

doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2014.03.001

基于磁珠富集法的绣线菊 SSR 分子标记分离与筛选

张金华^{1,3}, Gulzar Khan^{1,3}, 付鹏程^{1,3}, 雷淑云^{1,3}, 陈世龙^{1,2}, 张发起^{1,2}

(1. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;
2. 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁 810001; 3. 中国科学院大学, 北京 100039)

摘要: 微卫星序列 (SSR) 具有多态性高、共显性遗传等特点, 是一种极具价值的分子遗传标记。采用磁珠富集法从高山绣线菊基因组 DNA 中分离和筛选 SSR 标记。高山绣线菊基因组经限制性内切酶 *Mse* I 酶切后与接头连接, 并与生物素标记 SSR 探针 (AC)₁₅ 和 (AG)₁₅ 杂交, 然后通过链霉亲和素磁珠富集、洗脱、PCR 扩增、克隆, 完成微卫星文库构建。利用载体通用引物和探针序列引物进行 PCR 扩增, 筛选重组克隆并测序, 获得 112 条序列。随机挑选其中 60 条序列设计的引物, 经初期筛选获得多态性引物 16 对。用所得 16 对引物对 4 个居群 92 个个体的蒙古绣线菊和高山绣线菊进行 PCR 扩增。统计分析 PCR 产物的毛细管电泳结果, 发现 4 个居群的平均等位基因数、平均期望杂合度及平均观测杂合度都比较高。64 个数据系列 (4 个居群 × 16 个位点) 中的 26 个显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 推测可能由于无效等位基因的存在所引起。分析显示研究开发的 16 对多态性 SSR 引物可以用于后续遗传多样性、物种进化与亲缘关系等方面研究, 丰富了绣线菊遗传多样性研究的分子标记。

关键词: 绣线菊; 微卫星; 磁珠富集; 遗传多样性

中图分类号: Q346+.5

文献标识码: B

文章编号: 2095-1736(2014)03-0079-05

Isolation and screening of molecular genetic marker SSR in *Spiraea* based on magnetic beads enriched

ZHANG Jin-hua^{1,3}, GULZAR Khan^{1,3}, FU Peng-cheng^{1,3},
LEI Shu-yun^{1,3}, CHEN Shi-long^{1,2}, ZHANG Fa-qi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Adaption and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. Qinghai Province Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Xining 810001; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Simple sequence repeat (SSR) markers are high polymorphic and codominant, which have become one of the most popular molecular markers used with applications in many different fields. In this study, SSR markers from *Spiraea alpina* based on magnetic beads enriched were isolated and screened. The total DNA of *S. alpina* was extracted and digested with restriction enzyme *Mse* I. Then the digested fragments were ligated with adaptors and hybridized with biotinylated (AC)₁₅ and (AG)₁₅ probes. The tentative SSR DNA was isolated by streptavidin-coated magnetic beads from the hybridized mixture. After elution, amplification and transformation, the SSR-enriched library was constructed. The second PCR screening was performed to screen positive clones, with the primers of probes and vector's primers. Sixty sequences were randomly chosen to design the primers from 112 sequences, obtained from positive clones. Finally, 16 pairs of polymorphic primers were used to amplify 92 individual from 4 different populations of *S. alpina* and *Spiraea mongolica*. Results showed that all populations have a high level of number of alleles per locus, expected and observed heterozygosities. Twenty six of total 64 loci (4 population × 16 locus) showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Results suggested that these SSR makers could be used for genetic diversity, evolution and genetic relationship of *S. alpina* and *S. mongolica*, and enrich molecular markers for genetic diversity of *Spiraea*.

Keywords: *Spiraea*; SSR; magnetic beads enriched; genetic diversity

收稿日期: 2013-12-23; 修回日期: 2014-01-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31270270); 中国科学院“西部之光”人才培养计划 (Y329231211)

作者简介: 张金华, 硕士研究生, 主要从事植物遗传多样性研究;

通讯作者: 陈世龙, 博士, 研究员, 主要从事高山植物适应与进化研究, E-mail: slchen@nwipb.cas.cn.

微卫星是 DNA 短的串联简单重复序列(simple sequence repeat, SSR), 一般是由 1~6 个碱基组成的串联重复 DNA 序列^[1,2]。研究表明 SSR 存在于绝大多数的真核生物基因组中^[3]。其中最常见 SSR 序列为 (AC)_n 约有 5 × 10⁴ ~ 7 × 10⁵ 随机分散于整个基因组中, 其重复次数和重复程度在不同的物种间高度变化^[4]。由于 SSR 具有高度多态性和共显性等特点, 已经广泛应用于遗传图谱构建、基因定位、遗传多样性研究、物种进化与亲缘关系等^[5]。

传统的微卫星开发方法是利用菌落原位杂交技术筛选出重组克隆, 然后经测序筛选含微卫星序列的 DNA 片段, 构建基因组 DNA 文库, 但该方法耗时费力及筛选效率较低^[6]。随着微卫星分离技术的发展, 磁珠富集法于 1992 首次提出, 其主要是将酶切产物经 PCR 扩增后与生物素标记的探针杂交, 然后用磁珠富集, 从而获得富含 SSR 序列的片段, 从而构建微卫星文库^[7]。由于这一方法操作简单且获得 SSR 分子标记效率高而快速发展。但目前利用磁珠富集法开展绣线菊 SSR 分子标记的工作还很少见^[8]。

绣线菊亚科(Spiraeoideae) 是蔷薇科(Rosaceae) 中最古老的亚科, 共有 22 属 260 余种, 中国有 8 属 100 余种, 全为落叶性(本亚科包括常绿和落叶两大类群, 后者为进化类群), 绣线菊属(*Spiraea* L.) 又是绣线菊亚科中最原始的属, 在系统进化过程中, 衍生出形态各异而亲缘关系紧密的绣线菊种类^[9]。高山绣线菊(*Spiraea mongolica*) 和蒙古绣线菊(*Spiraea mongolica*) 同为蔷薇科绣线菊属落叶性灌木, 多见于海拔 1500~4700 m 的山坡灌丛等处, 是青藏高原地区高山灌丛的主要建群种, 对维持高寒草甸生态系统的稳定具有重要作用^[10]。在之前对高山绣线菊的谱系地理学研究发现, 高山绣线菊在青藏高原台面、东南边缘横断山区等地存在多个冰期避难所, 并且没有表现出大规模的种群集体扩张和迁移的现象^[11,12]。但这一结果仅利用叶绿体 DNA 数据进行分析, 由于缺少 SSR 分子标记而没有进行该方面的检验, 不能够完整地展现高山绣线菊的冰期进化历史等问题。因此, 本研究利用微卫星富集法从高山绣线菊基因组 DNA 中分离和获得 SSR 分子标记, 并验证

其在蒙古绣线菊的通用性, 以期对绣线菊的分类、谱系地理、系统发育等研究提供丰富的 SSR 分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料

研究材料主要采自青海囊谦和四川红原。其中, 每个居群随机采集 20~27 个个体, 每个居群内采样个体之间至少间隔 100 m, 共采集到两种绣线菊 4 个居群 92 个个体(表 1)。采集植物生长良好的新鲜、幼嫩叶片后, 迅速用硅胶干燥并带回实验室于 -20℃ 保存备用。凭证标本存于中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物标本馆(HNWP)。

1.2 高山绣线菊基因组 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法提取高山绣线菊和蒙古绣线菊基因组 DNA, 并用乙醇沉淀法对 DNA 初提母液进行纯化^[13]。用紫外/可见光分光光度计 NanoDrop-TM2000c(Thermo Scientific, 美国) 测定纯化后的基因组 DNA 浓度, 调整 DNA 总的质量浓度为 100 ng/μL, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取结果。

表 1 高山绣线菊和蒙古绣线菊采集信息

物种	居群编号	个体数	采集地	地理信息		
				经度 (N)	纬度 (E)	海拔
高山绣线菊	P1	22	青海囊谦	31°58'	96°30'	4320
<i>S. alpina</i>	P2	23	四川红原	32°46'	102°21'	3654
蒙古绣线菊	P3	20	青海囊谦	31°58'	96°30'	4320
<i>S. mongolica</i>	P4	27	四川红原	31°58'	96°30'	3654

1.3 微卫星富集文库的构建

1.3.1 基因组 DNA 酶切、接头连接及 PCR 扩增

用 *Mse* I 内切酶(New England Biolabs, 美国) 对高山绣线菊的基因组 DNA(约 200 ng) 酶切 3~4 h。用 1% 的琼脂糖凝胶检测酶切结果。将合成的链 A(5'-

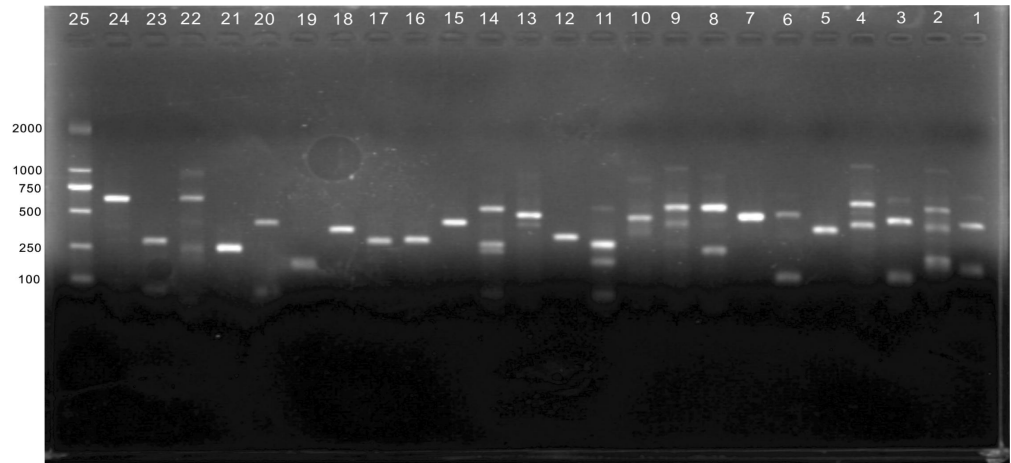


图 1 菌落 PCR 检测的琼脂糖电泳图谱(25 泳道为分子量标记: DNA maker DL2000)

Fig 1 Profile of the PCR amplification of screening of colony (Lane 25 is the DNA molecular maker: DL2000)

TAC TCA GGA CTC AT-3') 和链 B(5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3') 配成 20 pmol/ μ L 溶液。分别取链 A 和 B 溶液各 50 μ L 于 1.5 mL 离心管中混合。升温至 80 $^{\circ}$ C 后,变性 5~10 min。在室温下自然冷却 1 h,加 dd H₂O 配成终浓度为 10 pmol/ μ L 的接头溶液,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。用 T4 DNA 连接酶(New England Biolabs, 美国)将酶切产物与接头溶液于 16 $^{\circ}$ C 恒温下连接 5 h。以此连接产物为模板用简并引物 *Mse* I-N [5'-GAT GAG TCC TGA GTA A (N)-3'] 进行 PCR 扩增。检测接头连接结果。PCR 反应采用 25 μ L 体系:连接产物 2 μ L, 2.5 μ L 的 10 \times PCR Buffer(含 1.5 mmol/L MgCl₂), 0.3 μ L 10 mmol/L dNTP, 正反引物各 1.0 μ L(5 pmol/L), 1 U Taq DNA 聚合酶(TaKara, 大连), 用 ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 扩增反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 加热变性 1 min, 53 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.3.2 探针杂交、磁珠富集及文库构建

PCR 产物先 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后,与 0.5 μ mol/L 生物素标记 SSR 探针 (AC)₁₅ 和 (AG)₁₅、4 \times SSC、0.1% SDS 混合后在 48 $^{\circ}$ C 杂交 2 h。杂交液加至用 TEN₁₀₀(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH 值 7.5) 的平衡好 1 mg 链霉亲和素磁珠(New England Biolabs, 美国)混合液中,室温恒温振荡温浴 30 min,用磁架吸附管壁,将磁珠与混合液分离,弃混合液。然后依次用 TEN₁₀₀(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, pH 值 7.5) 漂洗 2 次,含 0.1% SDS 的 0.2 \times SSC 漂洗两次之后,加入 100 μ L TE 重悬磁珠,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后,迅速用磁架吸附管壁将磁珠与混合液分离,保存上清液。以获得的上清液为模板用简并引物 *Mse* I-N 进行 PCR 扩增,检测富集结果。PCR 反应体系和程序与 1.3.1 中检测接头连接时相同。富集良好的 PCR 产物用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit (TaKara, 大连) 回收纯化后,与 pMD19-T 载体(TaKara, 大连)连接过夜,然后转化到大肠杆菌(*E. coli* DH5 α) 感受态细胞中,构建微卫星富集文库。

1.4 文库筛选、测序、序列分析及引物设计

将带有目的片段的大肠杆菌感受态细胞涂抹于含有 Ampicillin (100 μ g/mL)、X-gal (50 mg/mL)、IPTG (0.1 mol/L) 的 LB-琼脂平板培养基上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取白色菌落于含 Ampicillin 的 LB 液体培养基中活化。以此活化菌液为模板,用载体通用引物和探针序列引物进行 PCR 扩增,筛选重组克隆。阳性克隆通过中国科学院高原生物适应与进化实验室 ABI 3730 xl 型基因测序仪(Applied Biosystems, 加拿大)进行 DNA

测序。

运用 CLUSTAL X、MEGA 和 DNAsp 对测定的序列进行分析,并加以手工校对^[14-16]。利用 SSRHunter 软件对获得的序列进行分析^[17],获得含有微卫星序列的片段。通过引物设计软件 Primer3 对获得的含有微卫星序列的片段进行引物设计^[18]。

1.5 SSR 标记引物多态性筛选

用高山绣线菊和蒙古绣线菊的 4 个野外居群(表 1) 进行 SSR 标记引物多态性筛选。PCR 反应采用 15 μ L 体系:10~100 ng DNA 模板,1.5 μ L 的 10 \times PCR Buffer(含 1.5 mmol/L MgCl₂), 0.15 μ L 10 mmol/L dNTP, 正反引物各 0.5 μ L(5 pmol/L), 0.5 U Taq DNA 聚合酶(TaKara, 大连), 用 ddH₂O 补足 15 μ L。PCR 扩增反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 加热变性 50 s, 51 $^{\circ}$ C~54 $^{\circ}$ C(不同引物在不同物种中的退火温度不同,表 2) 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 反应产物用 QIAxcel Advanced 高效毛细管电泳仪(QIAGEN, 德国)分析。

利用 GENEPOP version 4.0.10 计算每个位点的等位基因数量(number of alleles per locus) (*A*)、观察杂合度(observed heterozygosities; *H_o*)、期望杂合度(expected heterozygosities; *H_e*)^[19]。Hardy-Weinberg 平衡检测用确切性概率方法(exact probability test) 在 GENEPOP 中完成^[19, 20]。

2 结果与分析

2.1 含目的片段阳性克隆筛选、测序及引物设计

以菌液为模板,用 PCR 法共筛选单克隆。产生两条或两条以上的扩增条带含有插入片段的阳性克隆 262 个(如图 1 中泳道 1、2、3 等),随机挑选其中 120 个进行测序。对获得的 120 条序列进行比对分析,结果显示其中 111 条序列(92.5%) 为唯一序列,其他 9 条序列均为同一重复序列。SSRHunter 软件对 112 条序列共检测到 321 个微卫星位点,平均每个克隆含有 2.8 个微卫星位点。挑选其中 60 条序列用引物设计软件 Primer3 设计出 60 对引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。通过优化 PCR 反应体系和程序,其中 21 对引物能在高山绣线菊和蒙古绣线菊中成功扩增,其中 5 对引物在初期筛选中未呈现出多态性,其余 16 对多态性引物的序列及 GeneBank 登记号在表 2 中详细列出。

2.2 多态性标记筛选

用获得的 16 对多态性引物(表 2) 对高山绣线菊和蒙古绣线菊的 4 个居群的 92 个个体进行 PCR 扩增,PCR 产物用 QIAxcel Advanced 高效毛细管电泳仪分析。图 2 所示为引物 SA2 对绣线菊的 PCR 扩增产物的毛细管电泳图谱。

表 2 两种绣线菊部分有效扩增的微卫星引物
Table 2 Some microsatellite primerseffective for PCR amplification in two *Spiraea* species

位点	重复序列	引物序列		退火温度 T_a (°C)		登录号 GeneBank
		正向引物 F (5'-3')	反向序列 R (5'-3')	SA	SM	
SA1	(GA) ₂₉	ATGGCAGGAAGTATTGAATG	GAATGACACGCAATCTATCC	52	53	KC894821
SA2	(AG) ₁₇	TCCACCACAAGCCCAGTC	GAGTAACCCAATCACCACAG	53	53	KC894833
SA3	(AG) ₂₀	GTCAGCGTAATGCGGATG	CACAAGGCACCACATAGG	53	53	KC894822
SA4	(AG) ₁₆	GGAGATCGGCTGAAGAAG	CCACACCAATCACAACT	53	53	KC894823
SA5	(GA) ₁₅	TTCACATCCAAGCAGTCA	GGTAAGCATCCAAGTCCAT	52	53	KC894824
SA6	(TC) ₄₀	GGACTTCTGTTCATACCATA	GTCAGCGTAATGCGAATG	51	51	KC894825
SA7	(CT) ₈	TCAATCGCACGACAATCC	TGAAACCTCAAACCCCTAAT	53	53	KC894834
SA8	(TC) ₁₀	GCGTCCAAGACTAATCCA	ACCGCCTCAGAACTCACC	53	53	KC894835
SA9	(GA) ₅	ACGGACTGCGGAGAATG	CGCTCACAAACCCAATAACA	53	53	KC894836
SA10	(AG) ₂₇	GTGAAACGAGCTGAAGGT	GCCATCTTGGAGATATACGA	50	52	KC894826
SA11	(AG) ₃₀	CGAGGTGCTTCAAATTACAA	ATGGAGGAGGATGCTTAGT	53	51	KC894827
SA12	(AG) ₁₅	CAATCGAAGACTGAAGAAGAG	CCTGGTACTATAGCAATGGA	52	53	KC894828
SA13	(AG) ₃₀	CTGTTCAACCTACAATCCAA	CCAGATCCTAACTACTATCGT	51	54	KC894830
SA14	(TG) ₈	AGAATGCTCGCTACCTGC	GATGTTGCGGGCTTGCTAC	53	53	KC894832
SA15	(AG) ₁₈	GCTTGGACGGATGGAGAT	TCGCCAGTCTACTTGCTT	52	54	KC894829
SA16	(GA) ₂₀	CAGAGGGAAGGAGAAGTCA	TCCGTCCAAAGTCATCGT	50	50	KC894831

注: SA, 高山绣线菊 *Spiraea alpina*; SM, 蒙古绣线菊 *Spiraea mongolica*。

利用 GENEPOP 分析显示, 高山绣线菊(P1 和 P2) 中 16 个多态性位点的等位基因数(A) 在 3 ~ 18, 观察杂合度介于 0.043 ~ 0.870 之间, 期望杂合度的变化范围为 0.126 ~ 0.950。在蒙古绣线菊中, 这 3 个范围分别为: 4 ~ 30、0.040 ~ 1.000、0.544 ~ 0.968。基于确切性概率方法的 Hardy-Weinberg 平衡检测发现, 高山绣线菊和蒙古绣线菊的某些群体在多个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.05$), 其中两个物种在 SA2、SA6 及 SA10 三个位点都发生了显著偏离(表 3)。相比高山绣线菊, 蒙古绣线菊的两个居群在 11 个位点都发生了显著偏离。

3 讨论

磁珠富集法使得 SSR 阳性克隆的获得率大大提高, 传统的构建、筛选小插入片段基因组文库分离 SSR 遗传标记的方法中, 阳性克隆的获得效率较低, 只有 1% ~ 3%。多个研究表明磁珠富集法可以使得 SSR 阳性克隆的获得率提高至 50% ~ 60%^[21]。本研究选取 120 个进行测序的克隆中, 82 个含有微卫星序列, 获得率达到 68.3%。近来通过高通量测序获得海量 EST 序列(expressed sequence Tag), 基于 EST 序列大量开发 SSR 引物标记的方法正越来越引起人们的关注, 然而由于高通量测序的成本较高, 至少为磁珠富集法的 5 ~ 8 倍, 其在研究中

的应用还很有限。因此, 作为一种快速、高效而廉价的微卫星标记分离方法, 磁珠富集法在目前研究中得到广泛应用。此外, 本研究用 QIAxcel Advanced 毛细管电泳代替了传统的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 该系统采用即用型的预制胶卡夹, 能在最短的手工操作时间内分析 96 个样品, 减少了人为操作误差, 确保了便捷的数据分析和记录。

与多个其他类群的研究相比, 绣线菊的 4 个居群的平均等位基因数、平均期望杂合度及平均观测杂合度都比较高, 说明这 16 个位点在两种绣线菊中都具有较高的多态性, 可以用于后续的遗传多样性、物种进化与亲缘关系等方面的研究^[5]。微卫星多态性筛选中发现 64 个数据系列(4 个居群 × 16 个位点) 中 26 个显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。出现这种现象的可能是

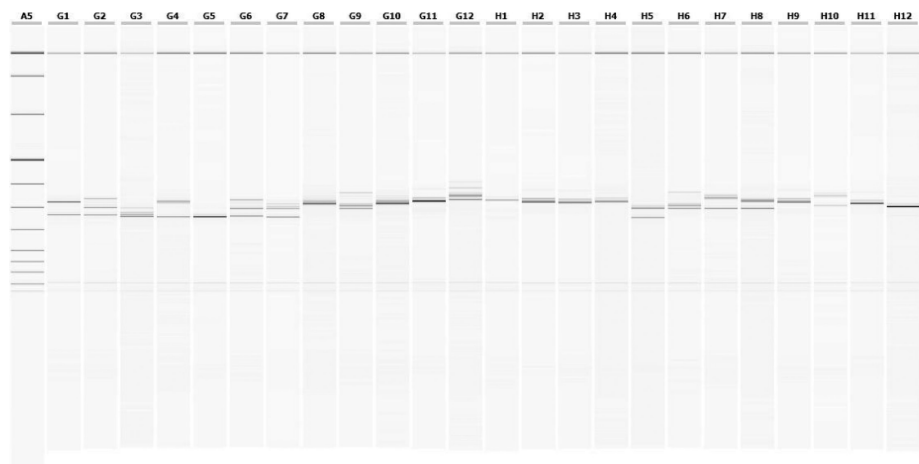


图 2 引物 SA2 部分 PCR 扩增产物 QIAxcel Advanced 高效毛细管电泳图谱
Fig 2 Profile of QIAxcel Advanced System with PCR production based on primer SA2

无效等位基因的存在。等位基因在理想群体中的频率是稳定的,无效等位基因的出现会引起等位基因频率

的改变,从而导致绣线菊的居群在这些位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡^[22]。

表3 两种绣线菊居群遗传参数统计结果

Table 3 Statistics of genetic parameters in *Spirea alpina* and *Spirea mongolica*

位点 Locus	每个位点的等位基因数量 A				观察杂合度 H_O				期望杂合度 H_E			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
SA1	15	10	06	07	0.600	0.570	0.250	0.518	0.810	0.800	0.740	0.630
SA2	03	04	18	25	0.000	0.087	1.000	0.700	0.250	0.126*	0.833*	0.940
SA3	14	08	13	10	0.860	0.870	0.650	0.040	0.830*	0.740	0.900	0.814
SA4	04	03	14	19	0.000	0.000	0.800	0.788	0.318	0.240	0.900*	0.888*
SA5	18	17	04	10	0.681	0.570	0.000	0.410	0.950	0.900	0.544	0.666
SA6	13	12	10	10	0.863	0.600	0.650	0.260	0.830*	0.863	0.824*	0.814*
SA7	10	07	11	13	0.681	0.820	0.800	0.741	0.818	0.776	0.850*	0.810
SA8	09	08	15	22	0.045	0.130	0.850	0.518	0.809	0.420	0.863	0.883
SA9	09	10	22	22	0.409	0.570	0.900	0.700	0.796	0.857	0.912*	0.841
SA10	13	08	25	30	0.455	0.470	1.000	1.000	0.763	0.590*	0.968*	0.963*
SA11	08	11	09	19	0.600	0.470	0.950	1.000	0.730	0.880	0.765*	0.888*
SA12	18	13	15	14	0.410	0.520	0.800	0.666	0.825	0.862	0.810*	0.800*
SA13	18	16	13	18	0.860	0.870	1.000	1.000	0.936	0.904	0.866*	0.880*
SA14	04	04	17	25	0.000	0.000	0.866	1.000	0.568*	0.652	0.913*	0.954
SA15	09	08	18	21	0.230	0.280	0.800	0.630	0.630	0.674	0.950*	0.910
SA16	03	03	18	20	0.000	0.043	0.700	0.333	0.248	0.270*	0.900	0.764
Mean	10.50	8.87	14.25	17.80	0.418	0.430	0.751	0.644	0.694	0.659	0.846	0.840

注: * 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

有研究利用桉树随机基因组序列设计的 SSR 引物,在桉树属不同种间通用性约为 78%^[23],在桃金娘科不同属间仍具有 30% 以上的通用性^[24]。利用玉米的 SSR 引物对棉花进行通用新分析发现,91% 的引物能够成功扩增^[25]。这是由于 EST-SSR 来源于编码区,因此在物种间具有很高的保守型。本研究是利用高山绣线菊的基因组 DNA 为材料进行 SSR 引物的开发,随机设计的 60 对引物中,21 对引物能在高山绣线菊和蒙古绣线菊中成功扩增,其中 16 对在两个物种中均呈现较高的多态性。这说明在两种绣线菊中 SSR 引物的通用性也较高,本研究开发的 16 对 SSR 引物在绣线菊属的遗传学研究中具有较高的价值。在对绣线菊属的其他物种开展研究工作中,可以从已获得的高山绣线菊微卫星富集文库中寻找合适的微卫星位点,从而减少开发成本和提高实验效率。

近来,利用 SSR 标记进行的遗传多样性分析多有报道。通过筛选苜蓿的 16 对多态性丰富的 SSR 引物获得了 190 个多态性位点,分析发现这些 SSR 引物能够较好地检测不同苜蓿材料的遗传多样性^[26]。利用自主开发的 52 对杉木 SSR 引物,对国家级杉木种质资源库保存的遗传材料分析表明 SSR 分子标记聚类的结果可为种质资源的管理及提高育种效率提供重要依据^[27]。因此,本研究开发的 SSR 多态性引物将为绣线菊遗传多样性分析、物种进化与亲缘关系、种质资源利用、育种群体的建立等奠定基础。

参考文献:

[1] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17 (16): 6463-6471.

[2] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1989, 44(3): 397-401.

[3] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12 (10): 4127-4138.

[4] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(7): 1071-1077.

[5] 姜立春, 彭正松, 阮期平. 微卫星 DNA 标记技术及其在植物研究中的应用 [J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(4): 654-657.

[6] Rassmann K, Schlötterer C, Tautz D. Isolation of simple - sequence loci for use in polymerase chain reaction - based DNA fingerprinting [J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(2/3): 113-118.

[7] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, et al. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(8): 3419-3423.

[8] Ashizawa K, Kimura M K, Takahashi A, et al. Development of microsatellite markers in a riparian shrub, *Spirea thunbergii* (Rosaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 2012, 99(7): e283-e285.

[9] 陆玲娣. 中国蔷薇科绣线菊亚科的演化, 分布——兼述世界绣线菊亚科植物的分布 [J]. *植物分类学报*, 1996, 34(4): 361-375.

(下转 87 页)

- [4] 宋荣浩, 濮祖芹. 太子参病毒病的防治途径[J]. 上海农业学报, 1994, 10(4): 59-62.
- [5] 温学森, 霍德兰, 赵华英. 太子参常见病害及防治[J]. 中药材, 2003, 26(4): 243-245.
- [6] 林丛发, 钟爱清, 魏泽平, 等. 太子参组培快繁技术研究初报[J]. 福建农业科技, 2002(6): 22.
- [7] 吴朝峰, 马雪梅, 林彦铨, 等. 太子参茎尖脱毒培养及增产效果[J]. 福建农林大学学报, 2006, 35(2): 130-133.
- [8] Drison M, de Boucaud M T, Pierronnet A, et al. Effect of cryopreservation on the sanitary state of acv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus [J]. *Plant Science*, 1997, 123: 189-196.
- [9] Helliot B, Panis B, Poumay Y, et al. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 20: 1117-1122.
- [10] Wang Q C, Munir M, Li P, et al. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L [J]. *Plant Science*, 2003, 165: 321-327.
- [11] Wang Q C, Liu Y, Xie Y H, et al. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) [J]. *Potato Research*, 2006, 49: 119-129.
- [12] Wang Q C, Valkonen J P T. Efficient elimination of sweetpotato littleleaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips [J]. *Plant Pathology*, 2008, 57: 338-347.
- [13] Wang Q C, Valkonen J P T. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 154: 135-145.
- [14] 蔡斌华, 张计育, 渠慎春, 等. 通过玻璃化超低温处理脱除草莓轻型黄边病毒(SMYEV)研究[J]. 果树学报, 2008, 25(6): 872-876.
- [15] Wang Q C, Wilmer J C, Minna-Liisa R, et al. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(2): 237-250.
- [16] Wang Q C, Jari P T V. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method [J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(3): 119-122.
- [17] 曲先. 低温疗法脱除马铃薯病毒及遗传变异分析[D]. 郑州: 河南大学, 2009.
- [18] 吴黎明, 曾继吾, 彭抒昂, 等. 香蕉茎尖的玻璃化超低温保存及其植株再生[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 501-506.
- [19] 宋荣浩. 太子参病毒病的病原鉴定及防治途径的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 1987.
- (上接 83 页)
- [10] Lu L D, Gu C Z, Li C L, et al. Rosaceae [M]. In Wu Z Y, Raven P H, Hong D Y eds. *Flora of China*. Beijing: Science Press & Missouri: Missouri Botanical Garden Press, 2003, 46-434.
- [11] Zhang F Q, Gao Q B, Zhang D J, et al. Phylogeography of *Spiraea alpina* (Rosaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau inferred from chloroplast DNA sequence variations [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2012, 50(4): 276-283.
- [12] 张发起, 高庆波, 段义忠, 等. 横断山区高山绣线菊的谱系地理学研究[J]. 广西植物, 2012, 32(5): 617-623.
- [13] Doyle J, Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19: 144-163.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [15] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular biology and evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [16] Rozas J, Rozas R. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data [J]. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 1995, 11(6): 621-625.
- [17] 李强, 万建民. SSRHunter, 一个本地化的 SSR 位点搜索软件的开发[J]. 遗传, 2005, 27(5): 808-810.
- [18] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3-new capabilities and interfaces [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(15): e115-e115.
- [19] Rousset F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(1): 103-106.
- [20] Guo S W, Thompson E A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles [J]. *Biometrics*, 1992, 361-372.
- [21] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(1): 1-16.
- [22] Reece W H, Pinder M, Gothard P K, et al. A CD4⁺ T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease [J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(4): 406-410.
- [23] Marques J F, Dehaene S. Developing intuition for prices in euros: rescaling or relearning prices? [J]. *Journal of Experimental Psychology: Applied*, 2004, 10(3): 148.
- [24] Yasodha R, Ghosh M, Sumathi R, et al. Cross-species amplification of eucalyptus SSR markers in *Casuarinaceae* [J]. *Acta Botanica Croatica*, 2005, 64(1): 115-120.
- [25] 李华盛, 范术丽, 沈法富. 从棉花 ESTs 数据库中筛选微卫星标记的初步研究[J]. 棉花学报, 2005, 17(4): 211-216.
- [26] 陈斐, 魏臻武, 李伟民, 等. 基于 SSR 标记的首蓿种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 草地学报, 2013, 21(4): 759-768.
- [27] 欧阳磊, 陈金慧, 郑仁华, 等. 杉木育种群体 SSR 分子标记遗传多样性分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, 38(1): 1-6.