

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201603025

引文格式: 王久利, 雷淑芸, 陈世龙, 等. 基于磁珠富集法开发并筛选西川红景天的微卫星标记 [J]. 广西植物, 2017, 37(3): 342-347  
WANG JL, LEI SY, CHEN SL, et al. Development and screening of SSR markers in *Rhodiola alsia* with magnetic beads method [J]. *Guihaia*, 2017, 37(3): 342-347

# 基于磁珠富集法开发并筛选西川红景天的微卫星标记

王久利<sup>1,2</sup>, 雷淑芸<sup>1,2</sup>, 陈世龙<sup>1</sup>, 张发起<sup>1\*</sup>

(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. 中国科学院大学, 北京 100039)

**摘要:** 利用 FIASCO 磁珠富集法, 开发和筛选青藏高原特有珍贵植物西川红景天 (*Rhodiola alsia*) 多态性微卫星标记。结果表明: 用 (AG)15 和 (AC)15 两种微卫星标记探针构建富集文库, 共获得阳性克隆约 2 500 个; 从中随机挑取 1200 检测, 发现具有多态性的阳性克隆达 400 个; 随机挑取 200 多态性的阳性克隆进行测序, 从中获得 105 个 SSR 位点, 用在线软件 primer3-2.3.4 成功设计得 SSR 引物 105 对; 其中 45 对可以成功扩增, 而 13 对所扩增的片段在相距较远的 4 个自然居群的 24 个个体中显示较高的遗传多态性。用 4 个居群的 80 个个体检测这 13 对引物发现, 平均等位基因数 (A) 约为 9.192, 观测杂合度 ( $H_o$ ) 和期望杂合度 ( $H_e$ ) 均值分别为 0.712 和 0.734, 如此高的多态性已经满足后期研究的需要; 数个位点在某些居群中显著偏离哈迪温伯格平衡 ( $P < 0.01$ ), 这可能是实际研究的居群并不能达到哈迪—温伯格定律所假设的无限大等理想状态所致。结合此前基于表达序列标签 (Expressed Sequence Tag, EST) 序列开发的 SSR 多态性位点, 该研究结果为今后利用 SSR 位点开展西川红景天的居群遗传结构分析和其他研究提供了一组有效工具。

**关键词:** 西川红景天, 微卫星, 引物, 磁珠富集法, 开发

中图分类号: Q941, Q948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)03-0342-06

## Development and screening of SSR markers in *Rhodiola alsia* with magnetic beads method

WANG Jiu-Li<sup>1,2</sup>, LEI Shu-Yun<sup>1,2</sup>, CHEN Shi-Long<sup>1</sup>, ZHANG Fa-Qi<sup>1\*</sup>

(1. Key laboratory of Adaption and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** FIASCO magnetic beads method was utilized to develop polymorphic SSR markers of *Rhodiola alsia*, a precious species endemic to the Qinghai-Xizang Plateau. Two SSR marker probes, (AG)15 and (AC)15, were used to construct enriched SSR library and 2 500 positive clones were obtained. Then 1 200 positive clones were randomly selected to check and within which 400 clones were found with polymorphism. Half of the polymorphic clones were randomly chosen for sequencing and 105 SSR loci were achieved. Subsequently, 105 pairs of primers were designed by online software, primer 3-2.3.4, for amplifying the SSR sequences. Among which, a total of 45 pairs of primers were positive for amplification and the sequences amplified by thirteen pairs showed high genetic polymorphism when detected in four far apart natural populations with 24 individuals. Afterwards, the whole of 80 individuals in the four populations were employed to check the thirteen SSR loci. The average number of alleles per locus (A) was around 9.192, the mean of ob-

收稿日期: 2016-04-29 修回日期: 2016-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(31400322); 青海省国际科技合作项目(2014-HZ-812) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400322); International Scientific and Technological Cooperation Program of Qinghai Province(2014-HZ-812)]。

作者简介: 王久利(1991-), 男, 安徽泗县人, 博士研究生, 主要从事植物遗传多样性研究, (E-mail) wang\_jiuli@163.com。

\*通信作者: 张发起, 博士, 副研究员, 主要从事高山植物的适应与进化研究, (E-mail) fqzhang@nwipb.cas.cn。

served heterozygosity ( $H_o$ ) and the expected heterozygosity ( $H_e$ ) were around 0.712 and around 0.734, respectively. Such an extraordinary polymorphism was enough to meet the needs of future research. However, several loci were significantly deviated from Weinberg-Hardy equilibrium ( $P < 0.01$ ) in some populations, which may be due to the fact that the population of the actual study could not reach the ideal state of Weinberg-Hardy's law. Combining SSR polymorphic loci developed previously based on EST (Expressed Sequence Tag) sequences, this study provides a set of serviceable tools for population genetic structure analysis on *R. alsia* and other researches based on SSR markers.

**Key words:** *Rhodiola alsia*, SSR, primers, magnetic beads method, development

西川红景天 (*Rhodiola alsia*) 是景天科 (Crassulaceae) 的青藏高原特有种, 主要分布于青海南部、西藏东南部、四川西北部和云南西北部, 海拔 3 400~4 800 m 的河漫滩、山坡石隙及流石坡地 (Fu & Ohba, 2001)。西川红景天的独特生境使其附近伴生植物非常稀少, 因此其在高海拔的生态环境中占据举足轻重的地位。而包括西川红景天在内的多种红景天属 (*Rhodiola*) 植物是一类重要的民族药材。传统医药典籍记载, 红景天具有清热、治肺病、滋补元气、抗高原反应等功效; 药理学研究发现, 红景天对衰老、疲劳、缺氧、不良刺激、病毒乃至肿瘤等具有抵抗功能, 并且有双向调节机体、影响学习记忆、保护骨骼系统等御病保健作用 (顾艳丽等, 2003; 王强等, 2007)。然而, 红景天在医药、保健领域的广泛使用导致了大量市场需求, 也在一定程度上使作为红景天基原植物的西川红景天等植物处于濒危之境 (姜爱玲和张岩, 2015)。

微卫星 (microsatellite, SSR) 发现于 20 世纪 70 年代, 而 SSR 分子标记由 Litt 创建于 1989 年, 在此后的近三十年里, SSR 分子标记的研究与应用得到了长足发展。SSR 因其优于 RAPD、ISSR 和 AFLP 等分子标记的共显性和高重复性 (Wang & Szmidt, 2001) 而广泛应用于遗传变异分析、物种起源进化、基因定型、指纹鉴定、遗传图谱构建、法医科学、微生物分型和动植物遗传育种等诸多研究领域 (何平, 1998; Doerge, 2002; Liu et al, 2005; Gao et al, 2005; Yoshimoto et al, 2011; 陶星辰等, 2014), 而西川红景天的微卫星引物的开发与筛选将为如此众多领域的研究提供重要的基础。我们曾利用基于高通量测序获得的唐古红景天 (*R. tangutica*) EST 序列开发西川红景天的 8 条相对理想 SSR 位点及其引物 (Zhang et al, 2015)。可能由于西川红景天与唐古红景天之间的物种差异, 我们并没有高效地获得理想的西川红景天 SSR 位点及其引物, 这不能满足后续研究的多样性的需求。因此, 我们尝试使用磁

珠富集法 FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats) (Zane et al, 2002) 开发西川红景天的微卫星引物, 并进行筛选。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

本研究中, 用于微卫星标记多态性筛选的西川红景天分别采自青海省、四川省及西藏自治区等地, 各个居群的海拔、经纬度在采集地中心使用 GPS 全球定位系统 Etres GIS 采集器记录 (Garmin, 中国台湾) (表 1)。凭证标本保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 方法

1.2.1 基因组 DNA 酶切与接头连接 本研究所用的 DNA 为此前的研究中所获得的基因组 DNA (Zhang et al, 2015)。按照试剂 *Mse* I 说明书中所给的参考比例配置 25  $\mu$ L 的酶切反应体系液, 即 0.5  $\mu$ g 左右的基因组 DNA 与加入 0.5  $\mu$ L 的内切酶 *Mse* I (10 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>, New England Biolabs, USA) 在 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中恒温反应 1 h, 然后于 65  $^{\circ}$ C 灭活 10 min。酶切反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 弥散带分布于 100~1 000 bp 间为佳。

在酶切产物中连接上 *Mse*I 的扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 接头 AdapterA (5'-gATgAgTCCTgACTACN-3', N 代表碱基 A、G、C、T) 和 AdapterB (5'-gACgATgAgTCCTgAg-3'), 于 16  $^{\circ}$ C 在 10  $\mu$ L 反应体系液中连接过夜, 反应体系如下: 酶切反应产物 10  $\mu$ L, AdapterA 1.5  $\mu$ L, AdapterB 1.5  $\mu$ L, 10 $\times$ T4 DNA ligase buffer 2.0  $\mu$ L, 50% PEG4000 2.0  $\mu$ L, T4 DNA ligase (1 000 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2.8  $\mu$ L。然后 65  $^{\circ}$ C 灭活 10 min。

以接头连接产物为模板, 进行 PCR 以检测接头连接是否成, 反应体系为连接产物 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15.7  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer (Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ L, dNTP (2.5 mol  $\cdot$

表 1 磁珠富集法所用西川红景天 4 居群的采样点信息

Table 1 Locality information of four populations of *Rhodiola alsia* used in the study

居群 Population	采样点 Location	个体数 Sample number	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Altitude (m)	凭证标本 Voucher
P1	青海清水河 Qingshuihe, Qinghai	18	34°05' N	97°37' E	4 670	Chen2002021
P2	青海歇武 Xiewu, Qinghai	21	33°12' N	97°26' E	4 350	Chen2002023
P3	四川石渠 Shiqu, Sichuan	18	33°08' N	97°33' E	4 390	Chen2002151
P7	西藏丁青 Dingqing, Tibet	23	31°41' N	94°55' E	4 900	Chen2002056

L<sup>-1</sup>) 1.6 μL, MseI-N (10 mol · L<sup>-1</sup>) 3.0 μL, Taq polymerase (5 U · μL<sup>-1</sup>; TaKaRa, 大连) 0.2 μL; PCR 程序为 95 °C, 5 min; (94 °C, 30 s; 53 °C, 60 s; 72 °C, 60 s) × 25; 72 °C, 7 min; 16 °C, ∞。然后 1% 琼脂糖凝胶电泳检测该 PCR 产物, 并用 AxyPrep (AXYGEN, 美国) DNA 凝胶纯化试剂盒严格按照该产品的说明书来回收、纯化 PCR 产物。

1.2.2 生物素标记探针杂交与富集 用 5' 生物素标记过的探针 (AG) 15 和 (AC) 15 与上一步纯化后的 PCR 产物在杂交体系中 48 °C 反应 2 h。杂交体系为纯化后的 PCR 产物 40 μL、探针 (AG) 15 和 (AC) 15 各 15 μL (10 mmol · L<sup>-1</sup>), 4 × SSC (with 1% SDS) 65 μL。

取 1 mg 磁珠于 1.5 mL 离心管中, 用 300 μL TEN100 缓慢冲洗, 磁力架 (New England Biolabs, 美国) 吸附约 1 min, 弃漂洗液, 重复漂洗 2 次后, 将磁珠悬浮于 40 μL TEN100 中。

将上一步获得的杂交产物加入已准备好的磁珠悬浮液中, 28 °C, 110 r · min<sup>-1</sup> 恒温振荡温育 30 min, 然后用磁力架吸附磁珠, 以使磁珠和混合液分离, 弃掉混合液后进行如下洗脱: 向所吸附的磁珠中加 400 μL TEN100, 室温漂洗 5 min, 然后用磁力架吸附磁珠, 弃洗脱液; 重复 2 次, 保留末次洗脱液记为 ①。向磁珠中加 400 μL 含 0.1% SDS 的 0.2 × SSC, 室温漂洗 5 min, 然后磁力架吸附, 弃洗脱液; 重复 2 次, 保留末次洗脱液记为 ②。向磁珠中加 50 μL TE 并混匀, 转移到 PCR 管中, 95 °C 变性 5 min, 然后用磁力架吸附, 保留上清液记为 ③。

分别用上述所得的 3 份洗脱液 (①、②、③) 为模板进行 PCR, 反应体系与反应程序同 1.2.1 所述, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收并纯化 200~700 bp 大小的 PCR

产物, 用分光光度计 NanoDrop 2000c 检测回收到的产物浓度。

1.2.3 微卫星富集文库构建与筛选 按照产品使用说明, 使用 pMD<sup>TM</sup> 19-T Vector Cloning Kit (TaKaRa, 大连) 将上一步获得的纯化的 PCR 产物进行 T-载体连接。然后按照产品使用说明将连接产物转入大肠杆菌 (*E. coli* DH5α) 超感受态细胞 (TaKaRa, 大连); 37 °C 恒温摇床摇菌 1 h; 然后超净工作台中涂板接种, 37 °C 倒置培养。

挑选阳性单克隆于 500 μL 液体 LB 培养基中, 37 °C 恒温摇床摇菌 3~5 h, 接着以此菌液为模板做菌落 PCR, 反应体系为 DNA template 0.8 μL, ddH<sub>2</sub>O 17.5 μL, 10×Buffer (Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, dNTP (2.5 mol · L<sup>-1</sup>) 0.2 μL, MseI-N (10 mol · L<sup>-1</sup>) 3.0 μL, Primer ((AG) 15 或 (AC) 15, 5 mol · L<sup>-1</sup>) 0.8 μL Taq polymerase (5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.2 μL, PCR 程序同 1.2.1; 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果; 根据电泳结果, 挑选 PCR 产物多于一条带的单克隆进行测序。

通过 Chromas (Chromas Technelysim, 澳大利亚) 软件查看测序所得的 DNA 序列, 使用在线软件 VecScreen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) 去掉合格序列中的载体序列; 使用 ClustalX 2.0.12 (Larkin et al, 2007) 比对序列, 去掉相同的单克隆序列, 运用 SSRHunter 软件 (李强和万建民, 2005) 进行 SSR 位点搜索; 在所获得的 SSR 序列中, 随机选择 100 条序列, 通过软件 primer3-2.3.4 (<http://primer3.sourceforge.net/>) 设计其引物。

1.2.4 微卫星的多态性筛选 利用 4 个野外居群 (表 1) 80 个个体, 检测 SSR 引物多态性。用分光光度计 NanoDrop 2000c 检测每个个体 DNA 样品的质量和浓度, 并根据所测浓度将其逐一稀释到约 10 ng · μL<sup>-1</sup>, 以便批量进行 PCR。PCR 反应体系为 DNA

表 2 多态性较高的 13 个 SSR 位点及其引物

Table 2 Thirteen highly polymorphic SSR loci and their primers

位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	重复序列 Repeat motif	片段大小 Fragment size (bp)	退火温度 Ta Annealing temperature Ta (°C)
CZ12	F: TCACCCTATGCCACCTTG R: TCTGGGCCCTGCACAGAT	(AC)6	103	57
CZ16	F: AGAGGACGCTGACTTGTG R: CAAAGCCGAGGTGGACAT	(GA)10	166	57
CZ17	F: TGAGTGTTTGGTGGGTTG R: TGTCTTTGCCTCTTCCT	(AG)8	116	57
CZ36	F: AAAACTGAAAGTCACTCGCTAT R: AGTAAGACGCCGAGGTGC	(CA)7	174	50
CZ42	F: TGGGAGTATTATTGATAGAG R: TAAGAAAGAACATGAGCC	(GTGTGA)3	270	50
CZ43	F: TAGAAAATTCTGTGGGTG R: TAAGAAAGAACATGAGCC	(TGAGTG)3	153	50
CZ50	F: TGTAGGTGACAGGGCTAG R: TAGGGTTAGGTCAACTGG	(GT)5	133	50
CZ85	F: AGTAACCAGGAACTCAGCC R: ACGGGAATAGCAATAGACAC	(CT)11	284	54
CZ30	F: TAAGCATCTGAAAATATG R: AGTAAGGAGATTGGTTAT	(CA)7	154	50
CZ77	F: TAGCCACTGCTTTCCGTT R: ACATTCAGATGCGTTTT	(GT)6	310	54
CZ79	F: ACATCAAAAACAAAACAAAAC R: GCGGCAAAGCAATAATAT	(AC)6	125	54
CZ83	F: CTTGGCATATTCCCTTAG R: ATGCCAATAACAAGAAGG	(TC)6	151	54
CZ104	F: AGGTGTAGGACGAGGATGA R: TGACTAAGGGCTTTGTGAT	(GA)9	257	54

template 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 14.2  $\mu\text{L}$ , 10×Buffer (Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP (2.5 mol · L<sup>-1</sup>) 0.6  $\mu\text{L}$ , Primer (Forward 和 Reverse) 0.5  $\mu\text{L}$ , Taq polymerase (5 U ·  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , PCR 程序为 [94 °C, 5 min; (94 °C, 45 s; Ta, 30 s; 72 °C, 30 s) × 35; 72 °C, 7 min; 16 °C, ∞]。为了控制实验成本, PCR 反应产物先用聚丙烯凝胶电泳进行预检测, 对于呈现较高遗传多态性的 SSR 引物, 将其 PCR 产物再用 QIAxcel Advanced System (QIAGEN, 德国) 毛细管电泳检测分析。

统计每个位点的等位基因数量 (Number of alleles per locus, A), 利用 GENEPOP version 4.0.10 分析观测杂合度 (Observed heterozygosities, *H<sub>o</sub>*)、期望杂合度 (Expected heterozygosities, *H<sub>e</sub>*) (Rousset, 2008)。Hardy-Weinberg 平衡也在 GENEPOP 中用确切性概率方法 (Exact probability test) 检测。

## 2 结果与分析

采用 (AG)15 和 (AC)15 两种微卫星标记探针

构建富集文库, 共获得阳性克隆约 2 500 个; 随机挑取 1 200 个进行 PCR 检测, 具有多态性的阳性克隆达 400 个 (33.33%), 随机挑取 200 进行测序, 分析测序得到的序列, 去掉载体序列, 将测序结果比对, 去掉相同的单克隆序列, 经 SSRHunter 搜索后, 再利用 primer3-2.3.4 成功设计引物 105 对 (52.5%) 可用于 SSR 多态性筛选。经过温度梯度 PCR 筛选确定各对引物的退火温度后, 从每个居群中随机挑取 6 个个体——共 24 个个体用于 PCR, 以初步筛选检测引物的多态性; 先在 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测 PCR 产物质量, 后再用 8% 聚丙烯凝胶电泳检测引物多态性。聚丙烯凝胶电泳检测显示成功扩增 45 对, 其中 13 对多态性较高 (表 2)。

用所获得的 13 对 SSR 引物, 对 4 个居群全部的 80 个个体进行反应; 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 再在毛细管电泳中对其多态性进行检测。对毛细管电泳数据的统计分析显示, 所检测的 13 个 SSR 位点 (表 3) 的等位基因数为 2 到 23 不等, 均值约为 9.192; 观测杂合度 (*H<sub>o</sub>*) 范围为 0.048~0.952, 均值约

表 3 13 对引物在 4 个居群中的遗传多态性检测结果

Table 3 Highly polymorphic results of thirteen initial primers screening in four populations of *Rhodiola alsia*

位点 Locus	居群 P1 (N=18)			居群 P2 (N=21)			居群 P3 (N=18)			居群 P7 (N=23)		
	A	<i>Ho</i>	<i>He</i>	A	<i>Ho</i>	<i>He</i>	A	<i>Ho</i>	<i>He</i>	A	<i>Ho</i>	<i>He</i>
CZ12	5	0.111	0.546 *	9	0.810	0.815 *	7	0.944	0.784 *	11	0.875	0.840
CZ16	4	0.167	0.503 *	6	0.905	0.661	7	0.778	0.603	8	0.792	0.724 *
CZ17	2	0.000	0.108	2	0.048	0.048	3	0.500	0.408	7	0.917	0.659
CZ30	7	0.611	0.798 *	9	0.952	0.800	7	0.842	0.782	11	0.955	0.885
CZ36	8	0.667	0.822 *	11	0.952	0.823	9	0.889	0.805	11	0.958	0.798
CZ42	6	0.833	0.768 *	14	0.714	0.908 *	11	0.471	0.882 *	10	0.458	0.758 *
CZ43	5	0.111	0.617 *	8	1.000	0.819	9	0.778	0.849 *	11	0.958	0.855 *
CZ50	12	0.611	0.873 *	12	1.000	0.843 *	13	1.000	0.909	14	0.958	0.790 *
CZ77	3	0.000	0.527	9	0.476	0.800	11	0.632	0.863	12	0.545	0.832
CZ79	5	0.556	0.730	6	0.286	0.569 *	8	0.526	0.688	13	0.909	0.901
CZ83	5	1.000	0.727 *	6	0.952	0.724 *	5	0.895	0.750 *	10	0.955	0.872
CZ85	6	0.111	0.679 *	23	1.000	0.952	14	0.889	0.916	21	0.875	0.944 *
CZ104	14	1.000	0.884 *	12	0.952	0.837 *	12	0.947	0.872	14	0.955	0.905

注: **A.** 等位基因数; **Ho.** 观测杂合度; **He.** 期望杂合度; **N.** 居群个体数; \* 显著偏离哈迪温伯格平衡 ( $P < 0.01$ )。

Note: **A.** Number of alleles per locus; **Ho.** Observed heterozygosities; **He.** Expected heterozygosities; **N.** Number of individuals in each population; \* Significantly deviated from Weinberg-Hardy equilibrium ( $P < 0.01$ ).

为 0.712; 而期望杂合度 (*He*) 范围是 0.000~1.000, 均值约为 0.734。GENEPOP 检测显示多个位点在某些居群中显著偏离哈迪温伯格平衡 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论与结论

微卫星标记开发的方法多种多样, 且各有利弊 (李明芳和郑学勤, 2005)。因此, 应根据物种信息、研究需要等情况选择合适的方法。磁珠富集法可以高效率、低成本、简单快捷地获得高质量的微卫星 (Brown et al, 1995); 本研究也在以往的研究中使用 FIASCO 法在高山绣线菊 (*Spiraea alpina*) (Khan et al, 2014)、窄叶鲜卑花 (*Sibiraea angustata*) (Arranz et al, 2013) 等物种中获得了大量微卫星多态性标记, 实验方法成熟高效。因此, 我们在高通量测序文库搜索法不满足后期研究需要的情况下选择 FIASCO 法对西川红景天进行微卫星标记开发。

多数真核生物中 SSR 重复单元主要为核苷酸 (AC/TG)<sub>n</sub>, 一般情况下, 重复序列单元的碱基数目越少, 其多态性越高, 即两碱基重复序列类型的多态性最高, 三碱基、四碱基则依次次之 (Kruglyak et al,

2000)。在对西川红景天的近缘物种唐古红景天的 Solexa 高通量测序结果的 SSR 分析, 发现其重复类型以三核苷酸重复类型为主, 二核苷酸重复类型次之, 但 AG、GA、CT 等核苷酸重复类型占总核苷酸类型的比例远高于三核苷酸重复类型中其他类型占总核苷酸类型的比例 (雷淑芸等, 2014)。如前文所述, 我们也利用唐古红景天转录组的高通量测序数据, 通过基于 EST 的方法开发了一些 SSR 位点及其引物, 因而在用磁珠富集法开发西川红景天的 SSR 过程中, 我们仅选用了包括 (AC/TG)<sub>n</sub> 类型的两碱基重复的 (AG)<sub>15</sub> 和 (AC)<sub>15</sub> 两种生物素标记探针用于富集文库的构建, 如果需要增加 SSR 种类, 可以选用更多种类的探针进行文库构建 (魏大为等, 2014)。在 SSR 位点多态性检测过程中, 我们为了高效地反映微卫星引物的多态性, 采用了聚丙烯凝胶电泳进行预检测, 得到多态性较高的位点之后再分辨率更高的毛细管电泳 (精确度为 2bp) 进行多态性位点的分析检测, 从而在一定程度上降低成本的同时提高检测结果的准确度。

我们所获得的 SSR 位点平均等位基因数约为 9.192, 观测杂合度 (*Ho*) 均值约为 0.712, 期望杂合

度( $H_e$ )均值约为 0.734, 如此高的多态性已满足后期研究的需要; GENEPOP 检测显示数个位点在某些居群中显著偏离哈迪温伯格平衡( $P < 0.01$ ), 这可能是实际研究的居群并不能达到哈迪—温伯格定律所假设的无限大等理想状态所致。因此, 这 13 对 SSR 位点及相应 SSR 引物可用于后期的研究。

综上所述, 我们利用磁珠富集法获得的西川红景天 13 个 SSR 多态性位点, 结合此前基于 EST 序列开发的 SSR 多态性位点, 为今后利用微卫星位点开展西川红景天的居群遗传结构分析和其他研究提供了一组有效工具。

### 参考文献:

ARRANZ SE, AVARRE JC, BALASUNDARAM, et al, D. 2013. Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 December 2012-31 January 2013 [J]. Mol Ecol Resour, 13(3): 546-549.

BROWN J, HARDWICK L, WRIGHT A, 1995. A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes [J]. Mol Cell Probe, 9(1): 53-57.

DOERGE R W, 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations [J]. Nat Rev Genet, 3(1): 43-52.

FU K, OHBA H, 2001. *Rhodiola* (Crassulaceae) [M] // Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 8: 253-263.

GAO LZ, ZHANG CH, CHANG LP, JIA JZ, QIU, et al, 2005. Microsatellite diversity within *Oryza sativa* with emphasis on indica-japonica divergence [J]. Genet Res, 85(1): 1-14.

GAO QB, ZHANG DJ, DUAN YZ, et al, 2012. Intraspecific divergences of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) based on plastid DNA and internal transcribed spacer fragments [J]. Bot J Linn Soc, 168(2): 204-215.

GU YL, WANG DK, CHEN XY, et al, 2003. Progress in the research of *Rhodiola* [J]. Acta Med Sin, 18(9): 560-561. [顾艳丽, 王东凯, 陈修毅, 等, 2003. 红景天研究进展 [J]. 中国医药学报, 18(9): 560-561.]

HE P, 1998. Abundance, polymorphism and applications of microsatellite in eukaryote [J]. Hereditas (Beijing), 20(4): 42-47. [何平 1998. 真核生物中的微卫星及其应用 [J]. 遗传, 20(4): 42-47.]

JIANG AL, ZHANG Y, 2015. Advances in evidence-based medical research of glucocorticoids application to respiratory diseases [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 50(10): 1161-1164. [姜爱玲, 张岩 2015. 红景天苷药理作用的研究进展. 中国临床药理学与治疗学, 50(10): 1161-1164.]

KHAN G, ZHANG FQ, GAO QB, et al, 2014. Isolation of 16 microsatellite markers for *Spiraea alpina* and *S. mongolica* (Rosaceae) of the Qinghai-Tibet Plateau [J]. Appl Plant Sci, 2(1): 1300059.

KRUGLYAK S, DURRETT R, SCHUG MD et al, 2000.

Distribution and abundance of microsatellites in the yeast genome can be explained by a balance between slippage events and point mutations [J]. Mol Biol Evol, 17(1): 1210-1219.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN N, et al, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 23(21): 2947-2948.

LEI SY, GAO QB, FU PC et al, 2014. Analysis on microsatellite in *Rhodiola algida* based on Solexa sequencing [J]. Bull Bot Res, 34(6): 829-834. [雷淑芸, 高庆波, 付鹏程, 等, 2014. 基于 Solexa 高通量测序的唐古特红景天 (*Rhodiola algida*) 微卫星信息分析 [J]. 植物研究, 34(6): 829-834.]

LI MF, ZHENG XQ, 2005. Research progress of methods of SSR primers development [J]. Hereditas (Beijing), 26: 769-776. [李明芳, 郑学勤 2005. 开发 SSR 引物方法之研究动态 [J]. 遗传, 26: 769-776.]

LI Q, WAN JM, 2005. SSRHunter: development of a local searching software for SSR site [J]. Hereditas (Beijing), 27(5): 808-810. [李强, 万建民, 2005. SSRHunter, 一个本地化的 SSR 位点搜索软件的开发. 遗传, 27(5): 808-810.]

LIU W, NIE H, WANG S, et al, 2005. Mapping a resistance gene in wheat cultivar Yangfu 9311 to yellow mosaic virus, using microsatellite markers [J]. Theor Appl Genet, 111(4): 651-657.

ROUSSET F, 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux [J]. Mol Eco Resour, 8(1): 103-106.

TAO XC, SHANG QJ, LIU XY, et al, 2014. Isolation and identification of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in parts of Yunnan Province [J]. J Pathog Biol, 9(10): 873-876. [陶星辰, 高秋菊, 刘晓英, 等, 2014. 云南省部分地区鸽粪中新型隐球菌的分离与鉴定 [J]. 中国病原生物学杂志, 9(10): 873-876.]

WANG Q, RUAN X, LI HD, et al, 2007. Research status, questions and strategies of rare medicinal plant *Rhodiola* L [J]. J Nat Resour, 22(6): 880-889. [王强, 阮晓, 李荷迪, 等, 2007. 珍稀药用资源植物红景天研究现状, 问题与对策. 自然资源学报, 22(6): 880-889.]

WANG XR, SZMIDT AE, 2001. Molecular markers in population genetics of forest trees [J]. Scand J For Res, 16(3): 199-220.

WEI DW, LIAN ZQ, WU XD, et al, 2014. Microsatellite enrichment by magnetic beads in *Silurus lanzhouensis* [J]. Acta Hydrobiol Sin, 38(4): 791-796. [魏大为, 连总强, 吴旭东, 等, 2014. 磁珠富集法筛选兰州鲃微卫星分子标记. 水生生物学报, 38(4): 791-796.]

YOSHIMOTO K, YOSHIDA J, ISHII G, et al, 2011. Two lung adenocarcinomas in the same lobe: multiple primaries or intrapulmonary metastasis? [J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 17(6): 584-587.

ZANE L, BARGELLONI L, PATARNELLO T, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. Mol Ecol, 11(1): 1-16.

ZHANG FQ, LEI SY, GAO QB, et al, 2015. Isolation of microsatellite loci for *Rhodiola alsia* (Crassulaceae): an important ethno-medicinal herb endemic to the Qinghai-Tibetan plateau [J]. Genet Mol Res, 14(2): 5266-5269.