次数为 6 次,三、四、五、六核苷酸最少重复次数均为 5 次)。根据 SSR 位点两端的保守区域,利用 Primer 3.0^[14]设计引物用于后续验证。

从所设计的候选 EST-SSR 多态性引物中随机筛选 15 对(表 2 和附表 1),由北京擎科生物科技有限公司(杭州)合成。随后以 8 个罗浮柿种群的 157 个样本为材料进行 EST-SSR 的 PCR 扩增(附表 2 和附表 3),扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳及 BioRad Chemi-Doc 成像系统检测,扩增出目标条带的 PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司(杭州)进行荧光毛细管电

泳分型,通过设置内标 GS500 获得可读取片段长度的条带数据,作为后续遗传多样性分析依据。

1.4 SSR 引物多态性分析

利用软件 GeneMarker^[15]对毛细电泳数据进行读取,并人工校对,利用软件 FREENA^[16]对各 SSR 位点的无效等位基因频率进行检测。通过 Genepop 4.7 (<https://genepop.curtin.edu.au/>)检测各位点的 Hardy-Weinberg 平衡情况, Cervus 3.0^[17]用于评估多态性位点的观测杂合度(*Ho*)、期望杂合度(*He*)、多态性信息含量(*PIC*)和等位基因数(*Na*)等指标。进一步利用 GenALEx 6.5^[18]计算有效等位基因数(*Ne*)、Shannon 多样性指数(*I*),评价 EST-SSR 位点多态性,并分析种群的基本遗传多样性参数、种群间基因流(*Nm*)与遗传分化系数(*Fst*)。通过主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)与分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)揭示种群间及种群内的遗传变异结构。利用 STRUCTURE 2.3.4^[19]基于贝叶斯聚类算法(bayesian clustering algorithm)对 157 个罗浮柿个体进行群体结构分析,推断其遗传组成,并确定最佳聚类数(*K*)。基于 Nei's 遗传距离,利用 POPtree 软件^[20]采用邻接法(neighbour-joining, NJ)构建 8 个罗浮柿种群的系统发育邻接树(neighbor-joining tree, NJ 树)。

2 结果和分析

2.1 遗传多样性分析

2.1.1 EST-SSR 位点的分布与特点

在组装得到的 100 285 条 Unigenes 序列中,共

表 2 15 对 SSR 引物信息和遗传多样性参数

Table 2 Information and genetic diversity parameters of 15 SSR primers

序号 No.	引物 Primer	重复单元 Repeat motif	目标片段 大小 (bp) Expected size	引物序列 (5'~3') Primer sequence	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>I</i>	<i>PIC</i>
1	CPSSR_5	AAG	200	F: GCCACTGCCACCTGTATGTA R: TCAGGGTGCCACTTCATAGC	4	1.554	0.314	0.458	0.503	0.366
2	CPSSR_209	AGA	190	F: ACAATCGGACCGATACGCTT R: GAGAGAGGTGGACGTTTGAGA	14	6.001	0.769	0.890	1.922	0.877
3	CPSSR_282	AT	197	F: GGTGACGGGGTAGAGCTACA R: GGCGCATTTTGCAAGTCCTA	10	3.304	0.609	0.720	1.301	0.690
4	CPSSR_332	AT	166	F: GAGTTCGGCAAGCACACAAG R: ATGGCCAGATGAAGCATGCT	7	2.040	0.500	0.554	0.823	0.459
5	CPSSR_565	CGG	161	F: CACCGACTTCCTCCTCAACC R: GTGGAGCTCCGAGTCAAGTC	16	5.045	0.788	0.850	1.758	0.834
6	CPSSR_586	CT	172	F: ACCCATTCCTCAACTCTTGCT R: CCTCTTCCCTTGGCCAGA	15	4.722	0.782	0.855	1.690	0.836
7	CPSSR_610	CT	198	F: TGGCGGTGGTGGAATTGAAT R: ATTTGCCGACAGCTTGTCT	8	2.280	0.516	0.621	0.942	0.570
8	CPSSR_746	CTT	200	F: AAGCTGGTTGAAGGCACTGC R: GCAAGATCGATGGGAACTACC	6	1.397	0.178	0.252	0.470	0.244
9	CPSSR_798	GA	172	F: CGTGTGATTTCCGCAGAACC R: CCAACGCTCCTCTCCACAAT	7	2.751	0.677	0.731	1.144	0.693
10	CPSSR_900	GAA	192	F: CGAGAATCTGTGGGTGCGAA R: CGGACCTCCTTGAACACGTT	8	2.332	0.427	0.613	0.954	0.543
11	CPSSR_998	GCA	149	F: TATCGATGCCTTGTGCTGCT R: TTGCCCTTTCCCTCCACTTC	10	2.226	0.516	0.614	0.989	0.586
12	CPSSR_1296	TAA	133	F: CCGCCTCGTTACTCTCACTC R: GGGCCAGAGAGGAGATCCAT	9	3.813	0.643	0.774	1.472	0.740
13	CPSSR_1350	TC	183	F: GGGCGAGGAGGAAGAAGAAG R: TGCACATAGTCAGCAGCCAA	7	2.415	0.561	0.619	1.028	0.576
14	CPSSR_1439	TC	182	F: TTGACGACAGCACTGCAGAT R: TGC GTTAGAGGAAAGCTCTGG	10	2.843	0.580	0.722	1.191	0.677
15	CPSSR_1613	TTC	134	F: TGGCCTTTTGCTTCTCACT R: CCCTCCTTTTGCCATCGAGT	7	2.912	0.682	0.717	1.165	0.661
均值 Mean					9.2	3.042	0.569	0.666	1.157	0.623

Na: 等位基因数; *Ne*: 有效等位基因数; *Ho*: 观测杂合度; *He*: 期望杂合度; *I*: 香农多样性指数; *PIC*: 多态性信息含量。下同

Na: Number of alleles; *Ne*: Effective number of alleles; *Ho*: Observed heterozygosity; *He*: Expected heterozygosity; *I*: Shannon's information index; *PIC*: Polymorphism information content. The same below

有 24 028 条序列检测到 SSR 位点, 共计 34 121 个 SSR 位点。罗浮柿转录组中 SSR 出现的频率为 34.02%, 分布密度约为每 2.89 kb 有 1 个 SSR。从重复单元类型来看, 以二核苷酸为主(18 853, 55.25%), 其次是三核苷酸(6 977, 20.45%)和单核苷酸(6 336, 18.57%); 四、五、六核苷酸类型较少, 分别为 646 (1.89%)、642 (1.88%)和 667 (1.95%), 合计占比 5.73% (图 1: A, B)。就重复次数和长度分布而言, 单核苷酸型 SSR 的重复次数均大于 9 次, 其余类型呈现出重复次数递减的趋势。其中, 二核苷酸中以重复 6 次最多(12.07%), 三核苷酸和四核苷酸以重复 5 次最多(分别为 9.7%、1.34%), 五核苷酸和六核苷酸则以重复 4 次最多(1.46%、1.70%)。

在全部 34 121 个 EST-SSR 位点中, 二核苷酸中以 AG/CT (13 398, 39.27%)最常见, 其次是 AT/AT (3 632, 10.64%)、AC/GT (1 745, 5.11%)和 CG/CG (78,

0.23%)。三核苷酸中以 AAG/CTT (2 682, 7.70%)为主, 其次是 AGG/CCT (814, 2.39%)、AGC/CTG (786, 2.30%)、ATC/ATG (654, 1.92%)、CCG/CGG (611, 1.79%)、AAT/ATT (507, 1.49%)、ACC/GGT (330, 0.97%)、AAC/GTT (260, 0.76%)、ACG/CGT (210, 0.62%)和 ACT/AGT (123, 0.36%) (图 1: C)。上述 14 种重复单元类型占总数的 75.7%, 其余类型占 24.3%。

2.1.2 SSR 位点多态性

15 对多态性 EST-SSR 引物中(表 2)总共检测到了 138 个等位基因, *Na* 为 4~16 个, 平均 9.2 个; *Ne* 为 1.397~6.001, 平均 3.042 个。 *Ho* 为 0.178~0.788, 平均为 0.569; *He* 为 0.252~0.890, 平均为 0.666。 *I* 为 0.470~1.922, 平均为 1.157; *PIC* 为 0.244~0.877, 平均为 0.623; 除 CPSSR_5 (*PIC*=0.366)、CPSSR_332 (*PIC*=0.459)和 CPSSR_746 (*PIC*=0.244), 其余引物的 *PIC* 均在 0.500 以上, 表现为高多态性。

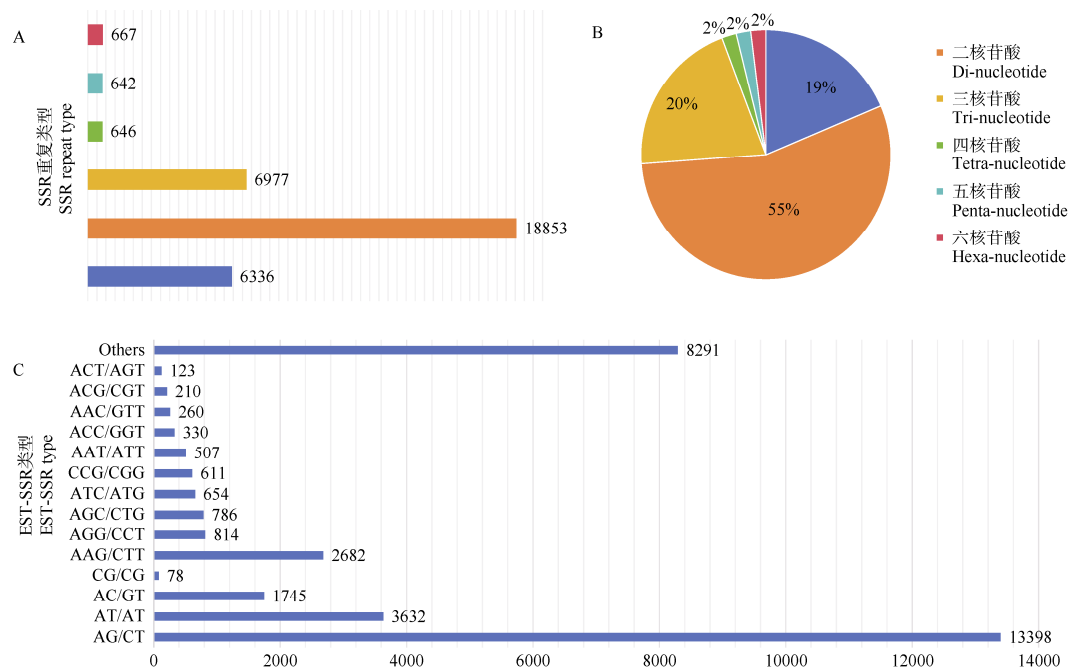


图 1 罗浮柿转录组中检测到的简单重复序列类型。A: SSR 的数量; B: SSR 的比例; C: EST-SSR 数量。
Fig. 1 Simple sequence repeat types detected in the transcriptome of *Diospyros morrisiana*. A: Number of SSRs; B: Proportion of SSRs; C: Number of EST-SSRs.

2.2 遗传分化分析

2.2.1 群体遗传多样性分析

基于 15 对多态性 EST-SSR 引物, 对罗浮柿 8 个自然种群进行遗传多样性分析(表 3)。各种群平均可扩增等位基因数为 4.858 个。 N_e 反映了种群内部的遗传多样性水平, 各种群间 N_e 存在差异, 为 2.755 (BY)~3.423 (QM), 平均为 3.043。 H_o 为 0.503 (TJ)~0.650 (QM), 平均为 0.571; H_e 为 0.574 (BY)~0.610 (QM), 平均为 0.590。 I 为 1.072 (BY)~1.245 (QM), 平均为 1.157。 F 为 -0.060 (QM)~0.135 (TJ), 平均为 0.042。总体而言, QM 种群在 N_e 、 H_e 和 I 等多指标上表现突出, 显示其遗传多样性最高, 遗传变异程度最大; 其中 QM 的 H_o 最高, 其次为 SD, 最低为 TJ。

BY 的 N_e 与 N_a 最接近, 提示其等位基因分布较为均衡; 而 GD 种群则表现出较高的等位基因, 但有效等位基因相对较低, 表明部分等位基因频率较低, 贡献有限。

2.2.2 种群遗传分化分析和 AMOVA 分析

8 个罗浮柿种群的基因流 N_m 为 1.32~4.96, 遗传分化系数 F_{ST} 为 0.037~0.108 (附表 4)。HP 和 GD 种群均与其他种群展现中度遗传分化($0.058 \leq F_{ST} \leq 0.108$); LW 除了与 QM 的遗传分化系数低于 0.05 ($F_{ST}=0.043$)外, 与其他 6 个种群均展现出中度遗传分化($0.064 \leq F_{ST} \leq 0.100$)。TJ 和 TT 的种群内遗传分化系数最小, 为 0.037; GD 和 SD 的种群内遗传分化系数最大, 为 0.108。3 个种群对 SD 和 TT、

表 3 基于 15 个 EST-SSR 位点的 8 个罗浮柿种群遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of the 8 populations of <i>Diospyros morrisiana</i> based on 15 EST-SSRs						
种群 Population	N_a	N_e	H_o	H_e	I	固定指数 Fixed index (F)
黑石顶 SD	4.933	3.124	0.601	0.596	1.162	-0.021
白云山 BY	4.133	2.755	0.592	0.574	1.072	-0.008
深圳罗屋田 LW	4.600	3.103	0.590	0.592	1.145	0.051
七目嶂 QM	5.533	3.423	0.650	0.610	1.245	-0.060
天堂顶 TT	5.333	3.201	0.574	0.609	1.218	0.048
天井山 TJ	4.600	2.888	0.503	0.579	1.128	0.135
古兜山 GD	5.400	3.039	0.512	0.581	1.193	0.133
惠州白盆珠 HP	4.333	2.808	0.546	0.576	1.090	0.060
均值 Mean	4.858	3.043	0.571	0.590	1.157	0.042

LW 和 QM、TJ 和 TT，显示出较高的基因流和较低的遗传分化系数，表明这些种群之间有较频繁的基因交流与较小的遗传分化。

AMOVA 方差分析表明，在显著性水平 $P<0.001$

下，8 个罗浮柿种群间差异仅贡献了 16.71%，而种群内差异贡献了 83.29%，说明种群遗传多样性的差异主要来源于各罗浮柿种群内，种群间具有相对较低程度的遗传分化，种群间遗传结构弱，遗传关系近(表 4)。

表 4 8 个罗浮柿种群的 AMOVA 分子方差变异分析

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of 8 *Diospyros morrisiana* populations

变异来源 (SV)	自由度 (Df)	离差平方和 (SS)	均方 (MS)	变异组分 (VC)	变异比例 % of total variation	P
Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	Variance component		
种群间 Among populations	7	338.824	48.403	1.979	16.71%	<0.001
种群内 Within populations	149	1 470.195	9.867	9.986	83.29%	<0.001
总和 Total	156	1 809.019	—	11.846	100.00%	—

2.3 遗传结构分析

2.3.1 种群遗传结构分析

用 STRUCTURE 软件中基于贝叶斯聚类方法对罗浮柿种群的遗传结构进行初步分析(图 2: A)，根据 Evanno 等^[19]提出的方法确定最佳分组 K 值， ΔK 在 $K=2$ 时达到最高，从而确定 8 个罗浮柿种群最佳分组数为 2，表明来自 8 个罗浮柿种群的 157 株在遗传上归为 2 个基因池，可将 8 个罗浮柿种群聚为 2 个遗传组(图 2: B)。种群 SD、TJ 和 TT 的遗传背景较

为相似，主要来自蓝色基因池；种群 GD、QM、LW 和 HP 的遗传背景较为相似，主要来自橘色基因池，而种群 BY 存在来自 2 个基因池的遗传混合。

2.3.2 主坐标分析(PCoA)

主坐标分析(PCoA)大致将 8 个罗浮柿种群分为 2 个群组，群组 A (红色)包括 GD、QM、LW、HP 等 4 个种群，群组 B (蓝色)包括 SD、TJ、TT 等 3 个种群，而 BY 种群的个体分散在群组 A、B 中，但大多数 BY 种群的个体分布在群组 A 中(图 2: C)。

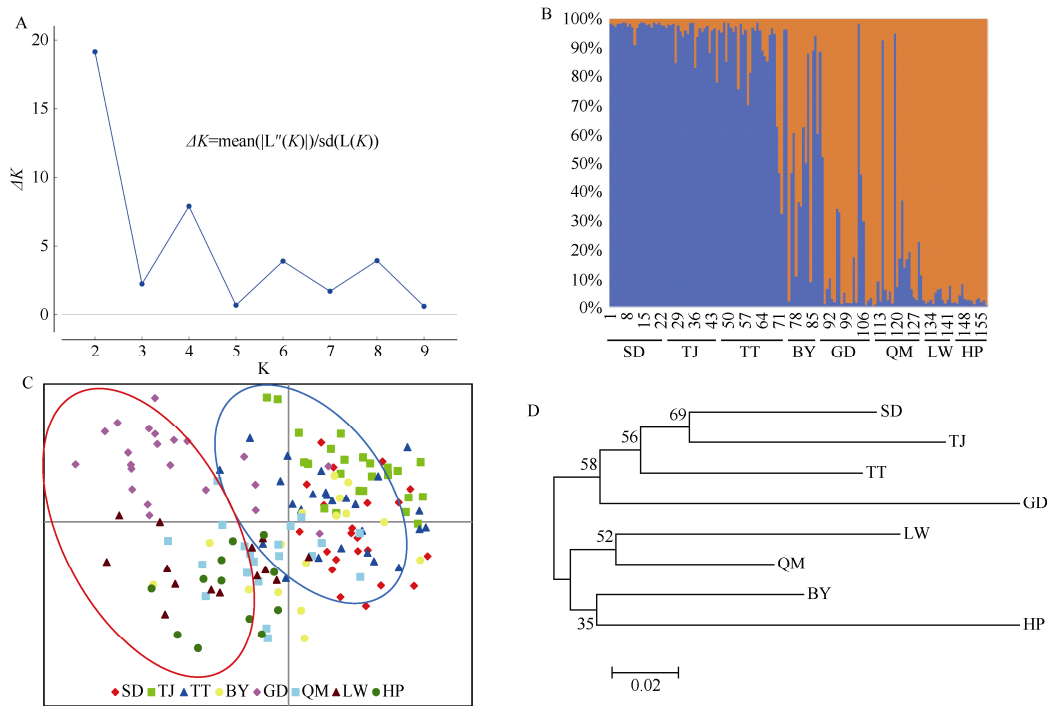


图 2 8 个罗浮柿种群的遗传结构分析。A: 基于 $\Delta K=\text{mean}(|L^*(K)|)/\text{sd}[L(K)]$ 准则选择 K 值; B: STRUCTURE 聚类分析($K=2$); C: PCoA 主坐标分析; D: 基于 Nei's 遗传距离的 NJ 聚类分析。SD、TJ、TT、BY、GD、QM、LW、HP 见表 1。

Fig. 2 Genetic structure analysis of 8 populations of *Diospyros morrisiana*. A: Choose K value based on criterion of $\Delta K=\text{mean}(|L^*(K)|)/\text{sd}[L(K)]$; B: STRUCTURE clustering analysis ($K=2$); C: PCoA analysis; D: NJ cluster analysis based on Nei's genetic distance. SD, TJ, TT, BY, GD, QM, LW, HP see Table 1.

主坐标分析(PCoA)中个体位置越接近说明亲缘关系越近,8个罗浮柿种群的个体间存在相互交叉,说明来自8个种群的个体间可能存在较近的亲缘关系。主坐标分析结果与遗传结构分析的结果一致。

2.3.3 聚类分析

基于NJ聚类分析构建的系统发育NJ树表明,8个罗浮柿自然种群在拓扑结构中形成2个遗传支,其节点自举支持率为58%(图2:D)。尽管支持率处于中等水平(通常认为70%为强支持),但分化模式与STRUCTURE遗传结构分析及PCoA分组结果高度一致。第1个遗传支包括SD、TJ、TT、GD等4个种群,第2个遗传支包括深LW、QM、BY、HP等4个种群。

3 讨论和结论

本研究通过转录测序在罗浮柿中共鉴定出34121个SSR位点,分布频率达34.02%(平均每2.89 kb含1个SSR)。不同植物的重复类型存在差异,但以二核苷酸和三核苷酸重复类型为主^[21]。本研究中罗浮柿AG/CT的优势分布与火龙果(*Hylocereus undulatus*)^[22]的研究结果高度一致,而AAG/CTT的主导地位则与油茶(*Camellia oleifera*)^[23]的SSR特征吻合,进一步验证了双子叶植物中AG/CT与AAG/CTT重复基序的协同进化规律^[24]。EST-SSR频率的物种差异可能源于物种、转录组数据来源时期、转录组来源器官、序列大小、SSR搜索参数的异质性^[25]。结合柿属植物全球190种和中国65种的物种多样性背景^[26],本研究开发的EST-SSR标记为属内种间的通用性提供了重要资源^[27],其跨物种扩增潜力可通过近缘种验证实验进一步挖掘^[28]。鉴于AG/CT与AAG/CTT重复基序在基因调控区的富集特征,未来可结合甲基化组学与转录组共定位分析,阐明这些SSR位点通过染色质修饰调控关键基因(如叶片表型变化^[29])表达的分子通路,进而揭示柿属植物适应性进化中微卫星的动态演化机制。

本研究基于EST-SSR标记揭示了罗浮柿自然种群较高的遗传多样性水平,其多态性检测效能显著优于SCoT标记^[30]和IRAP标记^[31],可能与该标记直接反映功能基因区遗传变异多态性特征相关。本研究种群间频繁的基因交流有效抑制了遗传漂变引起的遗传变异^[32],这与雌雄异株的繁育系统及动物媒介传播花粉和果实的繁殖策略密

切相关——异交机制促进局部遗传重组,长距离传播扩展基因交流范围;而幼苗阶段性二态性(如雄株幼苗一般比雌性幼苗拥有更高的生物量和更大的叶面积)^[33]可能通过性别差异化资源分配增强种群在异质生境中的适合度,以此增强种群遗传多样性^[34]。相较于韩振诚等^[35]采用含有栽培种的研究体系(平均 $N_m=3.703$),本研究的天然种群间呈现较低基因流(平均 $N_m=2.521$),自然扩散对于植物种群遗传结构的影响可能弱于有目的人为引种传播。值得注意的是,尽管现有数据揭示了罗浮柿遗传多样性维持的潜在机制,但其性别分化调控、雌雄异株繁殖策略与生境异质性的互作关系仍需通过分子生态学实验予以验证,这对精准制定该物种的适应性管理策略具有重要意义。

8个罗浮柿种群间的平均遗传分化系数(F_{ST})为0.07,表明种群间的遗传分化保持在中等程度^[36]。AMOVA分析表明,83.29%的遗传变异发生在种群内,而种群间遗传变异仅占16.71%。这与罗浮柿的虫媒传粉特性及通过动物、河流等途径实现的种子远距离传播有关,有效促进了天然种群间的基因交流;这与Petit等^[37]提出的“跨景观基因流可削弱种群遗传分化”的结论形成呼应,并与中国亚热带常绿阔叶林树种的典型遗传结构特征一致^[38]。其次,本研究的采集范围局限于广东地区,相对较小的地理尺度可能进一步降低了种群间的遗传分化,由于区域内环境异质性较低,种群间基因交流更为频繁,遗传分化程度因此趋于缓和。

本研究通过群体遗传结构、主坐标分析与邻接聚类分析表明,罗浮柿8个种群分化为2大遗传群组,但存在种群特异性差异。BY种群在Structure和PCoA中呈现混合遗传特征,同时在NJ树中占据两遗传分支过渡节点,表明BY种群作为基因流的关键节点,在生态扩散廊道中长期介导广东地区采样罗浮柿种群的基因交流,这可能源于历史扩张形成的杂交带、当代不对称基因流或近期人为干扰(如栖息地片段化导致的边缘种群接触)。种群遗传分异与地理分布的相关性反映局域适应潜力(如生态型分化或地理隔离),而频繁的基因交流(如花粉流和种子流)维系了遗传的连通性,增强了物种环境适应弹性^[39]。保护实践中,建议将两大群组作为独立管理单元,同时通过生境恢复增强BY种群的景观连通性,以维护物种进化潜力、保障遗传多样性。本研究结果为解析物种进化与基因流互作机制提

供了多维证据。

参考文献

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Editta. Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 60(1) [M]. Beijing: Science Press, 1987: 117. [《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志, 第 60 卷第 1 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 117.]
- [2] HUANG Y, MA Q, SUN J, et al. Comparative analysis of *Diospyros* (Ebenaceae) plastomes: Insights into genomic features, mutational hotspots, and adaptive evolution [J]. *Ecol Evol*, 2023, 13(7): e10301. doi: 10.1002/ece3.10301.
- [3] ZHENG D S, LIU X, LI Y. Cultivated plants originated in China [J]. *J Plant Genet Resour*, 2012, 13(1): 1–10. [郑殿升, 刘旭, 黎裕. 起源于中国的栽培植物 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(1): 1–10. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2012.01.002.]
- [4] GAO H, WANG X. A medicinal food for viral diarrhea: CN, 2014 10308768.5 [P]. 2014-10-01. [高宏, 王翔. 一种用于病毒性腹泻的药用食品: 中国, 201410308768.5 [P]. 2014-10-01.]
- [5] YANG X D, CHEN L B, ZENG X X, et al. Niche characteristics of dominant species of forest community in Qingyunshan Natural Reserve, Wengyuan, Guangdong Province [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2020, 28(6): 565–573. [杨新东, 陈流保, 曾献兴, 等. 广东翁源青山自然保护区森林群落优势树种的生态位特征 [J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(6): 565–573. doi: 10.11926/jtsb.4214.]
- [6] LIANG X, LIU P, XU Z C. Study on stand structure and undergrowth species diversity of urban forest in Guangzhou [J]. *J SW For Univ*, 2015, 35(2): 37–42. [梁璇, 刘萍, 徐正春. 广州城市森林林分结构及林下植物多样性研究 [J]. 西南林业大学学报, 2015, 35(2): 37–42. doi: 10.11929/j.issn.2095-1914.2015.02.006.]
- [7] SONG X Y, GAN D F, YANG L, et al. Research progress in applying molecular marker technology to identify cauliflower varieties [J]. *China Veg*, 2022(12): 30–37. [宋晓玉, 甘德芳, 杨琳, 等. 分子标记技术在花椰菜品种鉴定上的应用研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2022(12): 30–37. doi: 10.19928/j.cnki.1000-6346.2022.0063.]
- [8] KARBSTEIN K, KÖSTERS L, HODAČ L, et al. Species delimitation 4.0: Integrative taxonomy meets artificial intelligence [J]. *Trends Ecol Evol*, 2024, 39(8): 771–784. doi: 10.1016/j.tree.2023.11.002.
- [9] JIANG C G, SHI H M, WANG H W, et al. Phenotype analysis and gene mapping of small kernel 7 (*smk7*) mutant in maize [J]. *Acta Agron Sin*, 2021, 47(2): 285–293. [蒋成功, 石慧敏, 王红武, 等. 玉米籽粒突变体 *smk7* 的表型分析和基因定位 [J]. 作物学报, 2021, 47(2): 285–293. doi: 10.3724/SP.J.1006.2021.03015.]
- [10] LARRANAGA N, VAN ZONNEVELD M, HORMAZA J I. Holocene land and sea-trade routes explain complex patterns of pre-columbian crop dispersion [J]. *New Phytol*, 2021, 229(3): 1768–1781. doi: 10.1111/nph.16936.
- [11] LI T Q, LIU X F, LI Z H, et al. Development of novel EST-SSR markers for *Rhododendron longipedicellatum* (Ericaceae) and cross-amplification in two congeners [J]. *Appl Plant Sci*, 2018, 6(6): e01162. doi: 10.1002/aps3.1162.
- [12] XIA E H, YAO Q Y, ZHANG H B, et al. CandiSSR: An efficient pipeline used for identifying candidate polymorphic SSRs based on multiple assembled sequences [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 6: 1171. doi: 10.3389/fpls.2015.01171.
- [13] PERTEA G, HUANG X Q, LIANG F, et al. TIGR gene indices clustering tools (TGICL): A software system for fast clustering of large EST datasets [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(5): 651–652. doi: 10.1093/bioinformatics/btg034.
- [14] UNTERGASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, et al. Primer3: New capabilities and interfaces [J]. *Nucl Acids Res*, 2012, 40(15): e115. doi: 10.1093/nar/gks596.
- [15] WANG F G, LI X, YANG Y, et al. SSR Analyser: A special software suitable for SSR fingerprinting of plant varieties [J]. *Sci Agric Sin*, 2018, 51(12): 2248–2262. [王风格, 李欣, 杨扬, 等. 植物品种 SSR 指纹分析专用软件 SSR Analyser 的研发 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(12): 2248–2262. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2018.12.003.]
- [16] CHAPUIS M P, ESTOUP A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(3): 621–631. doi: 10.1093/molbev/msl191.
- [17] KALINOWSKI S T, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. *Mol Ecol*, 2007, 16(5): 1099–1106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x.
- [18] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAIEx 6.5: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research: An update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- [19] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- [20] TAKEZAKI N, NEI M, TAMURA K. POPTREEW: Web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities [J]. *Mol Biol Evol*, 2014, 31(6): 1622–1624. doi: 10.1093/molbev/msu093.
- [21] LA ROTA M, KANTETY R V, YU J K, et al. Nonrandom distribution

- and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley [J]. *BMC Genom*, 2005, 6(1): 23. doi: 10.1186/1471-2164-6-23.
- [22] YANG S M, QIAO G, MAO Y Y, et al. SSR markers development and genetic relationship analysis of germplasm based on transcriptomic sequencing of pitaya [J]. *Mol Plant Breed*, 2018, 16(24): 8096–8110. [杨仕美, 乔光, 毛永亚, 等. 基于火龙果转录组测序的 SSR 标记开发及种质亲缘关系分析 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(24): 8096–8110. doi: 10.13271/j.mpb.016.008096.]
- [23] LI H B, WANG S, DING H M, et al. Development of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Camellia oleifera* [J]. *Plant Physiol J*, 2017, 53(7): 1267–1278. [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. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2017.0146.]
- [24] MORGANTE M, HANAFEY M, POWELL W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes [J]. *Nat Genet*, 2002, 30(2): 194–200. doi: 10.1038/ng822.
- [25] ZHANG H L, CONG R C, WANG M L, et al. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Tagetes erecta* [J]. *Acta Hort Sin*, 2018, 45(1): 159–167. [张华丽, 丛日晨, 王茂良, 等. 基于万寿菊转录组测序的 SSR 标记开发 [J]. *园艺学报*, 2018, 45(1): 159–167. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2017-0166.]
- [26] TANG D L, ZHANG Q L, XU L Q, et al. Number of species and geographical distribution of *Diospyros* L. (Ebenaceae) in China [J]. *Hort Plant J*, 2019, 5(2): 59–69. doi: 10.1016/j.hpj.2018.10.003.
- [27] LIANG X Y, LIU J C, BAI T D, et al. EST-SSR marker development of *Eucalyptus cloeziana* and their applicability in genetic diversity and cross-species transferability [J/OL]. *Mol Plant Breed*, [2022-03-07]. [梁馨元, 刘金炽, 白天道, 等. 大花序桉 EST-SSR 标记开发及其种间通用性评价 [J/OL]. *分子植物育种*, [2022-03-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220303.2202.053.html>.]
- [28] WANG L Y, LI H W, SUO Y J, et al. Development of EST-SSR markers and their application in the genetic diversity of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) [J]. *Trees*, 2021, 35(1): 121–133. doi: 10.1007/s00468-020-02024-4.
- [29] GAO H, XIAO G A, BAO Y, et al. Integrative DNA methylome and transcriptome analysis illuminate leaf phenotype alterations in tetraploid citrus [J]. *Hort Adv*, 2024, 2(1): 28. doi: 10.1007/s44281-024-00051-6.
- [30] GUAN C F, HU C Q, WANG M K, et al. Genetic diversity analysis of persimmon germplasm resources in Shaanxi Province [J]. *J Plant Genet Resour*, 2019, 20(5): 1340–1348. [关长飞, 胡超琼, 王孟珂, 等. 陕西省柿种质资源遗传多样性分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(5): 1340–1348. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.20181213001.]
- [31] ZEGN M, DU X Y, WU M H, et al. Genetic diversity analysis of *Diospyros* spp. germplasm resources in Jiangxi by using IRAP molecular marker [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 2017, 29(6): 29–34. [曾明, 杜晓云, 吴美华, 等. 江西柿属种质资源遗传多样性的 IRAP 标记分析 [J]. *江西农业学报*, 2017, 29(6): 29–34. doi: 10.19386/j.cnki.jxnyxb.2017.06.07.]
- [32] LENORMAND T. Gene flow and the limits to natural selection [J]. *Trends Ecol Evol*, 2002, 17(4): 183–189. doi: 10.1016/S0169-5347(02)02497-7.
- [33] ZHANG Y H, LIN W, CHU C J, et al. Sex-specific outbreeding advantages and sexual dimorphism in the seedlings of dioecious trees [J]. *Am J Bot*, 2023, 110(4): e16153. doi: 10.1002/AJB2.16153.
- [34] ZENG Z H, YU Q, FENG Q H, et al. Functional consequences of temporal reversal of height dimorphism for pollen and seed dispersal in a dioecious plant [J]. *J Syst Evol*, 2024, 62(3): 438–448. doi: 10.1111/jse.12960.
- [35] HAN Z C, PAN X J, AN H M, et al. Genetic diversity of *Diospyros* Linn. in Guizhou based on SRAP [J]. *J Fruit Sci*, 2015, 32(5): 751–762. [韩振诚, 潘学军, 安华明, 等. 贵州柿属植物种质资源遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. *果树学报*, 2015, 32(5): 751–762. doi: 10.13925/j.cnki.gsxb.20150171.]
- [36] CURNOW R N, WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations, volume 4: Variability within and among natural populations [J]. *Biometrics*, 1979, 35(1): 359. doi: 10.2307/2529965.
- [37] PETIT R J, AGUINAGALDE I, DE BEAULIEU J L, et al. Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity [J]. *Science*, 2003, 300(5625): 1563–1565. doi: 10.1126/science.1083264.
- [38] MAO L H, ZHOU X L, FANG Y M. Genetic diversity and population structure of *Castanopsis eyrei* based on simple sequence repeat markers [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2): gmr.15028256. doi: 10.4238/gmr.15028256.
- [39] SORK V L. Gene flow and natural selection shape spatial patterns of genes in tree populations: Implications for evolutionary processes and applications [J]. *Evol Appl*, 2016, 9(1): 291–310. doi: 10.1111/eva.12316.

附表 1 15 对 SSR 原始序列

附表 2 PCR 反应体系

附表 3 PCR 扩增仪程序设置

附表 4 罗浮柿种群间的遗传分化系数(F_{st})和基因流(N_m)

http://jtsb.ijournals.cn/ajax/common/download_attache_file.aspx?seq_id=20250607161642001&file_no