

# 映山红多态性微卫星标记的跨物种扩增研究

王书珍, 骆 亮, 曾 宜, 金卫斌, 向 福, 方元平

(黄冈师范学院 生命科学学院, 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心, 湖北 黄冈 438000)

**摘 要:**以 4 个杜鹃花近缘种毛杜鹃(*R. pulchrum*)、西洋杜鹃(*R. hybrida*)、锦绣杜鹃(*R. alutaceum*)、羊躑躅(*R. molle* (Blume) G. Don)为试材,采用 PCR 方法,利用前期开发的映山红(*Rhododendron simsii*)多态性 SSR 标记进行跨物种扩增。结果表明:7 个微卫星标记能够跨物种利用,为探讨杜鹃属植物种间的亲缘关系、杜鹃属种群遗传多样性、分化潜力和方向研究奠定了基础。

**关键词:**杜鹃花;跨物种扩增;多态性;简单重复序列

**中图分类号:**S 685.18 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)03-0100-04

杜鹃花泛指杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendron*)常绿或者落叶灌木植物,为北温带植物区系的重要类群和世界著名高山花卉<sup>[1-2]</sup>。杜鹃花属是杜鹃花科中的一个属,约 900 余种,主要分布于欧洲、亚洲、北美洲,其中约 90%集中于亚洲。我国约有 650 余种,除新疆以外,全国各地都有分布,以西南和南部最多。最大的分布中心在我国的西南山区及相邻的缅甸北部和喜马拉雅山地区以及我国云南、四川和西藏地区<sup>[3-4]</sup>。

微卫星(microsatellite)又称简单重复序列(simple sequence repeat, SSR),是 1~6 个碱基串连重复的遗传标记,多态性高、重复性好、在基因组内广泛分布,因此被广泛用于物质的遗传多样性研究、遗传结构测定、亲缘关系分析、分子标记辅助育种等工作中<sup>[5]</sup>。然而,对于基因组没有测序的物种,微卫星位点的开发是利用合成的 DNA 探针对微卫星位点进行富集,费时费力,对操作人员的技术要求相对比较高。微卫星两端的侧翼序列在亲缘关系较近的物种间保守性较强,因此微卫星标记的跨物种利用就成为了可能,并已经取得了较好的效果<sup>[4-6]</sup>。

现利用从映山红(*Rhododendron simsii*)内开发的多态性 SSR 标记,对 4 个近缘种进行跨物种扩增,筛选可以在杜鹃属内转移利用的 SSR 标记,为杜鹃属植物的亲缘关系分析、进化潜力预测、基因流测定、分子标记辅助育种等研究提供 SSR 分子标记支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料毛杜鹃(*R. pulchrum*)、西洋杜鹃(*R. hybrida*)、锦绣杜鹃(*R. alutaceum*)、羊躑躅(*R. molle* (Blume) G. Don)4 个种的幼叶取自湖北龟峰山,自封袋封存后置于冰盒内带回实验室, -80℃ 保存备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 4 种杜鹃植物基因组 DNA 的提取 参照映山红基因组 DNA 的 3×CTAB 提取方法提取 4 种杜鹃的基因组 DNA<sup>[7-8]</sup>:0.3 g 幼叶加液氮研磨成粉末,并置于 650 μL 的 3×CTAB 提取液内于 65℃ 条件下水浴 30 min,期间每 5 min 颠倒混匀 1 次;加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混合液剧烈摇匀,离心 10 min (4℃, 12 000 r/min)取上清液;重复抽提 1 次,留取上清;加入 1 倍体积预冷的异丙醇及 0.1 倍体积预冷醋酸钠(pH 5.2), -20℃ 沉淀 1 h;离心 10 min (4℃, 12 000 r/min),弃上清留沉淀部分;用 70% 乙醇溶液冲洗沉淀 3 次,风干;加入 40 μL 无菌蒸馏水溶解;将浓度调整到 100 ng/μL 后于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 映山红多态性 SSR 标记的筛选 课题组前期构建了(AG)<sub>n</sub> 富集文库,并从中开发了 54 对 SSR 引物<sup>[8]</sup>。经南京金斯瑞生物科技公司合成,稀释到 10 ng/μL 并置于 -20℃ 保存备用。以文库构建时采用的映山红 DNA 为模板,检测引物的扩增效率,设置梯度 PCR 摸索每对

**第一作者简介:**王书珍(1984-),女,博士,讲师,现主要从事植物遗传学等研究工作。E-mail:wangshuzhen04@163.com

**责任作者:**方元平(1965-),男,本科,教授,现主要从事植物分类和生态学等研究工作。E-mail:wangshuzhen710@whu.edu.cn

**基金项目:**黄冈师范学院博士启动基金资助项目(2013030903);经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室开放基金资助项目(2013000403);大别山特色资源开发湖北省协同创新中心团队资助项目(2015TD07)。

**收稿日期:**2015-10-15

引物的最适退火温度。基于最适退火温度,以龟峰山 20 份不同海拔高度形态差异明显的映山红品系为材料,经 PCR 扩增和 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,筛选多态性 SSR 标记。

1.2.3 映山红多态性 SSR 标记的跨物种扩增 利用映山红多态性 SSR 标记对 4 份近缘种 DNA 进行扩增。扩增体系 12  $\mu$ L,包括 6  $\mu$ L 2 $\times$ PCR Master Mix,100 ng/ $\mu$ L DNA 模板,0.3  $\mu$ L 上下游 SSR 引物,其余体系用灭菌的去离子水补齐。PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;35 个扩增循环(94 $^{\circ}$ C 变性 35 s,最适退火温度下退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s);72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。PCR 扩增产物在 2.5% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 映山红多态性 SSR 标记的筛选

在设计合成的 54 对映山红 SSR 标记中,8 对无扩增产物,3 对扩增大小与预期相差较大(大于 50 bp),7 对扩增产物带型特异性差,仅 36 对引物扩增出了预期大小的特异性 DNA 片段。在多样性检测中,22 对引物扩增的条带单一无多态性,而 14 个 SSR 标记的扩增产物是多态性的,至少含有 2 个等位基因。将多态性信息上传 NCBI 数据库,并获得相应的编号,见表 1。引物的长

表 1 筛选的 14 个多态性微卫星标记的特征

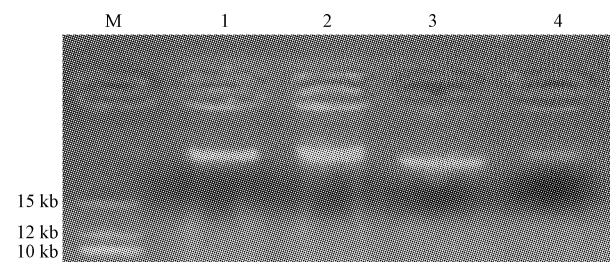
Table 1 Characteristics of 14 polymorphic SSR primer pairs

位点 Locus	GenBank No.	序列信息(5'-3') Primer sequence (5'-3')	基序 Motif	退火温度 $T_a/^{\circ}$ C	片段大小 Size/bp
W-SSR1	KP260545	F:CGACGGTGTCTGCTAATAA R:GCAGCCCTTATCTCTGTATT	(GA)40	59	208~240
W-SSR2	KP260546	F:CCACCACTGAAGCCTAAACGA R:CATTGCAGACATTGCGAAGC	(AG)21	59	114~140
W-SSR3	KP260547	F:GATGAGTCTGTAGTAACC R:TACTCCCCAACCCCTGTCT	(AG)33	56	123~151
W-SSR4	KP260548	F:CTTGGTGTCTACTATGTGT R:TACTTCGGTATGGGTGTT	(CT)28	59	112~154
W-SSR5	KP260549	F:AGACGACGATGAAGGAGA R:GTCAGGCGTAAGTTCAGTA	(AG)28	57	220~260
W-SSR6	KP260550	F:TGAGTAACCAAGCGGTGGA R:GTAAGGAATGTGACCATGCCG	(AG)21	59	211~256
W-SSR7	KP260551	F:GCTTTACGAATTAGGGTCTGG R:CTGAGTAAGTGGGCAACTCGT	(GA)30	59	180~213
W-SSR8	KP260552	F:CCCTTTTCGGCTACAACAAT R:GAGTAACCCGTTTACTGTGG	(TC)20	55	84~104
W-SSR9	KP260553	F:CGCAGAATGGACAAACCC R:CACGCACAGTCACAAGCAC	(GA)32	59	149~164
W-SSR10	KP260554	F:TCTGGGTGTTATTTTGTGCC R:TCTGCGCATTTGGGAGTATTT	(GA)23	59	170~204
W-SSR11	KP260555	F:CGTAAAGTGGAGTTGTGAGA R:GATGAGTCCTGAGTAATGT	(CT)26	55	164~190
W-SSR12	KP260556	F:ACACAACAGGCCCATATT R:AACCATTTGGGAGGAGAAC	(TC)29	55	120~168
W-SSR13	KP260557	F:TGAGTAACAAGGTGAAGTC R:TAAGGTGGATAGGCAAGT	(GA)27	55 $^{\circ}$ C	240~270
W-SSR14	KP260558	F:CTGAGTAATGGAGCAAAACC R:GAGTAGAATGGCATGAGGAG	(AG)22	59 $^{\circ}$ C	143~147

度范围为 18~21 bp。微卫星基序 AG/CT 重复次数为 20~40 次,重复次数最少的为 KP260552 位点(20 次),而 KP260545 重复次数最多(40 次)。最适退火温度范围为 56~59 $^{\circ}$ C。多态性 SSR 标记所在的 DNA 片段大小均小于 300 bp,最小的片段为 W-SSR8 标记扩增的 84 bp 片段,而最大的为 W-SSR13 扩增的 280 bp 的 DNA 片段。

### 2.2 4 种近缘物种基因组 DNA 的提取检测

利用优化的映山红基因组 DNA 提取方法(3 $\times$ CTAB)成功提取了 4 种近缘物种基因组(图 1)。凝胶上的 DNA 条带亮度较低,可能与杜鹃属植物基因组较小有关。作为灌木植物的杜鹃,其细胞内酚类物质、多糖、色素等含量较高,也影响了核酸的提取。在提取过程中仍然有部分 DNA 降解的发生,后续仍需优化提取方法。点样孔仅少许蛋白,前期工作经验表明低浓度蛋白质残留不影响后续 PCR 扩增效率。经分光光度计对 DNA 进行定量分析,4 种杜鹃的核酸量分别为 125、117、108、132  $\mu$ g/mL,调整到 100 ng/ $\mu$ L 备用。



注:M,DNA Marker;1~4 分别代表毛杜鹃 *R. pulchrum*、西洋杜鹃 *R. hybrida*、锦绣杜鹃 *R. alutaceum*、羊躑躅 *R. molle* (Blume) G. Don。

Note:M,referred to DNA Marker;1-4 were *R. pulchrum*, *R. hybrida*, *R. alutaceum*,and *R. molle* (Blume) G. Don,respectively.

图 1 4 个杜鹃的基因组 DNA 电泳检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from four different *Rhododendron* species

### 2.3 映山红多态性 SSR 标记的跨物种扩增结果

由表 2 可知,在对 4 个映山红近缘种属的跨物种扩增检测中,5 个 SSR 标记(W-SSR1、W-SSR2、W-SSR6、W-SSR7、W-SSR9)能够成功在 *R. pulchrum* 的基因组 DNA 内跨物种转移;5 个 SSR 标记(W-SSR2、W-SSR6、W-SSR7、W-SSR10、W-SSR14)以及 7 个标记(W-SSR1、W-SSR2、W-SSR6、W-SSR7、W-SSR9、W-SSR10、W-SSR14)则分别能够在 *R. hybrida* 和 *R. alutaceum* 基因组内跨物种扩增;在 *R. molle* (Blume) G. 基因组内能够成功扩增的 SSR 分子标记为 W-SSR1、W-SSR2、W-SSR6、W-SSR7 和 W-SSR9。W-SSR2、W-SSR6 和 W-SSR7 3 个标记的转移效率最高,在 4 种杜鹃中均可以成功跨物种扩增。对扩增产物进行切胶回收,测序后发现 4 个近缘种属内的 SSR 位点和侧翼序列与映山红的位点序列信息大体

一致,仅 *R. hybrida* 的 W-SSR10 位点以及 *R. molle* (Blume) G. 的 W-SSR7 和 W-SSR9 位点出现了异源同形现象。

表 2 多态性 SSR 标记跨物种扩增结果

Table 2 Cross-amplification of polymorphic SSR markers

位点 Locus	跨物种扩增 Cross-amplification			
	毛杜鹃 <i>R. pulchrum</i>	西洋杜鹃 <i>R. hybrida</i>	锦绣杜鹃 <i>R. alutaceum</i>	羊躑躅 <i>R. molle</i> (Blume) G. Don
W-SSR1	+	—	+	+
W-SSR2	+	+	+	+
W-SSR3	—	—	—	—
W-SSR4	—	—	—	—
W-SSR5	—	—	—	—
W-SSR6	+	+	+	+
W-SSR7	+	+	+	+
W-SSR8	—	—	—	—
W-SSR9	+	—	+	+
W-SSR10	—	+	+	—
W-SSR11	—	—	—	—
W-SSR12	—	—	—	—
W-SSR13	—	—	—	—
W-SSR14	—	+	+	—

### 3 讨论

在物种遗传多样性检测、遗传连锁图谱构建、基因定位、种质鉴定及系谱分析以及分子标记辅助育种等领域中,微卫星由于其分布广泛、易检测、进化保守、信息含量丰富、共显性遗传等特点而得到广泛应用。微卫星标记应用过程中限制因素是微卫星引物的开发<sup>[9]</sup>。目前微卫星标记获得的途径如下:1)基于 GenBank、EMBL 和 DDBJ 等公用 DNA 序列数据库信息开发微卫星标记;2)利用微卫星探针富集富含 SSR 位点的序列而建立的部分基因组文库法;3)近缘物种之间的转移<sup>[10]</sup>。通过公共数据库获得微卫星标记简便易行,但对大部分物种而言数量有限。通过基因组文库获得微卫星标记,成本高、工作量大、假阳性比例较高。因此,近缘物种之间的标记转移则显得最经济方便。

微卫星标记跨物种转移容易出现异源同形现象(size homoplasy),即微卫星位点的 PCR 扩增产物长度相同但遗传组成不完全相同的现象,异源同形现象会随着物种分歧时间的延长而有增加的趋势<sup>[6,11-13]</sup>。在该研究中,西洋杜鹃和羊躑躅在部分位点也出现了异源同形现象,而毛杜鹃和锦绣杜鹃在检测位点处没有此现象,这

可能与西洋杜鹃及羊躑躅与映山红的亲缘关系相对较远有关。微卫星跨物种 PCR 扩增还可能出现非同源(non-orthologous)扩增现象,但在该研究中没有出现。

该研究利用从映山红 *R. simsii* 基因组 DNA 内开发的 14 对多态性 SSR 标记进行跨物种扩增检测,进行杜鹃属植物的分类、进化历史、遗传多样性、遗传结构研究。映山红 7 个微卫星标记可以在近缘物种内得到对应的扩增产物,其中 3 个能够在 4 个物种内转移,表明杜鹃属内的物种之间亲缘关系较近。然而,这 7 个标记在近缘物种内的多态性情况仍需进一步检测。

### 参考文献

- [1] 康用权,彭春良,廖菊阳,等. 湖南杜鹃花资源及其开发利用[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(8):57-63.
- [2] 鲜小林,陈睿,秦帆,等. 四川杜鹃花资源调查及其育种意义研究[J]. 北方园艺,2012(2):92-96.
- [3] 方瑞征,闵天禄. 喜马拉雅山脉的隆升对杜鹃属区系形成的影响[J]. 云南植物研究,1981,3(2):1-3.
- [4] WANG X, HUANG Y, LONG C. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the genus *Rhododendron*[J]. Hortscience, 2010, 45(9):1394-1397.
- [5] WANG S Z, PAN L, HU K, et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica charantia* (Cucurbitaceae)[J]. American Journal of Botany, 2010, 97(8):e75-e78.
- [6] 卜兴江,聂刘旺. 中华鳖多态性微卫星标记跨物种扩增研究[J]. 生物学杂志, 2013, 30(1):27-30.
- [7] 王书珍,张传进,查三省,等. 杜鹃基因组 DNA 提取方法的研究及应用[J]. 林业科技通讯, 2015(2):5-8.
- [8] 王书珍,金卫斌,项俊,等. 杜鹃基因组微卫星富集文库的构建[J]. 湖北农业科学, 2015(3):627-630, 635.
- [9] HAKKI E E, AKKAYA M S. Microsatellite isolation using amplified fragment length polymorphism markers; no cloning, no screening[J]. Mol Ecol, 2000(9):2152-2154.
- [10] 郭大龙. 植物微卫星引物开发方法[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(18):5361-5363.
- [11] JAVED A M, CANNON C H, WICKNESWARI R. Microsatellite DNA markers in *Shorea platyclados* (Dipterocarpaceae): genetic diversity, size homoplasy and mother trees[J]. Journal of Forest Science, 2014, 60(1):18-27.
- [12] ZHANG L, WANG H, BAO L, et al. Size homoplasy in nuclear microsatellites for *Fraxinus mandshurica* (Oleaceae)[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2014, 49(1):114-119.
- [13] ANMARKRUD J A, KLEVEN O, BACHMANN L, et al. Microsatellite evolution: mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10[J]. BMC Evolution Biology, 2008(8):138.

## Study on Cross-species Amplification of Polymorphic Simple Sequence Repeat Markers From *Rhododendron simsii*

WANG Shuzhen, LUO Liang, ZENG Yi, JIN Weibin, XIANG Fu, FANG Yuanping

(College of Life Science/Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000)



# K<sup>+</sup> 诱导的洋葱细胞凋亡研究

赵锦慧, 古红梅

(周口师范学院 生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

**摘 要:**以洋葱为试材,采用显微观察法,研究了不同浓度的 K<sup>+</sup> 在不同处理时间下对洋葱鳞茎内表皮细胞凋亡的影响。结果表明:不同浓度的 K<sup>+</sup> 处理洋葱鳞茎内表皮 1 h 后出现细胞凋亡现象,随着 K<sup>+</sup> 浓度的升高及处理时间的延长,细胞凋亡现象更明显,细胞凋亡率及细胞内丙二醛含量均上升。

**关键词:**K<sup>+</sup>; 洋葱鳞茎; 细胞凋亡; 丙二醛含量

**中图分类号:**Q 942 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)03-0103-03

细胞凋亡现象最初是在动物细胞中发现的,目前对动物细胞凋亡的机制已经了解比较清楚。而对植物细胞凋亡的研究开始较晚,虽然有关植物细胞凋亡的研究时有报道<sup>[1-6]</sup>,但对其机制了解仍不深入,对植物细胞凋亡发生过程的描述及生理变化研究也较少。现通过观察 K<sup>+</sup> 不同处理浓度与处理时间组合下洋葱鳞茎内表皮细胞凋亡的形态学表现、统计细胞凋亡率、测定丙二醛含量,探索 K<sup>+</sup> 对细胞凋亡的诱导作用,并为探索植物细胞的凋亡机制提供新的途径与方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料隔年洋葱购于周口市农贸市场。

### 1.2 试验方法

1.2.1 洋葱的复苏培养 取隔年洋葱,剥去外皮,剪掉老根,室温下置于盛有清水的烧杯中培养,每天换水,当露出幼嫩的白根,表明洋葱已经复苏。

1.2.2 试验处理设置及细胞形态特征观察 取经过复苏培养的洋葱,切取 0.5 cm<sup>2</sup> 的内表皮若干。分别用 0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L 的 K<sup>+</sup> (KCl) 处理内表皮 1 h 和 7 h 后,取出放于标记好的烧杯中,再经改良苯酚品红染

色后,压片观察。以 0 mol/L K<sup>+</sup> 处理为正对照,取正对照中一部分内表皮放入烧杯内,加水煮沸 10 min,使细胞呈坏死态为负对照,各处理均设置 3 个重复。光学显微镜下比较凋亡细胞与正常细胞(正对照)、坏死细胞(负对照)在形态学上的异同,对细胞形态特征拍照,并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%) = 凋亡细胞数/视野中观察的细胞总数 × 100。

### 1.3 项目测定

采用硫代巴比妥酸法<sup>[7]</sup>测定细胞中丙二醛(MDA)含量,试验设置 3 个重复。

### 1.4 数据分析

采用 Excel 2007 作图,应用 SPSS 16.0 统计软件分析数据,采用 Duncan 法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 对照细胞形态特征观察

由图 1 可知,正对照细胞轮廓分明,细胞膜完整,染色均匀,细胞质均匀透明,细胞核呈球形,细胞结构完整(图 1A);负对照细胞轮廓消失,细胞之间的界限不存在,细胞膜、细胞壁完全裂解,细胞核形状发生明显变化,细胞不能保持结构的完整(图 1B)。

### 2.2 不同浓度 K<sup>+</sup> 处理 1 h 后细胞形态特征观察

由图 2 可知,细胞发生不同程度的质壁分离,细胞质内出现碎末状或块状物质,细胞膜皱缩,部分细胞核不完整,并且出现空泡,细胞背景不干净。

**第一作者简介:**赵锦慧(1979-),女,硕士,讲师,研究方向为生物技术及植物逆境生理。E-mail:zhaojinhui2005@126.com。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(41271280)。

**收稿日期:**2015-09-22

**Abstract:** Taking four related species, including *R. pulchrum*, *R. hybrida*, *R. alutaceum* and *R. molle* (Blume) G. Don as materials, cross-species amplification of polymorphic SSR markers developed from *R. simsii* were carried out by PCR method. The results showed that seven markers could successfully amplify in these four related species, which would be useful to investigate species phylogeny, population genetic diversity, differentiation potential of *Rhododendron* species.

**Keywords:** *Rhododendron*; cross-species amplification; polymorphic; simple sequence repeat