



白芨 SSR 引物筛选及群体遗传多样性研究

黎 君¹, 杨 恒¹, 周天华^{1,2*}

(1 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001; 2 陕南秦巴山区资源生物综合开发协同创新中心, 陕西汉中 723001)

摘 要: 白芨(*Bletilla striata* Rchb.) 为中国珍稀濒危植物, 重要的药用植物。该研究基于 Illumina 测序技术构建白芨基因组文库和微卫星文库, 设计白芨微卫星引物, 用白芨 4 个野生种群 80 个个体对引物进行多态性检测, 应用 4 个白芨近缘种中进行引物的通用性检测, 并在此基础上分析了白芨的遗传多样性和遗传分化, 以探讨白芨的遗传结构和进化潜能。结果表明: (1) 白芨基因组中微卫星片断丰富, 共检测出 17 841 条微卫星片断。基于白芨微卫星库对 100 个位点设计了引物对, 经 PCR 扩增和检测筛选出能够稳定扩增的多态性位点 20 个, 每个位点的复等位基因数(N_a) 在 2~6 之间, 平均为 3.85; 20 对引物的大部分能够在 4 个白芨近缘种中成功扩增。(2) 白芨在物种水平有较高的遗传多样性($N_a=3.85$, $I=1.07$, $H=0.6147$), 白芨种群遗传分化强烈($G_{st}=0.43$), 居群间的基因流较弱($N_m=0.8676$), 居群聚类分析结果均表明地理距离较近的居群具有较近的遗传关系。

关键词: 白芨; 微卫星; 遗传多样性; 居群; 引物筛选

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

Microsatellite Primer Screening and Population Genetic Diversity of *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f.

LI Jun¹, YANG Heng¹, ZHOU Tianhua^{1,2*}

(1 College of Biological Science and Engineering, Shaanxi Sci-Tech University, Hanzhong Shaanxi 723001, China; 2 Qinling-Bashan Mountains Bioresources Comprehensive Development Collaborative Innovation Center, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

Abstract: *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. is an endangered plant in China with important medicinal value. In this study, the genomic sequence library and microsatellite library of *B. striata* was set up based on Illumina sequencing. SSR primers were designed and carried out to test their polymorphism with 80 individuals from 4 wild populations. Four related species of *B. striata* were used to investigate their cross-taxa transferability. In addition, genetic diversity and genetic differentiation of the species were also investigated. The results showed that: (1) Microsatellite sequences were abundant in the genome of *B. striata*, 17 841 loci were detected in total. 100 pair of primers were designed, 20 of them performed high polymorphism after PCR and polyacrylamide gelelectrophoresis, the alleles ranged from 2 to 6 with average of 3.85 per locus. The cross-taxa transferability was also examined in 4 related species, most of 20 loci were proved amplifiable in these species. (2) The study revealed that the genetic diversity of *B. striata* was high ($N_a=3.85$, $I=1.07$, $H=0.6147$), genetic differentiation was prominent among populations ($G_{st}=0.43$). The gene flow among populations was limited ($N_m=0.8676$), the adjacent populations performed

收稿日期: 2016-04-15; 修改稿收到日期: 2016-06-15

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划(2015JM3115); 秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心 2016 年度自然科学基金(QBXT-Z(P)-15-10); 陕西理工学院 2015 年研究生创新基金(SLG YCX1524); 陕西省科技厅项目(2015KTTSSF01-02)

作者简介: 黎 君(1990—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生态学研究。E-mail: lijun5525@163.com

* 通信作者: 周天华, 硕士生导师, 主要从事植物资源学研究。E-mail: 444721689@qq.com

tight genetic relationship as revealed by cluster analyses of populations. The reasons for genetic construction and conservational strategies of the species were also discussed in this study.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f.; microsatellite; genetic diversity; population; primer screening

白芨(*Bletilla striata* Rchb. f.)是兰科多年生草本植物,生长在海拔 100~3 200 m 的常绿阔叶林下,栎树林、路边草或岩石缝中。主要分布于四川、云南、陕西、湖北、甘肃等省份,全国各地有少量栽培。花紫红色或粉红色,可供观赏。白芨块茎含白芨胶质(粘液质)、淀粉、挥发油、葡萄糖等。以干燥块茎入药,味苦、甘、涩,性微寒,归肺、肝、胃经,具有收敛止血,消肿生肌的功能,主要用于治疗咳血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂、肺结核咳血、溃疡病出血等^[1-2]。此外,白芨还是优良的天然粘合剂,可作为工业糊料,用于浆丝绸、棉纱、精表装帧等。

白芨分布范围较广,野生资源比较丰富,但随着医药行业对白芨的进一步开发利用,市场需求量逐年增加,其野生资源遭到过度采挖,生态环境也因多种原因受到严重破坏,药材的后续供应已成为一个严重的问题,因此,白芨的人工栽培已成为解决白芨资源匮乏的必然选择,要选育出品种优良白芨,以及其真实性的检测成为当务之急。近几年来,中国学者在白芨的药理、有效成分和组织培养技术等方面开展了大量的研究,但对白芨遗传多样性的研究尚属空白。

简单序列重复(SSR, Simple Sequence Repeat),又称微卫星 DNA Microsatellite DNA(Litt and Luty 1989)^[3],是一类由 1~6 个碱基组成的基序串联重复而成的 DNA 序列。不同等位基因间的重复数存在丰富的差异,且重复序列两侧多是相对保守的单拷贝序列,可以通过设计特异引物,对基因组总 DNA 进行 PCR 扩增,扩增片段的长度多态性可用作分子标记。微卫星标记多态性丰富,重复性好,标记多呈共显性,在基因组中分散分布,现已证明微卫星 DNA 存在于绝大多数真核生物基因组中^[4],因此已广泛应用于遗传图谱构建、品种指纹图谱绘制、品种纯度检测及目标性状分子标记筛选等领域。特别在人类及哺乳动物的分子连锁图谱中微卫星标记已成为最重要的遗传标记之一,目前植物基因组中微卫星标记研究也非常活跃^[5]。植物 SSR 的分离及克隆先在几个热带树种^[6]上展开,其后扩展到大豆、水稻、小麦、油菜、西红柿、甜菜等作物上^[7]。

目前国内对白芨种质资源的研究局限于理化水

平、组培技术等方面,尚未深入到分子领域,可供使用的 SSR 引物很少,相关的分子标记也很少,难以满足对白芨的遗传多样性分析,资源评价以及混伪品鉴定的需要。本研究基于第二代测序技术建立白芨基因文库,开发白芨的微卫星(SSR)引物,并应用该分子标记技术对该物种进行群体遗传分析,并提出保护策略,为白芨这种重要资源植物的保护提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究选取白芨(*B. striata*)的新鲜块茎为实验材料。分别于 2014~2015 年采自陕西岚皋(LG)、陕西镇巴(ZB)、四川汉源(HY)和云南玉溪(YX)4 个白芨自然分布区(表 1),用于白芨引物开发和物种遗传多样性分析。此外,本研究还选取采自陕西留坝和云南的黄花白芨(*Bletilla ochracea*)、小白芨(*Bletilla formosana*)、华白芨(*Bletilla sinensis*)和绶草(*Spiranthes sinensis*)4 个近缘种(表 1)来检测引物的通用性。野外采集到新鲜叶片放入自封袋中加硅胶干燥,带回实验室在-80℃超低温冰箱中保存备用,并记录样品的海拔、经纬度、生境等信息。所有样品的凭证标本保存于陕西理工学院生物科学与工程学院植物分子生物学实验室。

1.2 方法

1.2.1 白芨 DNA 提取 采用改良 2×CTAB 法^[8]提取白芨 4 个野生居群 80 份个体的基因组 DNA,记录 DNA 浓度和 A₂₆₀/A₂₈₀ 吸光比值并用浓度为 1%琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性,凝胶成像仪拍照观察并记录结果。

1.2.2 白芨微卫星文库的建立 提取白芨全基因组 DNA,构建白芨基因组文库,采取 Illumina 二代测序技术获取大量 100 bp 短序列片段。

采用 CLC Genomics Workbench^[9] 软件进行片段组装,设置过滤参数为:片段长度大于 299 bp,序列平均覆盖率为 25 倍,初步筛选出适合微卫星位点开发的潜在序列集合。设置一定阈值,初步筛选出适合微卫星位点开发的潜在序列集合。基于筛选出的序列比对,导出一致性序列,以 fasta 格式保存成单一文件。以 SciRoKo v3.3^[10] 软件扫描上述文件,

表 1 白芨及其近缘种居群采样基本数据

Table 1 Detailed sample information of *B. striata* and *B. striata* closely related species populations

物种及居群 Population		采样地 Sample location	经纬度 Longitude and latitude	海拔 Altitude/m	样本数 Sample size
白芨 <i>B. striata</i>	LG	陕西岚皋 Langao, Shaanxi	107°55′ E, 32°56′ N	934~1171	20
	ZB	陕西镇巴 Zhenba, Shaanxi	109°26′ E, 32°06′ N	806~1197	20
	HY	四川汉源 Hanyuan, Sichuan	102°26′ E, 29°39′ N	768~1547	20
	YX	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	102°39′ E, 24°23′ N	1426~2105	20
黄花白芨 <i>B. ochracea</i>	WD	云南武定 Wuding, Yunnan	102°27′ E, 25°55′ N	2019~2311	10
小白芨 <i>B. formosana</i>	DL	云南大理 Dali, Yunnan	100°49′ E, 25°48′ N	1941~2367	10
华白芨 <i>B. sinensis</i>	MZ	云南蒙自 Mengzi, Yunnan	103°03′ E, 23°24′ N	1704~1856	10
绶草 <i>S. sinensis</i>	LB	陕西留坝 Liuba, Shaanxi	106°52′ E, 33°37′ N	1561~1593	10

统计出微卫星位点情况,包括各类重复位点数量、比例,对应原始序列名称等信息。二代测序建库工作由北京 NOVOGENE 生物科技公司代理完成。

1.2.3 白芨 SSR 引物设计 采用 Oligo 7^[11] 软件设计 SSR 引物 100 对。利用软件设计引物的时候必须遵循以下基本原则:①引物最好在模板 cDNA 的保守区内设计;(2)引物长度一般在 15~30 bp 之间;(3)引物的 GC 含量在 40%~60%之间, T_m 值最好接近 72;(5)引物自身及引物之间不应存在互补序列;(6)引物 5'端及 3'端 ΔG 的绝对值应该小于 4;(7)扩增产物的单链不能形成二级结构;(8)引物 3'端不能选择 A,最好选择 T;选取软件综合评分在 95 分以上的 35 对送往北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行引物合成。

1.2.4 PCR 扩增与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 总反应体系为 20 μ L,包括 DNA 模板 50 ng,2 $\times$ Mix(天根生物科技)10 μ L,正反引物各 50 ng, ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应在 PCR 扩增仪(Bio-Rad S1000TM)上按以下程序运行:首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度下 45 s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 45 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

完成 PCR 循环 48 h 内,取 2 μ L PCR 产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压 160 V 电泳 14 h。用 NaOH 银染方法进行染色显影。各种溶剂配方和体积为:银染液,AgNO₃ 1 g,去离子水 500 mL;显影液,NaOH 15 g,甲醛 2 mL,去离子水 500 mL。银染程序为:去离子水漂洗 30 s,银染 30 min,去离子水漂洗 30 s,在显影液中轻摇至显带。显影完成之后,用凝胶成像系统(Gel DOCTM XR+)采集图像并进行数据统计分析。

1.2.5 引物筛选及通用性检测 用 35 对引物对 4 个白芨居群的 DNA 进行检测,采用聚丙烯酰胺电

泳检测,电泳结束后,按照 NaOH 银染方法进行染色显影,并拍照保存。从 35 对引物中筛选出 20 对条带比较明显,且和预期长度相近的 SSR 引物。使用这些引物对白芨的 4 个近缘种进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,观测扩增产物及目标产物的杂合度。

1.2.6 白芨种群的遗传多样性分析 使用 Excel 2007 和 Bio-rad quantity 软件对电泳后的凝胶图像进行条带统计,采用人工读带的方式,记录主要带型,忽略弱杂带。应用 Powermarker 3.25^[12] 软件,计算各引物的等位基因数目(N_a),期望杂合度(H_e),观测杂合度(H_o),多态性信息含量(PIC)等(表 2)。应用 POPGENE Version 1.32^[13] 软件,分析各种群的平均复等位基因数(N_a)、遗传杂合度(N_e)、Nei's 遗传多样性指数(H)、Shannon 指数和遗传分化系数(F_{st})等(表 3)。应用 GenALEx 6.3 软件^[14] 进行 AMOVA 分析、各种群地理距离和遗传距离的相关性分析及居群主相关性分析。此外还使用采用 MEGA5.0 软件基于各居群的遗传距离进行 UPGMA 聚类。

2 实验结果

2.1 白芨微卫星文库

二代测序共返回 40 715 734 条 125 bp 配对序列,采用 CLC Genomics Workbench 软件进行组装得到 576 466 条拼接序列,用于后续分析;采用该软件进行片段组装,设置过滤参数为:片段长度大于 299 bp,序列平均覆盖率为 25 倍,初步筛选出适合微卫星位点开发的潜在序列集合,得到拼接序列数 23 906 条。虽然上述筛选后的组装序列平均覆盖率均达到 25 倍,但部分数据内部覆盖率不均匀,局部覆盖率较低。在此情况下,去除内部覆盖率低于 5 倍的区域,并将一致性序列分为若干“亚片段”,以

表 2 筛选的 SSR 引物的遗传分化参数

Table 2 The parameters of genetic differentiation among SSR primer pairs

SSR 位点 SSR locus	引物序列 Primer sequence(5'→3')		重复单元 Repeating unit	退火温度 Annealing temperature (T_A)/ $^{\circ}\text{C}$	预期长度 Expected range/bp	长度范围 Size range /bp	等位基因数 Number of alleles(N_a)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	多态信息量 Polymorphism information content (PIC)
	正向 Forward	反向 Reverse								
Bjssr01	GCCACTTACAATCATCAACCA	CGTAGCTTCTTCTTCTTCTTC	(GAA)5	56.30	258	252~264	5	0.675 0	0.607 5	0.522 4
Bjssr02	GGGTTGGCACTGGGGCGTTGT	CACCCAGCCGATGTACTT	(ACA)7	63.15	160	154~163	4	0.525 0	0.697 3	0.639 0
Bjssr03	TCTAGCACGAATCTCGATG	TGGATTGGGACAGGCTTAACT	(TC)11	57.15	187	185~191	4	0.500 0	0.550 6	0.497 4
Bjssr04	CTCTCTCAGTTTTAGGTGCAT	GAATCCGAACACATTTGGTAGT	(CA)12	56.30	213	209~217	5	0.575 0	0.593 2	0.537 8
Bjssr05	ACAAATGCACATCCCTAGTCAT	TGATGCACCCAGCCGATGTA	(ACA)8	59.30	170	167~173	3	0.400 0	0.478 7	0.425 8
Bjssr06	AAAGTCAGCAGCATCTACAGT	GAGCACGAGAAATAAGAACTCT	(TCCCC)5	56.30	171	171~177	2	0.412 5	0.468 5	0.357 2
Bjssr07	TGTGAGAGGGATGATAAGACT	TCCCAAAACCTAAGCCTCCGA	(AG)17	58.30	171	167~175	5	0.687 5	0.657 5	0.588 6
Bjssr09	AAAATGAGCCGATGACCTC	GCCAGTCCTCCAAGTTCACCA	(TC)16	59.15	231	227~233	4	0.350 0	0.752 6	0.700 7
Bjssr11	CAGCTAGTTTGCGTCCACA	CCCAACGCAATCCATCAGCT	(GAT)12	60.00	338	326~341	6	0.475 0	0.658 3	0.589 9
Bjssr13	GATTTCATGTAGCCGACCCAC	GTAGTAGCCCCATAATCTAAC	(TTG)6	59.30	170	167~173	3	0.487 5	0.603 9	0.533 0
Bjssr14	CAATGGGCAGTTTGTGGAGC	CCCACAGGAGGAACCTTGGTGT	(CAA)7	62.30	133	127~139	5	0.450 0	0.765 3	0.722 9
Bjssr15	GATCCTCATGCAGAAACCTAG	GCTTGTTTCCGTCGTCTATT	(TTG)7	58.15	193	187~196	5	0.450 0	0.736 4	0.682 3
Bjssr16	ACTTACCCGAAAACCTACC	CACCCAGCCGATGTACTTAG	(AAC)10	59.15	227	224~230	3	0.675 0	0.545 0	0.461 7
Bjssr17	CTCCGAAATCCCAAGCCCTA	AAGCCTACGAAGTCCAAGAT	(TC)16	59.00	134	132~136	3	0.700 0	0.597 5	0.511 2
Bjssr18	GATTTCATGTAGCCGACCCAC	CGTATTACACAGGATTACCAC	(TTG)9	59.30	194	191~197	3	0.450 0	0.612 9	0.525 8
Bjssr19	AACTGACTTTTCCAAACCCT	GGGAGAAACGGGAGAGATTTT	(TC)10	58.15	148	146~150	3	0.412 5	0.609 2	0.528 9
Bjssr20	CCAAAGTGTAAGATTCAACCG	TCCGTACTACTCCAACAC	(TTG)9	55.15	117	114~120	3	0.550 0	0.637 8	0.559 4
Bjssr22	CTGAATCGGATGCCCTAATTT	GCTTCATGTTGTACGGTTT	(TC)17	55.15	327	325~329	4	0.612 5	0.602 4	0.532 0
Bjssr23	TGAAGAGGAGGATGACACC	GGGTGGGAAAAAACACACT	(GAT)18	58.15	203	197~206	4	0.412 5	0.614 9	0.536 6
Bjssr24	CCTCAACAATCCCTTAACTCG	TACCCAGCCGATGTACTTAG	(AAC)7	59.30	232	229~235	3	0.487 5	0.581 5	0.504 6
平均 Mean							3.85	0.485 6	0.618 5	0.547 9

增加最终用于微卫星开发母序列的可靠性。最终,得到序列 17 841 条。基于筛选出的序列比对,导出一致性序列,以 fasta 格式保存成单一文件。以 SciRoKo v3.3 软件扫描上述文件,统计出微卫星位点情况,包括各类重复位点数量、比例,对应原始序列名称等信息。

2.2 微卫星引物多态性分析

利用 POPGENE Version 软件对筛选出的白芨微卫星位点进行群体遗传多样性分析,得到了等位基因数以及观察杂合度和期望杂合度等群体多态性信息。由表 2 和表 3 可知,20 对扩增成功的微卫星引物中检测到 2~6 个不等的等位基因数,平均等位基因数目为 3.85 个。多态性信息含量范围为 0.357 2~0.722 9。这些微卫星引物的 H_o 为 0.350 0~0.700 0,平均值为 0.485 6; H_e 为 0.468 5~0.765 3,平均值为 0.618 5。就单个引物位点而言,通常其 H_e 总是大于 H_o [15]。通过分析 H_o 和 H_e 值,说明各个群体之间存在较丰富的遗传多样性。

2.3 群体遗传多样性分析

筛选出的 20 对白芨微卫星引物能够成功扩增样品的 DNA(图 1);这些引物扩增产物的等位基因数目为 2~6 个,观察杂合度范围为 0.350 0~0.700 0,期望杂合度范围为 0.468 5~0.765 3,通过 AMOVA 分

析得出, G_{st} 为 0.43,说明有 57% 变异来自于种群内,有 43% 变异来自于种群间,种群间存在着显著的遗传分化。Mantel Test 检测结果(表 4)表明,白芨居群之间的遗传距离与其相应的地理距离无显著的正相关关系($r=0.294\ 3, P<0.01$)。

2.4 基于 SSR 标记的聚类分析

用软件进行聚类分析,构建 UPGMA 聚类树(图 2)显示,4 个白芨野生居群在遗传上有明显的差异,地理距离近的 LG 居群和 ZB 居群进化关系较近,而 YX 居群和其他 3 个居群进化关系较远。使用 GenAlEx 6.3 软件进行居群主相关性分析,结果(图 3)与 UPGMA 聚类分析的结果完全一致,4 个白芨野生居群完全分开。

表 4 白芨各居群间 Nei's 遗传距离(下三角)和遗传一致度(上三角)分析

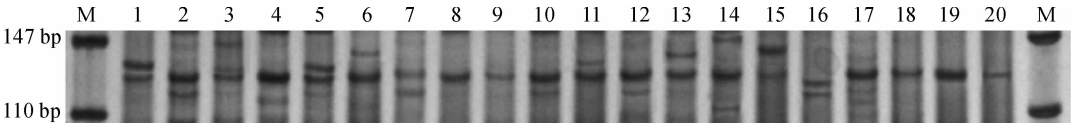
Table4 Nei's genetic distance(below diagonal) and genetic identity(above diagonal)					
居群 Population	LG	ZB	HY	YX	
LG	* * * *	0.723 4	0.674 4	0.681 0	
ZB	0.323 8	* * * *	0.650 7	0.646 9	
HY	0.393 9	0.429 7	* * * *	0.534 8	
YX	0.384 1	0.435 6	0.625 8	* * * *	

表 3 白芨居群间基因流及遗传分化参数

Table 3 The parameters of genetic differentiation and the estimates of gene flow among populations of *B. striata*

居群 Population	平均等位基因数 Number of alleles(N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles(N_e)	Shannon 指数 Shannon index (I)	基因多样性指数 Gene diversity index(H)
ZB	2.450 0	2.031 8	0.743 4	0.501 0
LG	2.400 0	2.039 8	0.750 8	0.502 9
HY	2.850 0	1.781 6	0.692 6	0.412 0
YX	2.450 0	1.999 1	0.738 6	0.492 9
种群水平 Population level	2.537 5	1.963 1	0.73 4	0.477 2
物种水平 Species level	3.85	2.712 5	1.078 0	0.614 7

注:居群代号同表 1;下同
Note: Population codes are same as in Table 1; The same as below



M, PUC-18;1~20. HY 居群个体

图 1 引物 Bjssr14 对四川汉源(HY)居群的 SSR 扩增
1~20. Samples of HY population

Fig. 1 SSR amplification products generated by the primer pairs Bjssr14 for HY(Sichuan hanyuan)population

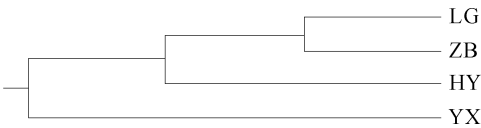


图 2 基于 Nei's 遗传距离的白芨自然居群的 UPGMA 聚类树

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *B. striata* populations using Nei's unbiased genetic distances

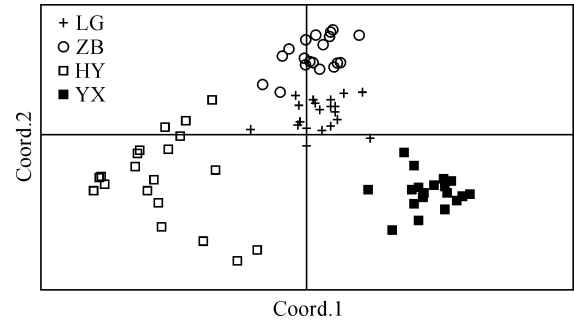


图 3 基于 GD 的白芨自然居群主相关性分析

Fig. 3 PCA analysis of *B. striata* populations using genetic distances

2.5 引物通用性检测

通过筛选得到 20 对能够稳定扩增且多态性丰富的白芨微卫星引物,使用这些引物对采集的 4 个白芨近缘种(华白芨、小白芨、黄花白芨和绶草)样本进行扩增,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增结果进行检测。结果表明,华白芨、小白芨和黄花白芨种群中,20 对引物均能检测出等位基因(表 5),供试的 40 份样品中 30 份能够检测出条带,因此,筛选出的引物可以在白芨属植物中通用,在兰科其他属中也有一定的通用性。

3 讨论

本研究通过对白芨 4 个野生居群的聚丙烯酰胺凝胶电泳实验,筛选出 20 对稳定性好,多态性信息位点丰富的 SSR 引物。对 80 份白芨野生种质资源的实验结果分析表明,20 对引物共获得 77 个等位变异点,平均每对引物 3.85 个,表明筛选出的微卫星引物多态性丰富。多态性信息含量(PIC)范围为

表 5 20 对引物对 4 个白芨近缘种的通用性检测(n=10)

Table 5 Universal detection of 20 pairs of primers among 4 *B. striata* closely related species

引物位点 SSR locus	检测出的等位基因 No. of alleles detected			
	华白芨 <i>Bletilla sinensis</i>	小白芨 <i>Bletilla formosana</i>	黄花白芨 <i>Bletilla ochracea</i>	绶草 <i>Spiranthes sinensis</i>
Bjssr01	2	1	1	—
Bjssr02	1	1	1	1
Bjssr03	2	1	1	—
Bjssr04	1	1	1	1
Bjssr05	1	1	2	—
Bjssr06	1	1	1	—
Bjssr07	2	2	1	1
Bjssr09	1	1	1	—
Bjssr11	2	1	1	—
Bjssr13	1	1	1	—
Bjssr14	1	2	1	1
Bjssr15	1	1	1	—
Bjssr16	1	1	1	1
Bjssr17	1	1	1	1
Bjssr18	1	1	1	1
Bjssr19	1	1	2	—
Bjssr20	1	1	1	1
Bjssr22	1	1	1	—
Bjssr23	1	2	1	1
Bjssr24	1	1	1	1

注: n. 每种群个体数;1. 观测到纯合子;2. 观测到杂合子
Note: n. Number of individuals; 1. Observed homozygote; 2. Observed heterozygote

0.357 2~0.722 9,平均值为 0.547 9,说明本研究构建的 SSR 标记体系对于 4 个白芨野生居群遗传多样性的分析十分有效。因为重复序列和包含 SSR 位点的侧翼序列在物种间具有保守性,所以通常一个物种的微卫星引物在同科不同属或者更近物种间具有适用性^[16]。提高微卫星利用率的一个办法是一旦微卫星位点在某一物种中分离并测序,它就可被用于近缘种的分析^[17]。本研究设计筛选的白芨 SSR 引物能够在 4 个白芨近缘种共 40 份样品中成功扩增,说明 SSR 引物通用性良好。因此,筛选出的白芨 SSR 引物能够被用于白芨群体遗传学分析的研究,同时也能够用于白芨属其他近缘物种的群体遗传学研究。这对于利用 SSR 分子标记对全国范围白芨野生种质资源的分析与评价,提供了科学依据。

自然界中,生物所表现出来的遗传多样性,其在本质上就是 DNA 的差异。因此通过分子手段来分析物种或群体遗传多样性更为直接,也更为准确。它直接分析遗传物质本身,是分析生物的基因型而非表现型,排除了环境因素给药材鉴定带来的干扰,也不受样品形态和材料来源的影响,比传统的方法更准确可靠。它不仅能区分相近物种,而且可以检测外型极为相似的同种不同变种、变型、品系、化学型乃至个体之间的 DNA 的细微变异。本研究利用 SSR 分子标记技术,发现白芨在物种水平上,观察杂合度范围为 0.350 0~0.700 0,期望杂合度范围为 0.468 5~0.765 3,多态性信息含量范围为 0.357 2~0.722 9,通过 AMOVA 分析显示,有 57% 变异来自于种群内,有 43% 变异来自于种群间,说明白芨在物种水平上的遗传多样性非常丰富。

有研究表明,在地理分布上受限的植物具有较

低的遗传多样性,相反,分布范围越广的物种具有越高的遗传多样性^[18-20]。白芨在物种水平上具有较高的遗传多样性,可能与白芨属植物的生活史和自然分布有关。白芨属植物大多分布在海拔 100~3 200 m 的常绿阔叶林下,栎树林、路边草或岩石缝中。该属植物属于起源比较晚的物种类别,分布区域较广,在四川、云南、陕西、湖北、甘肃、安徽等地的山区均有分布,并且多省均有大面积种植。一个物种对环境变化的适应能力主要取决于该物种是否具有丰富的遗传多样性,因此,虽然由于人为过度采挖以及自然变迁的影响导致白芨的自然资源稀少,但是该属植物频繁的基因交流使其具有丰富的遗传变异,使其能够很好地生存下来。

白芨(*Bletilla striata* Rchb. f.)是中国二级保护植物,也是重要的药用植物,野生资源枯竭,亟需保护。白芨在人工栽培条件下繁殖速度很慢,繁殖系数极低,尽管近几年对白芨的组织培养研究较多,在一定程度上缓解了需求增长与资源危机的矛盾,但因药材道地性观念的影响而造成的野生白芨与栽培白芨市场价格的悬殊,导致了人们对野生白芨的过度采挖,加上兰科植物的种子萌发率极低,自然繁殖困难,所以白芨野生资源较稀少,已被列入国家珍稀濒危保护植物名录,因此野生白芨种质资源的有效保育已刻不容缓。近年来,SSR 分子标记技术已被广泛应用于药用植物的遗传多样性分析^[21-23]。本实验运用 SSR 分子标记技术,对白芨的野生居群进行遗传多样性分析,结果显示,白芨居群具有较丰富的遗传多样性水平,从 DNA 水平上验证了白芨居群丰富的遗传变异能力,说明白芨具有较强的进化潜能,为后续白芨属植物资源的保护、利用和评价奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] 马立祥,赵 莹,毛子军,等. 不同氮素水平下增温及 CO₂ 升高综合作用对蒙古栎幼苗生物量及其分配的影响[J]. 植物生态学报, 2010, 34(3): 279-288.
MA L X, ZHAO M, MAO Z J, *et al.* Effects of elevated temperature and (CO₂) under different nitrogen regimes on biomass and its allocation in *Quercus mongolica* seedlings[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2010, 34(3): 279-288.
- [2] 扬春澍. 药用植物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 321-327.
- [3] TAUTZ D. Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 6 463-6 471.
- [4] LITT M, LUTY J A. A hypervariable microsatellite revealed by invitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1989, 44: 397-401.
- [5] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12: 4 127-4 138.
- [6] 陈佩度. 作物育种生物技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 134.
- [7] POWELL W, MACHRAY G C, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeat[J]. *Trends in Plant Sci-*

ence, 1996, 70: 45-54.

[8] 周天华. 中国特有属植物——马蹄香(*Saruma henryi* Oliv.)的分子谱系地理学与遗传多样性研究[D]. 西安: 西北大学, 2010.

[9] 朱大强, 李 存, 陈 斌, 等. 四种常用高通量测序拼接软件的应用比较[J]. 生物信息学, 2011, 9(2): 106-110.

ZHU D Q, LI C, CHEN B, *et al.* Comparison of the widely used high-throughput sequencing assembly software[J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2011, 9(2): 106-110.

[10] Robert Kofler, Christian Schlötterer, Tamas Lelley. SciRoKo: A new tool for whole genome microsatellite search and investigation[J]. *Bioinformatics*, 2007. 23(13): 1 683-1 685.

[11] 张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15-18.

ZHANG X Y,GAO Y N. To design PCR primers with Oligo 6 and Primer Premier 5[J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2004, 2(4): 15-18.

[12] LIU K, MUSE S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. *Bioinformatics*, 2005,21(9):2 128-2 129.

[13] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, *et al.* POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis [M]. Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada, 1997:997.

[14] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 6(1): 288-295.

[15] 李忠虎, 刘晓东, 王小琦, 等. 党参微卫星引物筛选及群体遗传多样性研究[J]. 中草药, 2013, 44(2): 210-214.

LI Z H, LIU X D, WANG X Q, *et al.* Microsatellite primer screening and population genetic diversity of *Codonopsis pilosula*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(2): 210-214.

[16] 陈怀琼,隋 春,魏 建, 等. 植物 SSR 引物开发策略简述[J]. 分子植物育种, 2009,7(4): 845-851.

CHEN H Q, SUI C, WEI J, *et al.* Summary of strategies for developing SSR primer [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(4):845-851.

[17] 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.

WANG L, ZHAO G F. Micro-satellite primers shared by different plant species and genera[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2005, 25(8):1 540-1 546.

[18] HAMRICK J L, GODT M J W. Allozyme diversity in plant species[C]// BROWN A H D, CLEGG M T,KAHLER A L, WIER B S, eds. Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. Sunderland, Mass: Sinauer; Sinauer Associates, 1990: 43-63.

[19] KARRON J D. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species[C]// FALK D A, HOLSINGER K E. eds. Genetic and Conservation of Rare Plants. USA: Oxford University Press, NY, 1991, 87- 98.

[20] HAMRICK J L, GODT M J W. Conservation genetics of endemic plant species[C]// AVISE J C, HAMRICK J E. Conservation Genetics: Case Histories From Nature. New York: Chapman and Hall, 1996, 281-304.

[21] 李凤岚, 马小军. 药用植物分子遗传图谱研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(1): 129-133.

LI F L, MA X J. Advances in studies on molecular linkage map in medicinal plants[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 2008, 39(1): 129-133.

[22] 葛淑俊, 孟义江, 李广敏, 等. 我国药用植物遗传多样性研究进展[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1 584-1 589.

GE S J, MENG Y J, LI G M, *et al.* Research progress on genetic diversity in Chinese medicinal plants[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2006, 37(10): 1 584-1 589.

[23] 吴天姝, 梁 翠, 李宏博, 等. 人参单一基因微卫星标记的分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(13): 2 650-2 660.

WU T S, LIANG C, LI H B, *et al.* Development of unigene derived microsatellite (UGMS) markers in *Panax ginseng*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(13): 2 650-2 660.

(编辑:宋亚珍)