

# 沙棘SSR 分子标记的开发

孙燕琳<sup>2</sup>, 阮成江, 金华\*

(1. 大连民族学院民族地区生物资源与环境研究所, 辽宁大连116600; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁大连116023)

**摘要** 利用已报道的葡萄SSR引物筛选适用于沙棘的SSR引物。结果表明, 在供筛选的107对引物中, 只有1对引物在沙棘中无扩增位点, 有效扩增比率为99.07%; 共有46对引物的在2个沙棘品种间扩增出多态性位点, 有效扩增比率为42.99%, 扩增产物共表现出100个等位基因, 其中差异等位基因数为70个, 每对引物的等位基因数为1~4个, 平均为2.174个。根据这46对引物的扩增结果, 中国沙棘和辽阜1号间的遗传相似系数为0.413, 遗传距离为0.587。

**关键词** 沙棘; SSR; 引物开发

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)01-00045-02

## Exploitation of SSR Marker of *Hippophae rhamnoides*

SUN Yanlin et al (Institute of Bio-resources and Environment, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

**Abstract** SSR markers adapting to *Hippophae rhamnoides* were screened using reported Grape's SSR primers. The results showed that among 107 primers selected only 1 primer failed amplification, with success rate 99.07%. 46 primers showed polymorphism, with success rate 42.99%. Total 100 alleles were gotten according to their amplification, including 70 aberrant alleles. Allele number of each primer ranged from 1 to 4 with a mean of 2.174. The genetic similarity coefficient between two varieties was 0.413, and the genetic distance was 0.587.

**Key words** *Hippophae rhamnoides*; SSR marker; Primer exploitation

沙棘(*Hippophae rhamnoides*)为胡颓子科沙棘属落叶乔木、小乔木或灌木, 是一种防风固沙的先锋树种。沙棘果不仅营养丰富, 而且对治疗溃疡、高血脂、冠心病及软化血管等有显著疗效。我国从1985年开始大规模开发利用沙棘资源, 但干旱、虫害等灾害导致沙棘林大面积死亡<sup>[1]</sup>。近年来, 随着分子生物学的发展, 分子标记技术已应用于植物一些重要性状的分析, 如抗病虫基因定位与遗传图谱构建。目前对沙棘已有基于RAPD<sup>[2]</sup>、AFLP<sup>[3]</sup>遗传多样性方面的研究, 但未见沙棘SSRs被开发的报道。SSR分子标记具有多位点性、共显性、高度变异性、基因覆盖率高等特点, 较其他分子标记具有明显优越性。目前开发SSR分子标记的方法有3种: DNA直接测序设计引物; 引用已登录DNA序列设计引物; 利用SSR分子标记的可转移性和可通用性筛选引物<sup>[4]</sup>。利用SSR分子标记可转移性和可通用性, 该研究选用已报道的与沙棘同目不同科的葡萄微卫星引物, 首次应用于开发沙棘SSR分子标记, 旨在为沙棘品种鉴定、基因定位、分子标记辅助育种及群体遗传多样性等研究提供科学依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 试验材料** 供试辽阜1号扦插苗由阜新忠义沙棘研究院提供, 中国沙棘种子取自青海大通。辽阜1号扦插苗于花盆中培育, 2周后叶片长约5cm时单株标号, 取幼嫩叶片提取DNA。中国沙棘种子育苗后于花盆中培育, 株高约3cm时单株标号, 取整株提取DNA。

**1.2 DNA提取方法** DNA提取采用改良的CTAB法<sup>[5]</sup>。取5g沙棘幼苗叶片, 用液氮研磨, 移至50ml离心管中, 加10ml预热至65℃的2×CTAB抽提缓冲液(2% 2-巯基乙醇, 2% CTAB, 100mmol/L Tris-HCl, 20mmol/L EDTA, 1.4mmol/L NaCl, pH8.0), 混匀, 加10ml 1%PVP溶液(W/V), 于65℃水浴恒温放置60min; 再加入1体积氯仿/异戊醇(24/1)抽提液, 4

热至65℃的10%CTAB溶液(10%CTAB, 0.7mmol/L NaCl), 混匀; 加入1体积氯仿/异戊醇抽提液, 4℃下12000r/min离心5min; 最后, 取上清液, 加入沉淀缓冲液(1%CTAB, 500mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA, pH8.0)于4℃下12000r/min离心10min; 弃上清液, 用预冷乙醇清洗沉淀物2次, 风干。将沉淀物溶于200μl TE缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 0.1mmol/L EDTA, pH8.0), -20℃保存, 备用。

**1.3 PCR反应** 反应体系(20μl): 10×buffer 2μl, 模板DNA 50~100ng, Taq酶(上海生工公司) 0.5μl, dNTPs(TaKaRa, 2.5mmol/L) 1μl, 正向引物和反向引物(上海生工公司, 100ng/L) 各1μl。PCR反应程序: 95℃预变性5min; 95℃变性1min, 退火1min, 72℃延伸1min, 共30个循环; 最后72℃延伸5min。

**1.4 电泳分析** 在0.5×TBE缓冲条件下电泳, 1.8%琼脂糖凝胶分离, 用UVP凝胶成像系统观察照相。

**1.5 数据处理** 多态性条带以UVP凝胶成像系统检测的扩增结果为准。每对引物的电泳条带按有条带的记为1, 无条带的记为0。不同大小条带总数记为总等位基因数, 有差异的条带数记为差异等位基因数。通过每对引物的总等位基因数以及差异等位基因数, 计算2个品种间的遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD)<sup>[6]</sup>。

$$GS = m / (m + n) \quad (1)$$

$$GD = 1 - GS \quad (2)$$

式中,  $m$ 表示基因型间总等位基因数;  $n$ 表示基因型间差异等位基因数。

## 2 结果与分析

选择的107对葡萄SSRs引物<sup>[7]</sup>对1个沙棘基因组DNA的扩增结果中, 只有1对引物无扩增位点, 其余106对引物都能至少扩增出1条清晰的谱带。利用106对引物对2个沙棘品种(中国沙棘和辽阜1号)进行了扩增和多态性筛选, 有46对SSRs在沙棘中的2个品种间表现明显多态性, 分别为UDV-005、UDV-006、UDV-010、UDV-011、UDV-013、UDV-014、UDV-015、UDV-016、UDV-019、UDV-023、UDV-026、UDV-028、UDV-029、UDV-032、UDV-036、UDV-041、UDV-056、

基金项目 大连民族学院引进人才启动基金(20056209)。

作者简介 孙燕琳(1981-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向: 逆境植物分子生物学。\* 通讯作者。

收稿日期 2006-09-26

UDV-058、UDV-059、UDV-060、UDV-062、UDV-064、UDV-072、UDV-073、UDV-074、UDV-077、UDV-089、UDV-092、UDV-096、UDV-097、UDV-098、UDV-099、UDV-101、UDV-104、UDV-108、UDV-114、UDV-115、UDV-116、UDV-119、UDV-120、UDV-124、UDV-125、UDV-128、UDV-130、UDV-134 和 UDV-135。

表1 表现多态性引物等位基因统计

引物	退火温度	总等位基因数	差异等位基因数
UDV-005	54	2	2
UDV-006	55	2	1
UDV-010	55	2	1
UDV-011	56	2	1
UDV-013	56	2	2
UDV-014	55	2	1
UDV-015	57	2	1
UDV-016	55	2	1
UDV-019	56	2	2
UDV-023	54	2	1
UDV-026	56	2	2
UDV-028	54	3	2
UDV-029	54	3	2
UDV-032	55	2	1
UDV-036	54	2	1
UDV-041	56	3	2
UDV-056	58	2	2
UDV-058	58	2	1
UDV-059	56	1	1
UDV-060	56	2	2
UDV-062	57	2	2
UDV-064	55	3	2
UDV-072	54	2	2
UDV-073	55	2	2
UDV-074	57	4	4
UDV-077	56	2	2
UDV-089	58	2	1
UDV-092	57	1	1
UDV-096	57	2	1
UDV-097	56	2	1
UDV-098	54	2	1
UDV-099	56	2	1
UDV-101	58	2	1
UDV-104	54	3	1
UDV-108	57	2	2
UDV-114	55	2	2
UDV-115	55	2	2
UDV-116	57	2	1
UDV-119	57	2	1
UDV-120	58	2	1
UDV-124	57	4	2
UDV-125	58	2	1
UDV-128	56	2	2
UDV-130	55	3	2
UDV-134	55	2	1
UDV-135	55	2	2

表1 表明,46 对表现明显多态性的 SSRs 共有 100 个等位基因,其中每对引物等位基因数为 1~4 个,平均为 2.174 个,差异等位基因共 70 个,占总等位基因的 70%;未表现明

显多态性的 61 对引物共有 119 个等位基因,每对引物等位基因数为 1~4 个,平均为 1.951 个。46 对引物中,等位基因数为 1 的占表现明显多态性引物的 4.348%,等位基因数为 2 的占 78.261%,等位基因数为 3 的占 13.043%,等位基因数为 4 的占 4.348%;另外 61 对引物中,等位基因数为 1 的占未表现明显多态性引物的 29.508%,等位基因数为 2 的占 59.016%,等位基因数为 3 的占 9.836%,等位基因数为 4 的占 1.639%。中国沙棘与辽阜 1 号间的遗传相似系数为 0.413,遗传距离为 0.587。

### 3 讨论

Erpelding 等研究了大麦、小麦、大豆、苹果不同种属间标记连接区域和引物连接部分,证明具有高度保守性<sup>[8-11]</sup>。王彩虹等用苹果的 6 对 SSR 标记引物对蔷薇科植物的 6 个属 19 个种进行扩增,发现这些 SSR 引物几乎在所有的供试物种上都能扩增出与在苹果上大小相似的 SSR 产物<sup>[12]</sup>。Cordeiro 等用甘蔗的 35 对 SSR 引物对同科的蔗茅和高粱进行扩增,发现其中 21 对引物可成功扩增,17 对引物表现多态性<sup>[13]</sup>。Gaspero 等从 118 对葡萄引物中找到 108 对可在杏树成功扩增的微卫星,其中 100 对表现多态性,另外 8 对虽然不能在此表现多态性,但已报道可在其他品种间表现多态性。

运用 SSR 分子标记的可转移性和可通用性特点,该试验首次从已报道的同目不同科葡萄引物中筛选出适用于沙棘的 SSR 分子标记引物。这为沙棘的遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建、基因定位、抗干缩病的分子标记辅助选择育种等提供科学依据。在所选用的 107 对引物中,筛选出 46 对在中国沙棘和辽阜 1 号 2 个沙棘品种上表现明显多态性的 SSR 引物,未表现明显多态性的 61 对引物虽不能在 2 个沙棘品种上表现多态性,但不能完全否定在其他沙棘品种上的可用性,所以需继续在分辨率更高的聚丙烯酰胺胶上电泳或在其他沙棘品种上试验。根据 46 对引物在中国沙棘和辽阜 1 号 2 个沙棘品种上的扩增结果,计算出 2 个沙棘品种间遗传相似系数为 0.413,遗传距离为 0.587。这个结果与前人用 RAPD、AFLP 分子标记得出的研究结果相似。其中,Ruan 等用 RAPD 分子标记对 14 个沙棘品种进行分析,得出中国沙棘和辽阜 1 号的遗传距离为 0.66;Ruan 等用 AFLP 分子标记分析 15 个沙棘品种,中国沙棘和辽阜 1 号的遗传相似系数为 0.45,换算成遗传距离为 0.55。研究表明,葡萄 SSRs 标记在沙棘和葡萄物种间具有较高的通用性。通用分子标记可以有效弥补物种分子标记的不足。

### 参考文献

- [1] 梁宗锁,孙群,王俊锋,等.干旱多风条件下造林成活与致死机理研究[J].沙棘,2003,16(1):14-20.
- [2] RUAN C J, QIN P, ZHENG J W, et al. Genetic relationships among some cultivars of sea buckthorn from China, Russia and Mongolia based on RAPD analysis [J]. Si Hui, 2004, 101: 417-426.
- [3] RUAN C J, LI D Q. AFLP fingerprinting analysis of some cultivated varieties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) [J]. Ind J Genet, 2005, 84(3): 311-316.
- [4] VARSHNEY R K, GRANER A, SCORRELLS M E. Genetic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(1): 48-55.
- [5] PATTERSON A H, BRUBAKER L, WENDEL J. A rapid method for extraction of

( 上接第46 页)

- cotton genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. *Hort Mol Biol Rep*, 1993, 11(2): 122 - 127.
- [6] 彭忠华, 赵致, 张明生, 等. SSR 标记对高海拔玉米自交系遗传多样性的研究[J]. *西南农业大学学报: 自然科学版*, 2006, 28(1): 17 - 21.
- [7] DI GASPERO G, CIPRIANI G, MARRAZZO MT, et al. Isolation of (AC)<sub>n</sub>-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection[J]. *Mol Breeding*, 2005, 15: 11 - 20.
- [8] ERPELDING J, LARSON S, BLAKE N K, et al. STS PCR markers appropriate for wheat-barley introgression[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 826 - 832.
- [9] ERPELDING J, BLAKE N K, TALBERT L E. Transfer of sequence tagged site PCR markers between wheat and barley[J]. *Genome*, 1996, 39: 802 - 810.
- [10] PEAKALL R, GILMORE S, KEYS W, et al. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants[J]. *Mol Biol Evol*, 1998, 15(10): 1275 - 1287.
- [11] YAMAMOTO T, KIMURA T, SAWAMURA Y, et al. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 865 - 870.
- [12] 王彩虹, 田义轲, 赵静. 来自苹果的SSRs 在蔷薇科植物资源上的通用性分析[J]. *园艺学报*, 2005, 32(3): 500 - 502.
- [13] CORDEIRO G M, CASUR, MINIYRE C L, et al. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *erianthus* and sorghum [J]. *Hort Sci*, 2001, 160: 1115 - 1123.