

# 药用植物猴耳环的转录组测序分析\*

谭志强<sup>1</sup> 黄炬峰<sup>1</sup> 李福明<sup>1</sup> 邓乐平<sup>1</sup> 毛积鹏<sup>1,2</sup>

(1. 台山市红岭种子园, 广东 江门 529223; 2. 华南农业大学 林学与风景园林学院 / 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642)

**摘要** 利用 Illumina HiSeq 4 000 对猴耳环 *Pithecellobium clypearia* 的主要药用部位嫩枝和叶进行了转录组测序分析。共获得 24 748 936 个高质量的 reads, 拼接组装到 63 299 个 Unigenes, 平均长度为 1 117 bp。其中 26 101 个 Unigenes 在 Nr、UniProt、KOG、GO 和 KEGG 数据库获得注释信息。鉴定到了 192 个和黄酮类化合物生物合成相关的 Unigenes, 主要涉及了苯丙烷、黄酮、异黄酮、黄酮醇和花青素等化合物的生物合成通路。此外还鉴定到了 136 个和萜类化合物生物合成相关的 Unigenes, 主要参与了萜类骨架、单萜、倍半萜、二萜和四萜等化合物的生物合成通路。最后在 15 740 个 Unigenes 中检测到 45 573 个 SSR 标记, 出现频率为 33.84%。综合表明猴耳环嫩枝和叶的转录组测序结果可靠, SSR 标记丰度高。

**关键词** 猴耳环; 转录组测序; 萜类化合物; 黄酮类化合物; SSR 标记

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2021) 03-0015-07

## Transcriptome Sequencing and Analysis of the Medicinal Plant *Pithecellobium clypearia*

TAN Zhiqiang<sup>1</sup> HUANG Jufeng<sup>1</sup> LI Fuming<sup>1</sup>  
DENG Leping<sup>1</sup> MAO Jipeng<sup>1,2</sup>

(1. Taishan Hongling Seed Orchard, Jiangmen, Guangdong 529223, China; 2. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University/Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

**Abstract** Transcriptome sequencing was performed on the twigs and leaves of *Pithecellobium clypearia* based on Illumina HiSeq 4 000 platform. Total of 24 748 936 high quality reads were obtained by RNA-Seq to the mixed samples of twigs and leaf tissues of *P. clypearia*, and assembled into 63 299 unigenes with an average length of 1 117 bp. 26 101 unigenes were annotated in five databases. 192 unigenes related to the flavonoids were identified, mainly involved in the biosynthesis pathways of flavones, isoflavones, flavonols, anthocyanins and phenylpropane. Moreover, 136 unigenes related to the terpenoids were identified, mainly participated in the biosynthesis pathways of terpenoid backbone, monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes and triterpenes. Finally, 45 573 SSR markers were detected in 15 740 unigenes, with a frequency of 33.84%. These results showed that the RNA-Seq results of twigs and leaves of *P. clypearia* were reliable, and rich in SSR markers.

**Key words** *Pithecellobium clypearia*; transcriptome; terpenoids; flavonoids; SSR markers

\* 基金项目: 中央财政林业科技推广示范项目 ([2018] GDTK -14 号, 2018-2021)。

第一作者: 谭志强 (1984—), 男, 工程师, 主要从事林木遗传育种工作, E-mail: 448270073@qq.com。

通信作者: 毛积鹏 (1990—), 男, 博士后, 主要从事植物生理与分子生物学研究, E-mail: 1083635973@qq.com。

猴耳环 *Pithecellobium chypearia* 是我国南方一种重要的药用植物,具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗流感、抗肿瘤、降血糖、降血脂和免疫等作用<sup>[1-8]</sup>。特别是其高效的抗炎作用在临床上被广泛应用于呼吸道感染、咽喉炎、扁桃体炎和肠胃炎等炎症的治疗。目前已研发出了猴耳环消炎片和猴耳环消炎胶囊等产品<sup>[9-11]</sup>。猴耳环的主要药用部位为干燥的嫩枝和叶。近年来相关学者利用高效液相色谱 (HPLC) 和色谱-质谱联用 (LC-MS) 等技术对猴耳环的主要活性成分进行了测定。结果表明:猴耳环的主要活性成分为没食子酸、槲皮素、槲皮苷、杨梅苷、吡喃鼠李糖苷和表没食子儿茶素等黄酮类化合物<sup>[12]</sup>。虽然到目前为止已经开展了许多关于猴耳环的研究,但主要集中于其生长特性研究、繁殖技术优化和活性成分的鉴定等方面<sup>[13-15]</sup>,其转录组测序信息尚未见报道。

转录组测序能在缺乏基因组信息的条件下,有效地挖掘功能基因并揭示其生物学特性和基因的内在关系。此外,转录组测序获得的 EST-SSR 分子标记也是开展群体遗传多样性分析和分子育种的重要基础。目前,如风丹 *Paeonia suffruticosa* cv. Feng Dan<sup>[16]</sup>、半枫荷 *Semiliquidambar cathayensis*<sup>[17]</sup> 和罗布麻 *Apocynum venetum*<sup>[18]</sup> 等药用植物,大豆 *Glycine max*<sup>[19]</sup>、野生大豆 *Glycine soja*<sup>[20]</sup> 和蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula*<sup>[21]</sup> 等豆科植物已经完成了转录组测序分析,并鉴定出了一批和萜类、黄酮类和生物碱类等主要活性成分生物合成与代谢相关的候选基因。本研究利用 Illumina HiSeq 4 000 高通量测序平台对猴耳环主要药用部位嫩枝和叶的混合样本进行转录组测序分析。旨在建立猴耳环的转录组数据库,为猴耳环群体遗传多样性分析、功能基因的挖掘和主要活性成分生物合成与代谢调控分子机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

猴耳环材料来自于广东省台山市红岭种子园。于2019年9月份取样,分别采取了2 a 生且生长旺盛的猴耳环植株的嫩枝和叶片组织,剪碎后放入50 mL 无菌的离心管中,随即放入液氮中,-80 °C 保存至 RNA 的提取。

### 1.2 猴耳环总 RNA 提取

猴耳环嫩枝和叶片样本总 RNA 的提取根据自

我改良的 CTAB 法<sup>[22]</sup>进行,具体方法步骤如下:

① 将约 150 mg 的猴耳环样本组织放入已经灭菌的研钵中,在液氮下快速充分研磨成粉末状,随后立即转移到 1.5 mL 灭菌的离心管中;② 往离心管中加入 1 mL 自配的 CTAB 裂解液 (100 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB, 2% PVP, 0.5 g/L 亚精胺, pH=8) 和 20  $\mu$ L 的  $\beta$ -巯基乙醇,充分混匀后在 65 °C 的金属浴中温浴 20 min,期间混匀 2~3 次;③ 温浴后,4 °C 条件下,12 000 rpm 离心 8 min,取上清液转移至另一个新的 1.5 mL 离心管中 (尽量避免吸取得到沉淀物,可放弃一小部分上清不取);④ 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1),充分混匀后,4 °C 条件下,12 000 rpm 离心 5 min,收集上清液于另一个新的 1.5 mL 离心管;⑤ 再次加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1),充分混匀后,4 °C 条件下,12 000 rpm 离心 5 min,收集上清液并加入 1/4 体积的 10 M LiCl 溶液,于 4 °C 条件下静置 5~6 h;⑥ 随后在 4 °C 条件下,12 000 rpm 离心 10 min,弃去上清液;⑦ 沉淀物先后用 500 mL 已提前 -20 °C 预冷的 75% 乙醇和无水乙醇洗涤两次,4 °C 条件下,12 000 rpm 离心 5 min,弃上清液后置于室温条件下干燥 5 min;⑧ 干燥后,加入 30~50  $\mu$ L 的 DEPC 水溶解,随后进行总 RNA 浓度、纯度和完整性的检测,符合要求的总 RNA 样品在 -80 °C 条件下保存至 cDNA 文库的构建。

### 1.3 cDNA 文库构建、测序及组装

cDNA 文库的建库流程和具体的操作步骤参考 Foucart 等<sup>[23]</sup>的方法执行,使用广州瑞科基因科技有限公司 (Science Corporation of Gene) 的 Illumina HiSeq 4 000 测序平台对所构建的 cDNA 文库进行双末端测序。利用 fastx\_toolkit 软件中的 fastx\_clipper 工具和 fastq\_quality\_filter 工具去除测序接头盒低质量的 reads 后,根据 Hass 等<sup>[24]</sup>的 Trinity 方法进行高质量 reads 的组装。

### 1.4 Unigenes 序列比对和功能注释

利用 BLASTn 软件对所组装获得的 unigenes 在 Uniprot、Nr、KEGG、KOG 和 GO 公共数据库中进行同源序列比对分析,其中 E 值设置为小于  $10^{-5}$ 。获得与序列相似度最高的蛋白质进行猴耳环 unigene 的功能注释。利用 Blast2GO 软件<sup>[25]</sup>将在 Nr 数据库中获得注释的 Unigene 进行 GO 注释,并用 WEGO 软件<sup>[26]</sup>对其进行 GO 分类功能统

计。使用 BLASTx 软件并结合 KEGG 数据库进行 unigenes 的 KEGG 通路分析。

### 1.5 SSR 分析

简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 是一类由几个核苷酸为基本单元多次串联重复而形成测 DNA 片段, 分布于整个基因组中, 数量大多态性丰富, 具有广泛的应用性。本研究利用 MISA 软件对猴耳环 Unigene 的 SSR 位点进行了检测。SSR 筛选标准是: 单核苷酸重复 10 次及以上, 二核苷酸重复 6 次及以上, 三核苷酸重复 5 次及以上, 四核苷酸重复 5 次及以上, 五核苷酸重复 5 次及以上, 六核苷酸重复 5 次及以上。

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组测序和组装分析

经质量评估和低质量测序数据剔除后, 共获得 24 748 936 个高质量的 reads, 碱基数为 7 424 680 800, Q30 含量为 93.89%, GC 含量为 40.17%。利用 Trinity 软件对高质量测序数据进行拼接和组装, 一共获得 134 692 个转录本, 转录本总长度为 244 535 825 bp, 最大为 17 499 bp, 最小为 184 bp, 平均长度为 1 593 bp, N50 为 2 509 bp。剔除相同转录本后共获得 63 299 个 Unigenes, 平均序列长度为 1 117 bp, 序列长度分布如图 1 所示。

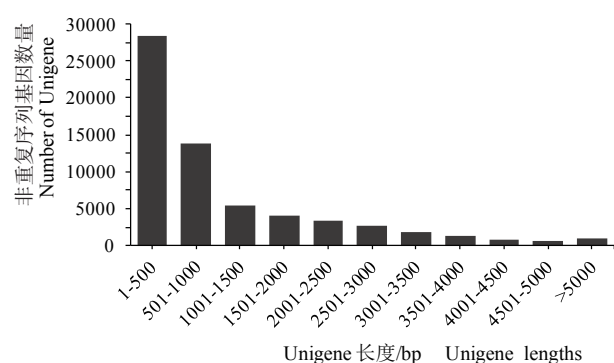


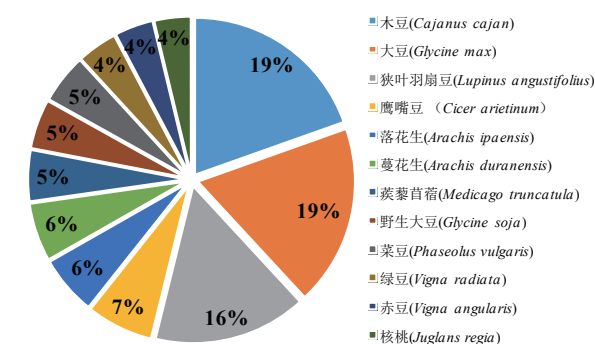
图 1 猴耳环 63 299 个 Unigene 序列长度的分布

Fig.1 Distribution of unigene lengths for *Pithecellobium clypearia*

### 2.2 Unigenes 功能注释分析

将获得的 63 299 个 Unigene 与 Nr、UniProt、KEGG、KOG 和 GO 共 5 个公共数据库进行比对分析 ( $E\text{-value} < 10^{-5}$ )。结果表明, 26 101 个 Unigene (41.23%) 获得功能注释, 其中 25 591

个 Unigene 比对到 Nr 数据库; 25 983 个 Unigene 比对到 UniProt 数据库; 8 530 个 Unigene 比对到 KEGG 数据库; 13 974 个 Unigene 比对到 KOG 数据库; 19 299 个 Unigene 比对到 GO 数据库。根据 Nr 数据库比对到的最相似的基因进行物种分布统计。结果发现 3 383、3 211 和 2 716 个 Unigene 分别比对到木豆 *Cajanus cajan*、大豆和狭叶羽扇豆 *Lupinus angustifolius* 的同源序列中 (图 2)。



注: 仅列出了分布数大于 600 的物种。Note: only showed the unigene number of species more than 600.

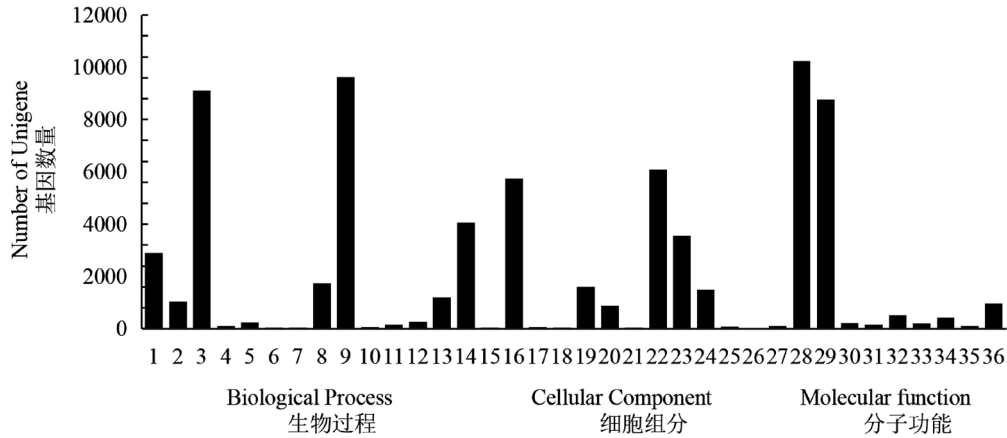
图 2 猴耳环转录组 Unigenes 的 Nr 数据库注释物种分布  
Fig.2 Nr database annotated species distribution of unigenes of transcriptome for *Pithecellobium clypearia*

### 2.3 Unigenes GO 功能分析

GO 数据库从生物学过程、细胞组分和分子功能 3 个方面预测基因产物的功能。利用 Blast2GO 软件对在 GO 数据库中注释到的 Unigenes 进行功能分类分析。结果发现, 19 299 个 Unigene 被归类到 36 个 GO 功能亚类中, 其中注释到生物过程大类中的 Unigenes 数量最多, 其次是分子功能和细胞组分大类 (图 3)。在生物过程大类中注释到的 Unigenes 主要分布在代谢过程、细胞过程、单一生物过程和生物调节等功能亚类中。在分子功能大类中, 绝大部分被注释到的 Unigenes 分布在绑定和催化活性两个 GO 功能亚类中。而在细胞组分大类中, 细胞、细胞膜和细胞器部分 3 个功能亚类中分布的 Unigenes 显著高于其它 GO 亚类。

### 2.4 KOG 功能分类分析

为进一步验证 Unigenes 注释结果功能分类的可靠性, 将所注释到的 Unigenes 进行 KOG 功能分类分析, 各 KOG 分类簇中 Unigenes 的分布情况如图 4 所示。结果表明: 共 13 975 个 Unigene 被注释到 25 个 KOG 功能类别簇中。其中一般功能预测类别中分布的 Unigenes 最多 (3 759,

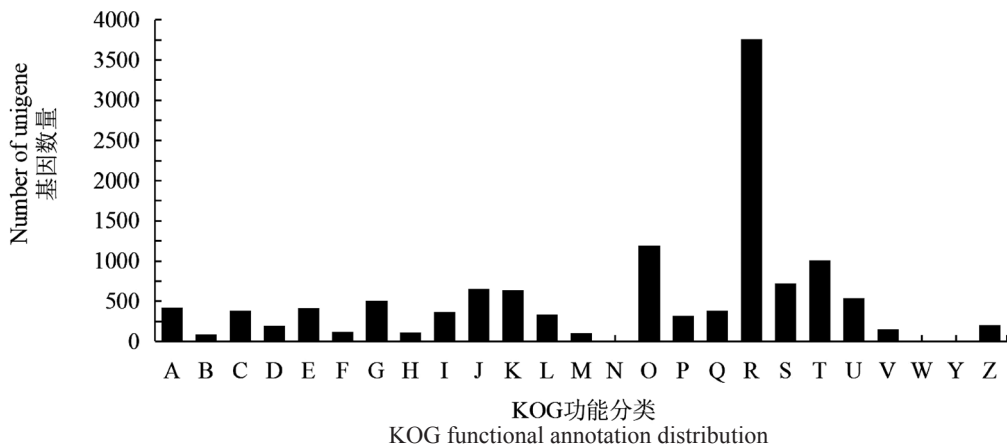


注: 1. 生物调节; 2. 细胞成分组织或生物合成; 3. 细胞过程; 4. 解毒作用; 5. 发育过程; 6. 生长; 7. 免疫系统过程; 8. 定位; 9. 代谢过程; 10. 多组织进程; 11. 多细胞生物过程; 12. 生殖过程; 13. 刺激响应; 14. 单一生物过程; 15. 细胞连接; 16. 细胞部分; 17. 胞外区域; 18. 胞外区域部分; 19. 大分子复合体; 20. 细胞膜; 21. 膜封闭腔; 22. 细胞膜部分; 23. 细胞器; 24. 细胞器部分; 25. 超分子复合体; 26. 病毒部分; 27. 抗氧化活性; 28. 绑定; 29. 催化活性; 30. 分子功能调节; 31. 分子转导活性; 32. 核酸结合转录因子活性; 33. 信号转导活性; 34. 结构分子活性; 35. 转录因子活性; 36. 转运活性。

Note: 1. biological regulation, 2. cellular component organization or biogenesis, 3. cellular process, 4. detoxification, 5. developmental process, 6. growth, 7. immune system process, 8. localization, 9. metabolic process, 10. multi organism process, 11. multicellular organismal process, 12. reproductive process, 13. response to stimulus, 14. single organism process, 15. cell junction, 16. cell part, 17. extracellular region, 18. extracellular region part, 19. macromolecular complex, 20. membrane, 21. membrane enclosed lumen, 22. membrane part, 23. organelle, 24. organelle part, 25. supramolecular complex, 26. virion part, 27. antioxidant activity, 28. binding, 29. catalytic activity, 30. molecular function regulator, 31. molecular transducer activity, 32. nucleic acid binding transcription factor activity, 33. signal transducer activity, 34. structural molecule activity, 35. transcription factor activity, 36. transporter activity.

图3 猴耳环转录组 Unigene 的 GO 功能分类统计

Fig.3 GO functional classification of unigenes of transcriptome for *Pithecellobium clypearia*



注: A.RNA 加工和修饰; B. 染色体结构和动力学; C. 能源产生与转化; D. 细胞周期调控、细胞分裂、染色体分离; E. 氨基酸转运和代谢; F. 核酸转运和代谢; G. 碳水化合物转运和代谢; H. 辅酶转运和代谢; I. 脂类转运和代谢; J. 翻译、核糖体结构和生物发生; K. 转录; L. 复制、重组和修饰; M. 细胞壁 / 细胞膜生物发生; N. 细胞活性; O. 翻译后修饰、蛋白翻转、伴侣; P. 无机离子转运和代谢; Q. 次生代谢物合成, 转运和代谢; R. 一般功能预测; S. 未知功能; T. 信号传递机制; U. 细胞间运输、分泌物和囊泡运动; V. 防御机制; W. 细胞外结构; Y. 核结构; Z. 细胞骨架。

Note: A.RNA processing and modification; B.Chromatin structure and dynamics; C.Energy production and conversion; D.Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E.Amino acid transport and metabolism; F.Nucleotide transport and metabolism; G.Carbohydrate transport and metabolism; H.Coenzyme transport and metabolism; I.Lipid transport and metabolism; J.Translation, ribosomal structure and biogenesis; K.Transcription; L.R eplication, recombination and repair; M.Cell wall / membrane envelope biogenesis; N.Cell motility; O.Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P.Inorganic ion transport and metabolism; Q.Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R.General function prediction only; S.Function unknown; T.Signal transduction mechanisms; U.Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V.Defense mechanisms; W.Extracellular structures; Y.Nuclear structure; Z.Cytoskeleton.

图4 猴耳环转录组 Unigenes 的 KOG 功能分布

Fig.4 KOG functional annotation distribution of unigenes of transcriptome for *Pithecellobium clypearia*



26.8%)，其次是翻译后修饰、蛋白转运、分子信号和信号转导机制等 KOG 功能类别。而在细胞核结构、细胞外结构和细胞运动 3 个 KOG 功能类别中分布的 Unigenes 分别只有 6、1 和 1 个。

## 2.5 KEGG 代谢通路分析

在 KEGG 数据库中注释到的 8 530 个 Unigenes 主要分布在 231 个 KEGG 代谢通路中。主要涉及到了代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程及生物系统 5 个大类通路和 26 个子类通路中。结果表明，在 KEGG 数据库中被注释到的 Unigenes 主要分布在代谢通路大类中，而生物系统通路大类中分布的 Unigene 最少。萜类化合物和黄酮类化合物为猴耳环的主要活性成分，分别通过萜类骨架和苯丙烷途径合成。本研究基于萜类和黄酮类化合物生物合成 KEGG 通路及功能注释结果，鉴定到 192 个和黄酮类化合物生物合成相关的 Unigenes，主要定位在苯丙烷生物合成通路、黄酮类化合物生物合成通路和异黄酮生物合成通路中（表 1）。共鉴定到 136 个和萜类化合物生物合成相关的 Unigenes，其中参与萜类骨架生物合成的 Unigene 53 个、参与二萜类化合物生物合成通路的 Unigenes 23 个，参与四萜类化合物类胡萝卜素生物合成通路的 Unigene 29 个、参与倍半萜和单萜类化合物生物合成通路的 Unigene 28 个（表 1）。

## 2.6 SSR 位点分析

本研究利用 MISA 软件对组装得到的 134 692

个转录本中的 SSR 位点进行检测。结果在 15 740 个 Unigenes 中共检测到 45 573 个 SSR 位点，发生频率为 33.84%。其中 5 928 个 Unigenes 含有 2 个及 2 个以上的 SSR 位点。在猴耳环转录本 SSR 类型中共检测到单核苷酸至六核苷酸 6 种重复类型。主要以单核苷酸重复（26 377, 57.87%）、二核苷酸重复（11 755, 25.79%）和三核苷酸重复（6 853, 15.04%）为主。四核苷酸重复、五核苷酸重复和六核苷酸重复只占总 SSR 位点的 1.29%。在单核苷酸重复类别中，出现频率最高的为 A/T，占 96.47%。出现频率较高的 AT/TA、AG/TC 和 CT/GA 三种重复类型分别占二核苷酸 SSR 位点总数的 26.47%、26.27% 和 23.23%。三核苷酸的主要重复类型为 AAG/TTC、CTT/GAA 和 AGA/TCT。四核苷酸中，TTTA/AAAT 和 AAAG/TTTC 为其优势重复类型。然而在五核苷酸和六核苷酸 SSR 位点中没有具显著优势的重复类型。

## 3 讨论与结论

随着测序技术的不断提高和测序成本下降，高通量转录组测序在无参考基因组物种功能基因挖掘和分子标记开发等方面的应用越发广泛。本研究利用 RNA-seq 技术首次对猴耳环的主要药用部位嫩枝和叶片的混合样本进行了转录组测序分析。共获得 2 474 893 个高质量 reads，Q30 高达 93.89%，表明猴耳环的 cDNA 文库构建质量高。

表 1 猴耳环黄酮类和萜类化合物生物合成途径相关基因

Table 1 Related genes of flavonoids and terpenoids biosynthesis in *Pithecellobium clypearia*

代谢通路 Pathway	Unigene 数量 Number of unigene	代谢通路标号 Pathway ID
苯丙烷类生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	147	Ko00940
黄酮类生物合成 Flavonoid biosynthesis	37	Ko00941
异黄酮生物合成 Isoflavonoid biosynthesis	4	Ko00943
花青素生物合成 Anthocyanin biosynthesis	2	Ko00942
黄酮和黄酮醇生物合成 Flavone and flavonol biosynthesis	2	Ko00944
萜类化合物骨架生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	53	Ko00900
单萜类化合物生物合成 Monoterpenoid biosynthesis	13	Ko00902
倍半萜类化合物生物合成 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	15	Ko00909
二萜类化合物生物合成 Diterpenoid biosynthesis	23	Ko00904
类胡萝卜素生物合成 Carotenoid biosynthesis	29	Ko00906
萜类和类固醇生物合成 Biosynthesis of terpenoids and steroids	3	Ko01062

表2 猴耳环 Unigenes 中 SSR 重复单元的分布特征统计

Table 2 Statistical information of the SSR motifs distribution in *Pithecellobium clypearia*

重复类型 SSR type	重复类型数 Number of SSR types	频率/% Frequency	平均长度/bp Mean length	主要重复单元 Main SSR motif
单核苷酸 Mono-nucleotide	26 377	19.85	13	A/T
二核苷酸 Di-nucleotide	11 755	8.73	16	AC/TG, AG/TC, GA/CT, AT/TA
三核苷酸 Tri-nucleotide	6 853	5.09	17	GAA/CTT, TTC/AAG, TCT/AGA, AAT/TTA, GGA/CCT, TCC/AGG, ATT/TAA, ATA/TAT
四核苷酸 Tetra-nucleotide	461	0.34	22	TTTA/AAAT, AAAG/TTTC, TATG/ATAC, TCTT/AGAA, AAGA/TTCT, AATA/TTAT, ATGT/TATC
五核苷酸 Penta-nucleotide	35	0.02	26	AAAAG, TTTCT, CTCCC, TTCTT, AGGAA, CAACA
六核苷酸 Hexa-nucleotide	92	0.07	34	TGAAGA, AGGTGG, CCGTTA, TTCTGC, TCATGC, TGGTGC, CTGCAC

拼接和组装后共获得 63 299 个 Unigenes, 平均序列长度为 1 117 bp。与其它已完成转录组测序的药用植物相比, 组装到的 Unigenes 与凤丹<sup>[16]</sup>、五指毛桃 *Ficus hirta*<sup>[27]</sup>、半枫荷<sup>[17]</sup> 和罗布麻<sup>[18]</sup> 等药用植物相近, 初步说明猴耳环的转录组序列的拼接组装效果较好, 测序质量可靠。但明显低于同为豆科的大豆<sup>[19]</sup>、野生大豆<sup>[20]</sup> 和蒺藜苜蓿<sup>[21]</sup> 等植物。这可能是因为猴耳环缺少基因组信息导致的。

将猴耳环组装到的 Unigenes 序列与 5 个公共数据库进行比对分析。结果发现只有 26 101 个 Unigenes (41.23%) 有功能注释, 58.77% 的 Unigenes 没有获得功能注解信息。这与野三七 *Panax stipuleanatus*<sup>[28]</sup>、半夏 *Pinellia ternata*<sup>[29]</sup> 和罗布麻<sup>[21]</sup> 等药用植物的转录组数据的功能注释结果相似。可能是由于短序列占比大、保守的核心序列信息不完整等因素导致的。成功注释到 Nr 数据库中的 25 591 个 Unigenes, 65% 比对上了木豆、大豆和蒺藜苜蓿的等 11 种豆科植物的同源序列。这可能是由于猴耳环同为豆科植物与其具有较近的亲缘关系, 亦可能是因为木豆、大豆和蒺藜苜蓿等物种具有参考基因组信息。在 GO、KOG 和 KEGG 数据库中也分别注释到 19 299、13 974 和 8 530 个 Unigenes, 主要分布在一般功能预测和代谢过程及通路中, 说明猴耳环主要药用部位嫩枝和叶组织中参与次生代谢产物生物合成与调控的基因丰富。萜类和黄酮类化合物为猴耳环的主要活性物质, 本研究中共鉴定到 192 和 192 个黄酮类化合物生物合成相关的 Unigenes, 主要参与苯丙烷、黄酮、黄酮醇、异黄酮和花青素等生物合成通路。

136 个和萜类化合物生物合成相关的 Unigenes, 主要参与萜类骨架、单萜、倍半萜、二萜和四萜化合物合成通路。这为揭示猴耳环萜类和黄酮类化合物合成及代谢调控网络提供了理论基础。SSR 标记因其通量大、操作简单和重复性好等特点已被广泛应用于铁皮石斛 *Dendrobium officinale*<sup>[30]</sup>、木麻黄 *Casuarina equisetifolia*<sup>[31]</sup>、枸杞 *Lycium barbarum*<sup>[32]</sup> 和 黄 芩 *Scutellaria baicalensis*<sup>[33]</sup> 等药用植物分子标记辅助育种和遗传图谱的构建。本研究利用 MISA 软件在 15 740 个 Unigenes 中共检测到 45 573 个 SSR 位点, 发生频率高达 33.84%, 显著高于连翘 *Forsythia suspensa*<sup>[34]</sup>、人参 *Panax ginseng*<sup>[35]</sup>、鱼腥草 *Houttuynia cordata*<sup>[36]</sup> 和 杜 仲 *Eucommia ulmoides*<sup>[37]</sup> 等药用植物中 SSR 出现的频率。猴耳环转录组中不同重复类型的 SSR 数量具有较大差异, 主要以单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸为主。在单核苷酸中, 大部分为 A/T 型 SSR 位点, G/C 含量少。导致这种差异的原因可能是因为甲基化 C 残基变为 T 碱基。此外二核苷酸和三核苷酸 SSR 重复类型也占据了很大比例, 这与罗布麻和杜仲等药用植物转录组数据的 SSR 重复类型比例相类似。本研究鉴定到 SSR 分子标记可为分析猴耳环的遗传多样性、构建遗传图谱、挖掘功能基因和分子标记辅助育种等研究提供理论基础。

#### 参考文献

- [1] 彭亮, 李谕光, 陈杰, 等. 我国猴耳环属植物药理作用及临床应用研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2015, 27(6): 117-120.

- [2] 张志坚, 李镜友, 李国强. 猴耳环研究进展[J]. 中国药业, 2010, 19(18): 82-83.
- [3] BARRERA N L L, BAUTISTA B S, JIMENEZ E M, et al. Influence of leaf, fruit and seed powders and extracts of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth (Fabaceae) on the in vitro vegetative growth of seven postharvest fungi[J]. Revista Mexicana de Fitopatología, 2002, 20: 66-71.
- [4] 郭耀威, 李沛波. 猴耳环提取物抗炎作用的实验研究[J]. 中国医药杂志, 2007(12): 23-24.
- [5] KATEKHAYE S D, KALE M S. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth wood bark and leaves[J]. Free Radicals and Antioxidants, 2012, 3(2): 47-57.
- [6] 李药兰, 李克明, 苏妙贤, 等. 猴耳环抗病毒有效成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006(5): 397-400.
- [7] 张中贤, 黄剑臻, 李沛波. 猴耳环水提取物抗流感病毒的实验研究[J]. 中国热带医学, 2008, 8(1): 30-34.
- [8] 郭晓宇, 王乃利, 宝丽, 等. 猴耳环的化学成分及其对T淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国药学, 2007, 16(3): 208-213.
- [9] 李伟, 颜兵. 猴耳环消炎颗粒治疗急性肠胃炎60例[J]. 实用中西医结合临床, 2011, 11(5): 57.
- [10] 王家蔚, 郁峰. 猴耳环消炎颗粒治疗急性上呼吸道感染疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2011(3): 64-65.
- [11] 兰小玲, 黄跃, 杨广林. 猴耳环消炎片治疗咽喉炎、扁桃腺炎200例疗效观察[J]. 实用临床医学, 2007, 8(2): 89-92.
- [12] 羨冀, 罗显峰, 于韬, 等. 猴耳环叶化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(4): 262-265.
- [13] 范伟军, 彭冠明, 黄婷, 等. 猴耳环不同家系的苗期生长分析[J]. 林业与环境科学, 2020, 36(3): 55-60.
- [14] 张迪, 陈祖旭, 黄世能. 施肥对猴耳环幼苗生长的影响[J]. 林业科学研究, 2015, 28(6): 906-909.
- [15] 付姝颖, 潘超美, 刘良婷, 等. 药用植物猴耳环的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2015, 51(12): 2195-2200.
- [16] 谢冬梅, 俞年军, 黄璐琦, 等. 基于高通量测序的药用植物“风丹”根皮的转录组分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(15): 2954-2961.
- [17] 叶兴状, 刘丹, 罗佳佳, 等. 濒危珍稀植物半枫荷的转录组分析[J]. 植物研究, 2019, 39(2): 276-286.
- [18] 赵雪艳, 王琪, 杨莎, 等. 药用植物罗布麻的转录组测序及分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(8): 95-103.
- [19] 龚招阳, 马博涵, 李泽远, 等. 大豆四粒荚突变体子房转录组分析[J]. 东北农业科学, 2020, 45(1): 29-34.
- [20] 张小芳, 王冰冰, 徐燕, 等. PEG模拟干旱胁迫下野生大豆转录组分析[J]. 大豆科学, 2018, 37(5): 681-689.
- [21] BOSCARI A, GIUDICE J D, FERRARINI A, et al. Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide[J]. Plant Physiology, 2013, 161: 425-439.
- [22] 毛积鹏, 祝文娟, 王博, 等. 火炬松总RNA提取方法的比较[J]. 中医药信息, 2016, 14(8): 2031-2035.
- [23] FOUCART C, PAUX E, LADOUCE N, et al. Transcript profiling of a xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in *Eucalyptus*[J]. New Phytologist, 2006, 170 (4): 739-752.
- [24] HAAS B J, PAPANICOLAOU A, YASSOUR M, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis[J]. Nature Protocols, 2013, 8(8): 1494-1512.
- [25] CONESA A, TEROL J, ROBLES M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005, 21 (18): 3674-3676.
- [26] YE J, FANG L, ZHENG H, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: 293-297.
- [27] 陈荣珠, 李珍, 林美珍, 等. 五指毛桃转录组及黄酮类化合物生物合成关键基因分析[J]. 热带作物学报, 2021, 42(3): 675-684.
- [28] 李翠婷, 张广辉, 马春花, 等. 野三七转录组中SSR位点信息分析及其多态性研究[J]. 中草药, 2014, 45(10): 1468-1472.
- [29] 王森, 张震, 姜倪皓, 等. 半夏转录组中的SSR位点信息分析[J]. 中药材, 2014, 37(9): 1566-1569.
- [30] XU M, LIU X, WANG J W, et al. Transcriptome sequencing and development of novel genic SSR markers for *Dendrobium officinale*[J]. Molecular breeding, 2017, 37(2): 18-25.
- [31] 许秀玉, 张勇, 甘先华, 等. 木麻黄青枯病抗性与EST-SSR标记的关联分析[J]. 林业与环境科学, 2020, 36(3): 10-17.
- [32] CHEN C, XU M, WANG C, et al. Characterization of the *Lycium barbarum* fruit transcriptome and development of EST-SSR markers[J]. PLoS one, 2017, 12(11): e0187738.
- [33] 王德富, 成媛媛, 杨锋, 等. 黄芩高通量转录组测序数据组装和分析[J]. 山西农业科学, 2016, 44(8): 1065-1072.
- [34] 王兴春, 谭河林, 陈钊, 等. 基于RNA-Seq技术的连翘转录组组装与分析及SSR分子标记的开发[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(3): 301-311.
- [35] LI C, ZHU Y, GUO X, et al. Transcriptome analysis reveals ginsenosides biosynthetic genes, microRNAs and simple sequence repeats in *Panax ginseng* CA meyer[J]. BMC Genomics, 2013 14(1): 245-256.
- [36] 黎晓英, 刘胜贵, 王丹, 等. 鱼腥草转录组SSR位点信息分析及其多态性研究[J]. 中草药, 2016, 47(10): 1762-1770.
- [37] 黄海燕, 杜红岩, 乌云塔娜, 等. 基于杜仲转录组序列的SSR分子标记的开发[J]. 林业科学, 2013, 49(5): 176-181.