

濒危植物单羽苏铁 SSR 引物的筛选

冯秀彦¹, 王跃华¹, 潘跃芝²

(1. 云南大学 生命科学学院 植物科学研究所, 云南 昆明 650091;

2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650201)

摘要: 以濒危植物单羽苏铁为材料, 利用改良的 CTAB 法提取其总 DNA. 利用 5 个单羽苏铁居群的 91 个个体, 对已从苏铁属其他植物开发的 65 对核 SSR 引物进行筛选, 并对引物的多样性指数进行检测分析. 共筛选到多态性高、扩增稳定的 SSR 引物 20 对. 在这 20 对引物中, 检测到的等位基因数平均为 9.75, 有效等位基因数平均为 4.769, 香农多样性指数平均为 1.473, 观察杂合度平均为 0.380, 期望杂合度平均为 0.636, 固定指数只有引物 4 的小于 0. 绝大多数引物都偏离了哈迪-温伯格定律, 并达到了极显著水平. 以上结果为单羽苏铁的遗传多样性和遗传结构的进一步分析提供了依据.

关键词: 濒危植物; 单羽苏铁; SSR 引物筛选; 遗传多样性

中图分类号: Q 347 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2012)S2-0419-07

苏铁类植物是一类古老残遗植物, 在中生代晚三叠纪至早白垩纪最为繁盛, 晚白垩纪时逐渐衰退^[1]. 现存苏铁类植物仅有苏铁科(Cycadaceae)、泽米铁科(Zamiaceae)和托叶铁科(Stangeriaceae) 3 科 11 属, 约有 240 种, 斑块状分布在亚洲、非洲、大洋洲和美洲热带、亚热带的局部地区^[2]. 而中国现仅有苏铁科苏铁属(*Cycas*) 植物分布, 约有 24 种^[3], 为国家一级保护植物^[4], 主要分布于我国南方的广西、云南、四川、贵州、海南及台湾等省区^[5]. 其中的单羽苏铁(*Cycas simplicipinna* (T. Smitinand) K. Hill) 分布于中国西南热带地区, 以及泰国北部、缅甸、老挝、越南^[6]. 野外调查表明, 虽然单羽苏铁大都生长在自然保护区内, 生境并没有遭到严重的破坏, 但其居群个体数量都很小, 且呈零星分布. 目前, 对于单羽苏铁的研究也仅限于它的昆虫传粉^[7]和解剖结构研究^[8]等.

关于苏铁属植物的保护遗传学的研究, 目前多数是采用 ISSR、AFLP 和 SNPs 分子标记的方法来研究一些苏铁属植物的遗传多样性和遗传结

构^[9-15]. SSR (simple sequence repeats) 标记是近年来发展起来的一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术, 目前已有一些关于苏铁属植物 SSR 引物开发的报道^[16-22]. 本文以单羽苏铁为研究对象, 对已报道的 SSR 引物进行筛选, 试图找出在单羽苏铁里扩增稳定且多样性高的引物, 以便为今后单羽苏铁的遗传结构和遗传多样性研究提供支持.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料 实验材料来源见表 1. 均按居群随机采样, 每株取 4~5 片幼嫩的小羽叶, 用变色硅胶干燥, 室温保存直到 DNA 的提取.

PCR 过程中用于筛选的引物来自国内外对台东苏铁(*C. taitungensis*)^[16], 德保苏(*C. debaoensis*)^[17], 攀枝花苏铁(*C. panzhihuaensis*)^[18], 海南苏铁(*C. hainanensis*)^[19-20], 葫芦苏铁(*C. changjianensis*)^[21]和刺叶苏铁(*C. rumphii*)^[22]研究开发出的 65 对核 SSR 引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成. 引物信息详见表 1.

* 收稿日期: 2012-11-05

基金项目: 国家自然科学基金委-云南联合基金(U1136602).

作者简介: 冯秀彦(1986-), 女, 山东人, 硕士, 主要从事濒危植物保护方面的研究.

通信作者: 潘跃芝(1973-), 女, 硕士, 高级工程师, 主要从事植物资源评价及保护生物学研究. E-mail: panyuezhi@mail.kib.ac.cn.

表 1 单羽苏铁 5 个居群的采样点的具体信息和取样个数

Tab. 1 Details of sample locations and sample sizes (n) of the five populations of *C. simplicipinna* investigated in this study

居群编号	居群	纬度(N)/(°)	经度(E)/(°)	海拔/m	个体数(n)
LUA	LuangPrabang ,Laos	19.897	102.161	300	25
LU	LuangPrabang ,Laos	19.831	102.144	280	23
MM	云南省勐腊县勐满镇	21.128	101.315	640	20
NZD	云南省变更普洱市糯扎渡水电站	22.690	100.419	780	12
ML	云南省勐仑县	22.932	101.253	550	11
总数					91

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 总 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法^[23]进行, DNA 条带清晰, 亮度且与 Marker 相当的用来筛选 SSR 引物. DNA 母液放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.2.2 SSR 引物筛选

1.2.2.1 SSR 普通引物的初步筛选 从单羽苏铁的 5 个居群中随机挑选 4 个个体对文献中的 65 对核 SSR 引物进行初步筛选.

在 PCR 扩增过程中 经不断改进, PCR 最终扩增体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$: ddH₂O $17.8\text{ }\mu\text{L}$; $10\times$ Buffer $2.5\text{ }\mu\text{L}$; MgCl₂ 25 mmol/L $2.0\text{ }\mu\text{L}$; dNTP 10 mmol/L $0.5\text{ }\mu\text{L}$; Primer $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ $0.5\text{ }\mu\text{L}$; Taq 酶 $5\text{ U}/\mu\text{L}$ $0.2\text{ }\mu\text{L}$; 模板 $1.0\text{ }\mu\text{L}$.

扩增反应条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min ; ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s 变性, T_m 25 s 退火, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 延伸) 反应 30 个循环. 其中 T_m 为退火温度, 不同引物退火温度要求不同; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min . 然后将 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳. 经琼脂糖凝胶电泳后, 为了进一步确定引物的特异性, 对能扩增出条带的引物再进行 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用银染的方法显色, 以得到条带单一且亮的引物对.

1.2.2.2 荧光标记 PCR 筛选 SSR 多态性引物

对初步筛选出的引物的 5' 端做荧光染料修饰, 所用荧光染料为 6-FAM、HEX 和 ROX. 荧光引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成. 用单羽苏铁的 5 个居群的 91 个个体对荧光标记引物进行多态性的筛选.

荧光标记引物的 PCR 的反应体系和普通引物的一致, 但是反应条件做了如下调整: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 退火, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s

延伸, 反应 10 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 退火, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 延伸, 反应 20 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min . 在 3730XL 型仪器上毛细管电泳检测 SSR 分子标记.

1.2.3 数据整理与分析 使用 Genemapper 软件分析 SSR 数据, 读出 PCR 产物片段大小; 用 GenAlEx (6.3 版)^[24]进行数据的整理及期望杂合度、观察杂合度、固定指数和哈迪-温伯格平衡检测; 等位基因数、有效等位基因数和香农多样性指数用 PopGene (1.32 版)^[25]完成.

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取 本实验我们采用改良的 CTAB 法, 增加了去多糖的次数, 提取的 DNA 如图 1 所示, DNA 目的条带和等量的 Maker 条带相比, 目的条带要更清晰, 说明 DNA 可以用来 PCR 扩增.

2.2 SSR 引物筛选

2.2.1 SSR 普通引物的初步筛选 我们用单羽苏铁就近年来国内外学者对苏铁属其他植物研究开发的 65 对核 SSR 引物进行筛选, 为了得到较为理想的扩增产物, 通过对 PCR 反应体系和反应条件的不断改进, 得到了理想的反应体系和条件. 然后将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳初步检测(图 2), 再用 4% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳二次检测, 淘汰无扩增条带和扩增条带不特异的引物, 最终得到 25 对扩增条带亮且单一的 SSR 普通引物.

2.2.2 荧光标记 PCR 筛选 SSR 多态性引物 在初步筛选到的 25 对引物中, 通过软件 GenAlEx (6.3 版) 和 PopGene (1.32 版) 数据分析后, 共得到了多态性好、特异性强且稳定的引物 20 对(表

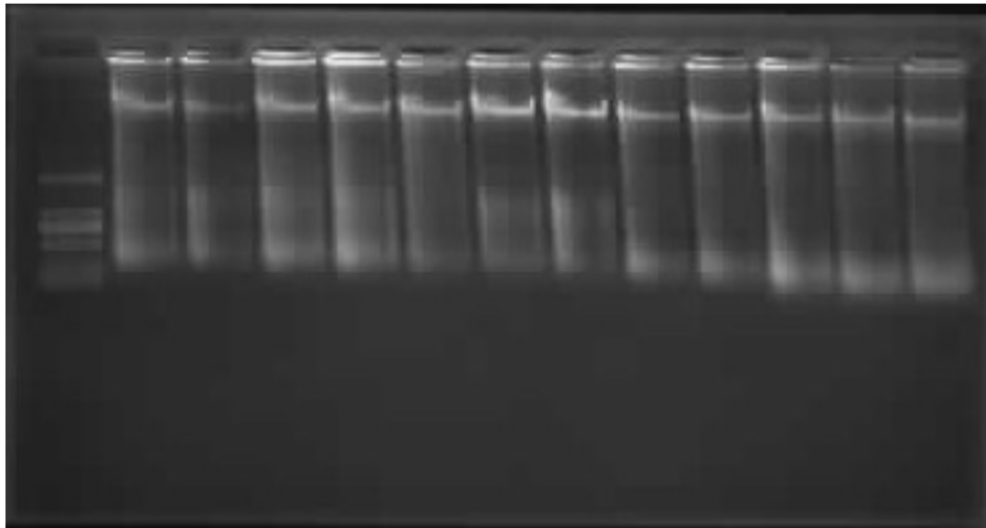


图 1 改良 CTAB 法提取的单羽苏铁的总 DNA 条带

Fig. 1 The total DNA bands extracted from *C. simplicipinna* using improved CTAB method

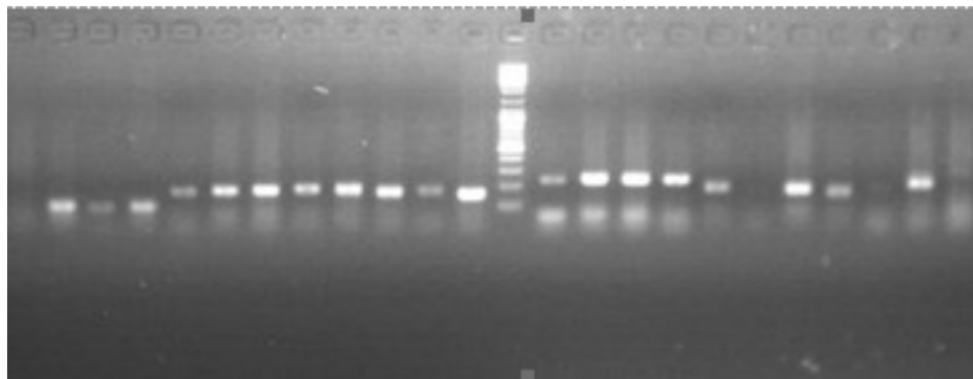


图 2 以引物 1、2、3、4、5 为例扩增的 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of the PCR products of primers 1, 2, 3, 4, and 5

2) 分析结果见表 3。从表 3 中可以看出,在单羽苏铁 5 个居群 91 个个体中,20 对 SSR 引物共检测到 195 个等位基因,每个引物的等位基因数目在 2 个(引物 4、7)至 32 个(引物 17)之间,平均为 9.75。共检测到有效等位基因数约 95 个,从引物 4 的 1.056 到引物 5 的 11.967,平均为 4.769。引物 17 的香农多样性指数最高为 2.840,引物 4 的多样性指数最低为 0.126,平均为 1.473。因此不同引物的多样性参数差别较大,多样性较高的引物为引物 17 和引物 5,较低的引物为引物 2、4 和引物 7。

20 对引物的观察杂合度和期望杂合度的检测结果表明,观察杂合度的值为 0.055 ~ 0.802,平均为 0.380,期望杂合度的值为 0.053 ~ 0.920,平均为 0.636,观察杂合度为期望杂合度的 59.7%,表明 20 对引物在单羽苏铁群体内表现杂合子的不足。本实验中,固定指数小于 0 的只有引物 4,其余

均大于 0。哈迪 - 温伯格平衡的卡方检测显示除了引物 4 表现不显著,引物 2 表现显著,其他引物都达到了极显著水平,表明在群体水平上几乎每对引物都显著地偏离了哈迪 - 温伯格平衡。

3 讨论

SSR 标记在不同物种上的应用可为近缘种的引物设计提供参考,一旦微卫星位点在某一物种中被分离并测序,就可能被用于近缘种的分析^[26]。SSR 的研究结果表明,植物每个位点的平均等位基因数约为 10.0,期望杂合度约为 0.61^[27]。本研究从已报道的 6 种苏铁属植物的 SSR 引物中筛选出适合单羽苏铁使用的 20 对引物,每个位点的平均等位基因数为 9.75,达到了目前植物 SSR 研究的平均水平,而期望杂合度为 0.636,略高于平均水平,说明所筛选出来这 20 对引物适合用来研究单

表 2 筛选出的用于单羽苏铁扩增的 SSR 引物信息

Tab. 2 Details of SSR primers used for *C. simplicipinna*

引物 编号	原始编号	引物序列	退火 温度/°C	文献
1	Cy - Tai EST - SSR01	F: CGAGAAGTAATTTGCAAATGC R: TGTGAAGCTAAATAGTTGGG	55	[16]
2	G46	F: CAAAAGCCCCTTGAAACC R: AAGCTCGACTTGTAGATGGA	55	[17]
3	CY270	F: CGGATTTGGAGGTTCAAAGA R: CAGTTTGTATAGCTGAACAAGAATAGA	54	[22]
4	Cy - Tai EST - SSR05	F: AACAGACCATGAGGACCAGG R: GCTGGTATTCCTTAATGCAC	55	[16]
5	Cy - Tai EST - SSR08	F: GAAAATGCTTTGATGTTCCC R: TGGGCCAACTTTAAGCACAC	60	[16]
6	CY232	F: TCTTGCTTACCCGTTTGCTT R: CTCCTCGACGTTCAATCACA	55	[22]
7	HL01	F: TCCTTTCATGGACACTCTTACG R: ATTTATTAGATGCTTAGCTTA	48	[21]
8	Cy - Tai EST - SSR11	F: GATATTAAGGCACGGGAG R: TGAAGCTGCTGCATTTGCAT	56	[16]
9	HL08	F: AAAACATTCCTTGCCCTGT R: GGAGCCTGTTGAAGAGCTA	56	[21]
10	Cha04	F: ACTCCTCACTCCCTCGC R: CTAGCCTCTTGTTGCCATTAT	64	[19]
11	E004	F: CTATCATCAGAGCCTCATTC R: AAGTCATACATGGACAGCAA	54	[17]
12	Cha - estssr03	F: CGAAATGCGAAATGTCCATAGC R: GTGACAGTGAAATCGGCAGTC	60	[20]
13	Cpz8	F: TGCTAAAGTGAACGACGAA R: CATACTCCTTATCCCACGAAT	55	[18]
14	Cha08	F: CAGGGACCATTGTTTCTAAGG R: ACTTATACATAGGGCTCTAAT	54	[19]
15	Cha05	F: GTCTGCTAACATCTATAAA R: GATGAGCTAAGAGTCATAGTA	52	[19]
16	E001	F: TGGGATTAATATTCAGAAA R: CGACGAGTCTGATGTAGGTAT	52	[17]
17	Cha - estssr01	F: GATTCTTGCTCTGTTCCGCTCAT R: CAGAACCCTGAACTGTCAAAC	60	[20]
18	HL02	F: GGGTTCATATCACATAAC R: CTATAAAGAATCATCGTTCTC	50	[21]
19	Cha - estssr02	F: ATAGGCTTCCTTTAGTGATGTC R: GCCTTTAGTAGTATCGGATTA	50	[20]
20	Cha - estssr04	F: GATGTTCCCAAATAATGTTACA R: CAAGCTGCACATGCAATGA	54	[20]

表 3 20 对 SSR 引物的遗传多样性分析

Tab. 3 The analysis of genetic diversity for 20 screened SSR primers

引物	5'端 修饰	等位基因 Na	有效等位 基因数 Ne	香农信息 指数 I	观察杂 合度 Ho	期望杂 合度 He	固定 指数 F	哈迪 - 温伯格 平衡检测 p(HWE)
1	6 - FAM	4	2.340	0.966	0.308	0.573	0.463	0.000**
2	HEX	3	1.467	0.595	0.253	0.318	0.206	0.034*
3	6 - FAM	5	2.697	1.179	0.242	0.629	0.616	0.000**
4	ROX	2	1.056	0.126	0.055	0.053	-0.028	0.788 ^{ns}
5	6 - FAM	16	11.967	2.596	0.670	0.916	0.269	0.000**
6	HEX	5	2.018	0.959	0.242	0.505	0.521	0.000**
7	ROX	2	1.971	0.686	0.352	0.493	0.286	0.006**
8	6 - FAM	4	2.272	0.959	0.110	0.560	0.804	0.000**
9	HEX	6	1.980	0.899	0.374	0.495	0.245	0.000**
10	6 - FAM	23	9.035	2.588	0.495	0.889	0.444	0.000**
11	6 - FAM	11	3.992	1.793	0.308	0.749	0.589	0.000**
12	HEX	6	1.502	0.732	0.099	0.334	0.704	0.000**
13	HEX	4	2.942	1.111	0.341	0.660	0.484	0.000**
14	HEX	19	5.854	2.187	0.626	0.829	0.245	0.000**
15	ROX	4	1.837	0.856	0.154	0.456	0.662	0.000**
16	ROX	6	4.830	1.644	0.736	0.793	0.071	0.000***
17	ROX	32	10.130	2.840	0.505	0.901	0.439	0.000**
18	HEX	22	12.425	2.756	0.802	0.920	0.128	0.000**
19	HEX	6	3.635	1.412	0.231	0.725	0.682	0.000**
20	ROX	15	11.430	2.556	0.692	0.913	0.241	0.000**
平均		9.75	4.769	1.473	0.380	0.636	0.404	
总和		195	95.38					

ns: 不显著; * : $p < 0.05$ 显著; ** : $p < 0.01$ 极显著

羽苏铁居群的遗传多样性及居群遗传结构.

与原文献 [16 - 22] 相比, 本实验筛选出的适合单羽苏铁的 20 对 SSR 引物中, 只有引物 2、7、10 和 15 的等位基因数小于最初的报道, 其余的 16 对引物的等位基因数均等于或大于最初的报道; 引物 2、4、7、9、12、15 的期望杂合度小于最初的报道, 其余 14 对引物的期望杂合度均大于最初的报道. 本实验在取材个体数上高于以上文献中报道的取材个体数, 然而在单羽苏铁中, 这 20 对引物每个位点的平均等位基因数达到了已有 SSR 研究的平均水平, 且期望杂合度还略高于了平均水平, 说明这 20

对 SSR 引物的多态性、稳定性及通用性是比较高的. 同时这 20 对引物中有 18 对显著地偏离了哈迪 - 温伯格平衡, 这一现象可以用固定指数^[28]来解释. 固定指数又称 Hardy - Weinberg 平衡遗传偏离指数, 是反映群体在某座位上偏离 Hardy - Weinberg 程度的参数, 也是衡量配子间的相关系数, 即近交系数 F . $F > 0$ 表明存在近交, 某群体在该座位杂合子缺失; 相反, $F < 0$ 表明异交程度高, 某群体在该座位杂合子过剩, 数值大小则表明缺失或过剩的程度; $F = 0$ 表明群体内的个体接近随机交配, 即群体处于哈迪 - 温伯格平衡状态. 18 对引物偏

离了哈迪 - 温伯格平衡,说明单羽苏铁群体杂合子严重不足,可能是由于存在近亲繁殖的结果,导致种质的纯质化。因此,利用 SSR 技术对单羽苏铁每个居群的遗传多样性、遗传结构、基因流等方面的研究十分必要,以期进一步制定单羽苏铁的合理保护措施。

致谢:感谢肖龙骞副研究员在材料采集和实验过程中的帮助。

参考文献:

- [1] GAO ZH F, THOMAS B A. A review of fossil cycad megasporophylls, with new evidence of *Crossozamia pommel* and its associated leaves from the lower Permian of Taiyuan, China [J]. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 1989, 60: 205-203.
- [2] OSBORNE R. The world cycad census and a proposed revision of the threatened species status for cycad taxa [J]. *Biological Conservation*, 1995, 71(1): 1-12.
- [3] 马永, 李楠, 孙俊霞, 等. 中国苏铁属植物的分类学研究现状与展望 [J]. *山西师范大学学报*, 2005, 19(2): 73-77.
- [4] 国家林业局, 农业部. 国家重点保护野生植物名录 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [5] 王定跃. 中国苏铁属的分类研究 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1996.
- [6] 印红. 常见苏铁类植物识别手册 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [7] 陈家瑞. 单羽苏铁的昆虫传粉 [C]. 第五届全国苏铁学术会议论文摘要汇编. 深圳, 2007: 28.
- [8] 黄玉源. 中国苏铁科植物的系统分类与演化研究 [M]. 北京: 气象出版社, 2001: 28-30.
- [9] HUANG S, CHIANG Y C, SCHAAL B A, et al. Organellar DNA phylogeography of *Cycas taitungensis*, a relict species in Taiwan [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 2669-2681.
- [10] JIAN SH G, ZHONG Y, LIU N, et al. Genetic variation in the endangered endemic species *Cycas fairylakea* (Cycadaceae) in China and implications for conservation [J]. *Biodiversity and Conservation*, 2006, 15: 1681-1694.
- [11] XIAO L Q, GE X J, GONG X, et al. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) [J]. *Annals of Botany*, 2004, 94: 133-138.
- [12] XIAO L Q, GONG X, HAO G, et al. Comparison of the genetic diversity in two species of cycads [J]. *Australian Journal of Botany*, 2005, 53: 219-223.
- [13] XIAO L Q, GONG X. Genetic differentiation and relationships of populations in the *Cycas balansae* complex (Cycadaceae) and its conservation implications [J]. *Annals of Botany*, 2006, 97: 807-812.
- [14] XIE J G, JIAN SH G, LIU N. Genetic variation in the endemic plant *Cycas debaoensis* on the basis of ISSR analysis [J]. *Australian Journal of Botany*, 2005, 53: 141-145.
- [15] ZHAN Q Q, WANG J F, GONG X, et al. Patterns of chloroplast DNA variation in *Cycas debaoensis* (Cycadaceae): conservation implications [J]. *Conservation Genetics*, 2011, 12: 959-970.
- [16] JU L P, KUO CH CH, CHAO YSH, et al. Microsatellite primers in the native perennial cycad *Cycas taitungensis* (Cycadaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 2011, 98(4): e84-e86.
- [17] YANG Y, LI Y, GONG X, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cycas debaoensis* Y. C. Zhong et C. J. Chen (Cycadaceae) [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8: 913-915.
- [18] ZHANG F M, SU T, YANG Y, et al. Development of seven novel EST-SSR markers from *Cycas panzhihuensis* (Cycadaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 2010, 97(12): e159-e161.
- [19] ZHANG M, WANG ZH F, JIAN SH G, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cycas hainanensis* C. J. Chen (Cycadaceae) [J]. *Conservation Genetics*, 2009, 10: 175-176.
- [20] WANG ZH F, YE W H, CAO H L, et al. Identification and characterization of EST-SSRs and cpSSRs in endangered *Cycas hainanensis* [J]. *Conservation Genetics*, 2008, 9: 1079-1081.
- [21] LI L, WANG ZH F, JIAN SH G, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in endangered *Cycas changjiangensis* (Cycadaceae) [J]. *Conservation Genetics*, 2009, 10: 793-795.
- [22] Cibrian - Jaramillo A, MARLER T E, DeSalle R, et al. Development of EST-microsatellites from the cycad *Cycas rumphii* and their use in the recently endangered *Cycas micronesica* [J]. *Conservation Genetics*, 2008, 9: 1051-1054.
- [23] DOYLE J J. DNA protocols for plants - CTAB total

- DNA isolation [C] // HEWITT G M ,JOHNSTON A , ed. Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer , 1991: 283-293.
- [24] PEAKALL R O D ,SMOUSE P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excell. Population genetic software for teaching and research [J]. Molecular Ecology Notes ,2006 ,6 (1) : 288-295.
- [25] YEH F C ,YANG R C ,BOYLE T B J ,et al. POPGENE the user friendly shareware for population genetic analysis [M]. Canada: Molecular Biology and Biotechnology Center ,University of Alberta ,Edmonton ,Alberta ,1997.
- [26] 王丽 ,赵桂仿. 植物不同种属间共用微卫星引物的研究 [J]. 西北植物学报 ,2005 ,25 (8) : 1 540-1 546.
- [27] NYBOM H. Comparison of differet nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Molecular Ecology ,2004 ,13 (5) : 1 143-1 155.
- [28] WRIGHT S. Variability Within and Among Natural Populations. Vol. IV [M]. Chicago: University of Chicago Press ,1978.

Screening SSR primers for endangered plant *Cycas simplicipinna* (T. Smitinand) K. Hill

FENG Xiu-yan¹ , WANG Yue-hua¹ , PAN Yue-zhi²

(1. Institute of Plant Science ,School of Life Science ,Yunnan University ,Kunming 650091 ,China;

2. Kunming Institute of Botany ,Chinese Academy of Sciences ,Kunming 650201 ,China)

Abstract: The total DNA of endangered plant *Cycas simplicipinna* (T. Smitinand) K. Hill was extracted by means of improved CTAB isolation method. SSR primers were screened using 91 individuals of five populations of *C. simplicipinna* from 65 nuclear SSR primers which had been developed from other cycas plants. And the genetic diversity indexes of screened SSR primers were analysed. As a result ,we totally got 20 SSR primers which had high polymorphism in *C. simplicipinna*. With respect to the 20 primers ,the average of numbers of alleles was 9.75 ,the average of effective numbers of alleles was 4.769 ,the average of Shannon's information index was 1.473 ,the average of observed heterozygosity was 0.380 ,and the expected heterozygosity was 0.636 ,there was only the fixation index of primer 4 smaller than 0. Most of these primers deviated from Hardy - Weinberg equilibrium and reached the most significant difference level. These results will provide references for genetic diversity and genetic structure research of *C. simplicipinna*.

Key words: endangered plant; *Cycas simplicipinna*; screening SSR primers; genetic diversity