

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201708040

引文格式: 李同建, 董婧, 廖亮, 等. 三叶木通微卫星分子标记开发及评价 [J]. 广西植物, 2018, 38(9): 1117-1124

LI TJ, DONG J, LIAO L, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Akebia trifoliata* [J]. *Guihaia*, 2018, 38(9): 1117-1124

三叶木通微卫星分子标记开发及评价

李同建, 董婧, 廖亮, 金洪光, 韩兴杰, 文锋, 徐玲玲*

(九江学院 药学与生命科学学院, 江西 九江 332000)

摘要: 为了获得适于三叶木通遗传多样性和遗传结构研究的微卫星分子标记, 该研究采用磁珠富集法构建了三叶木通微卫星富集文库。结果表明: 在 150 个阳性克隆中发现了 70 个微卫星位点, 富集效率为 46.67%, 其中含双碱基重复单元的序列占比为 79.37%, 三碱基和四碱基重复含有量较少。共设计引物 63 对, 其中筛选出 16 对高多态引物, 对 1 个三叶木通自然居群 48 个个体进行了遗传分析, 结果显示位点的等位基因数为 10~22 个, 观察杂合度和期望杂合度分别为 0.370~0.792 和 0.724~0.936, 多态性信息指数为 0.725~0.919, 表明以上引物均为高多态性引物。其中, 12 个位点偏离哈迪-温伯格平衡, 呈现出纯合子过剩状态, 这可能与哑等位基因和其它因素有关。综上结果表明, 该研究所开发的 16 对引物能够用于三叶木通遗传多样性和遗传结构评价工作。

关键词: 三叶木通, 微卫星分子标记, 磁珠富集法

中图分类号: Q943.2, Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)09-1117-08

Isolation and characterization of microsatellite markers for *Akebia trifoliata*

LI Tongjian, DONG Jing, LIAO Liang, JIN Hongguang,
HAN Xingjie, WEN Feng, XU Lingling*

(College of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang 332000, Jiangxi, China)

Abstract: *Akebia trifoliata* is perennial, woody vine producing large edible fruits. The high medicinal and nutritional values of *A. trifoliata* make it worthy of being exploited as a new crop. Wild resources of these species have been seriously deteriorated due to years of disorder planting and over-harvesting, thus wild germplasm resources protection and evaluation are particularly important. In order to obtain suitable molecular markers for genetic structure and genetic diversity of the existing resources, enriched SSR library was established using the magnetic bead enrichment

收稿日期: 2018-02-05

基金项目: 国家自然科学基金 (31460073, 31560075, 31560104, 31760047); 江西省卫计委科技计划项目 (2014A085); 江西省自然科学基金 (20161BAB204165); 九江学院科研项目 (2014KJYB025) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31460073, 31560075, 31560104, 31760047); Science and Technology Plan of Jiangxi Health and Family Planning Commission (2014A085); Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20161BAB204165); Research Program of Jiujiang University (2014KJYB025)]。

作者简介: 李同建 (1982-), 男, 山东沾化人, 博士, 副教授, 主要从事植物资源学研究, (E-mail) 13907021710@163.com。

*通信作者: 徐玲玲, 教授, 主要从事植物分子生物学研究, (E-mail) LingL239@163.com。

procedure. Seventy SSR loci were obtained in 150 positive clones, and enrichment efficiency was 46.67%. Thereinto, sequences with two-base repeat unit accounted for 79.37%, far more than sequences with three-base and four-base. Sixteen pairs of high polymorphic primers were chosen in sixty-three pairs primers and characterized by 48 individuals collected in Lushan. The allele numbers per locus ranged from 10 to 22, and the observed and expected heterozygosity ranged from 0.370 to 0.792 and from 0.724 to 0.936, respectively, polymorphisms information content ranged from 0.725 to 0.919, which showed that the above primers were high polymorphic primers. Twelve pairs of primers deviated from Hardy-Weinberg equilibrium, showing excess of homozygotes, which might be related to null genes and other reasons. These molecular markers will contribute to evaluation on genetic diversity and population structure, lay a foundation for conservation and evaluation of *A. trifoliata* genetic resource.

Key words: *Akebia trifoliata*, microsatellite marker, magnetic bead enrichment

三叶木通 (*Akebia trifoliata*) 是木通科 (Lardizabalaceae) 木通属 (*Akebia* Decne.) 的一种半落叶木质藤本缠绕植物, 分布于秦岭以南至南岭, 西至云南, 东至浙闽 16 个省广大亚热带地区 (万明长等, 2008)。其种下划分为三叶木通 (*A. trifoliata* subsp. *trifoliata*)、白木通 (*A. trifoliata* subsp. *australis*)、长萼三叶木通 (*A. trifoliata* subsp. *longisepala*) 3 亚种 (中国植物志编辑委员会, 2001)。木通属植物具有利尿、镇痛、祛风湿的功效, 作为中药有两千多年的历史 (冯航, 2010; 李丽等, 2010; 李丽, 2010)。近期研究表明, 其还具有抗衰老、提高免疫功能、抑制肿瘤等功效 (An et al, 2016)。木通属植物果实较大, 果肉甜糯, 具有极高开发价值, 在湖南、江西、贵州等地已有农户开始种植 (罗克明等, 2008)。其种子含油量达 40%, 具有较高的食用价值 (仲伟敏和马玉华, 2016)。与其高开发价值不匹配的是三叶木通种质资源研究较晚, 大规模无序的种植、开发对野生种质资源造成巨大威胁。因此, 有必要深入研究三叶木通种质资源, 利用现代育种技术培育栽培品种, 为三叶木通资源的可持续利用和种植产业起步打下基础。九江学院在中国、日本和韩国已搜集 70 余个不同产地的野生三叶木通资源, 建设了三叶木通种质资源圃。但是, 由于三叶木通分子生物学研究起步较晚, GenBank 中仅能检索到 440 余条 DNA 序列, 可用的分子标记较少, 严重阻碍了资源的评价工作, 因此急需开发合适的分子标记对现有资源进行遗传结构和遗传多样性评价 (Li et al, 2009; Sun et al, 2016; 黄佩蓓等, 2016)。

微卫星分子标记具有多态性高、共显性、重复性好、条带少易识别等诸多优点, 是目前遗传多样性和遗传结构研究中的首选标记之一 (Grover & Sharma, 2016), 随着荧光毛细管电泳技术在微卫星检测中的应用, 微卫星标记变得更加高效和廉价 (Wenz et al, 1998)。本研究拟采用三叶木通微卫星分子标记, 并利用 7 个不同产地的三叶木通个体和 1 个三叶木通自然居群检测引物的稳定性和多态性, 以期获得适于三叶木通遗传多样性和遗传结构研究的微卫星分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料采集 在人工种植基地采集栽培三叶木通个体 7 个, 用于检测微卫星引物扩增稳定性和多态性。在九江庐山采集三叶木通自然居群 1 个 ($n=48$), 用于微卫星文库建立和后期引物评价 (表 1)。采集每个个体新鲜、健康的幼嫩叶片放入装有变色硅胶的自封袋中迅速干燥, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中保存备用。凭证标本保存于九江学院药学与生命科学学院分子生物学研究室。

1.1.2 试剂 $10\times\text{PCR buffer}$ 、 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$ 、 dNTPs 、DNA Taq 聚合酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 均购自上海生工生物 (Sangon Biology) 工程有限公司; 限制性内切酶 *Rsa* I ($10\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、*Bst*U I ($10\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、*Xmn* I ($20\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 购自 New England Biolabs 公司; T4 DNA Ligase ($400\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 购自 Promega 公司; DNA Marker 购自大连 Takara 公司; 接头引物

表 1 本研究所用样本信息

Table 1 Information of *Akebia trifoliata* samples used in this study

样本编号 Sample code	采集地 Location	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Elevation (m)	标本号 Voucher No.
1	怀化中方县 Zhongfang County, Huaihua	27°33.298' N	110°24.854' E	772	JJU201401
2	怀化桃江县 Taojiang County, Huaihua	28°31.496' N	112°13.116' E	53	JJU201402
3	湘西凤凰县 Fenghuang County, Xiangxi	27°58.886' N	109°24.475' E	670	JJU201403
4	张家界慈利县 Cili County, Zhangjiajie	29°25.076' N	111°12.522' E	238	JJU201404
5	宣城泾县 Jing County, Xuancheng	30°37.309' N	118°26.957' E	143	JJU201405
6	安徽黄山 Huangshan, Anhui	30°08.199' N	118°14.634' E	292	JJU201406
7	景德镇婺源 Wuyuan County, Jingdezhen	29°19.077' N	117°50.294' E	89	JJU201407
8-55	九江庐山 Lushan, Jiujiang	29°18.009' N	114°32.273' E	186	JJU201408- JJU201455

SuperSNX24-F (5'-GTTTAAGGCCTAGCTAGCAG-CAGAATC) 和 Super-SNX24-R (5'-GATTCT-GCTAGCTAGGCCTTAAACAAAA) 由上海英俊生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 已干燥的三叶木通样本采用改良的 CTAB 法提取总 DNA (Doyle & Doyle, 1987), 并利用 PEG8000 纯化, 详细步骤为将 40% PEG8000 与 5 mol · L⁻¹ NaCl 按 1: 1 比例配置成工作液, 与等比例的 DNA 溶液混合, 摇匀并置于 37 °C 下静置 15 min, 12 000 r · min⁻¹ 离心 16 min, 沉淀再由 80% 乙醇清洗 2 次, 烘干。TE 溶解后用 Nanodrop 检测合格后, 置于 -20 °C 冰箱备用。

1.2.2 酶切与接头连接 使用限制性内切酶 *Rsa* I 或 *Bst*U I 和 *Xmn* I 组合对三叶木通基因组 DNA 进行酶切, 于 37 °C 温浴过夜。酶切体系为 25 μL: 2.5 μL 10×T4 ligase buffer (NEB4), 0.25 μL 100×BSA, 0.25 μL 5 mol · L⁻¹ NaCl, 1.0 μL 10 U · μL⁻¹ *Rsa* I/*Bst*U I, 1.0 μL 20 U · μL⁻¹ *Xmn* I, 20 μL 200 ng · μL⁻¹ DNA。取 1 μL 酶切产物先用 1% 琼脂糖

胶电泳检测酶切片段是否位于 200 ~ 800 bp 范围内; 然后将 SuperSNX24-F 和 SuperSNX24-R 合成接头置于水浴锅中 95 °C 反应 5 min, 缓慢冷却至室温; 最后将制备好的接头与酶切产物连接。反应体系如下: 7 μL 接头, 2.5 μL NEB 10×T4 ligase buffer, 2.0 μL 350 U · μL⁻¹ T4 ligase, 13 μL 酶切产物, 加双蒸水至 25 μL, 16 °C 连接过夜。将连接产物作为模板, 利用 SuperSNX24-F 接头作为引物通过 PCR 扩增检测连接结果。反应体系如下: 2.5 μL 10×PCR buffer, 0.13 μL 100 μmol · L⁻¹ Super-SNX24-F, 1.5 μL 2 mmol · L⁻¹ dNTP, 2.0 μL 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 2.5 μL BSA, 0.2 μL 连接产物 DNA, 加双蒸水至 25 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 24 次; 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 杂交与磁珠富集 微卫星富集采用 Glenn & Schable (2005) 的方法, 将连接产物与带生物素的探针混合物 (AG)₁₂、(CG)₁₂、(AT)₁₂、(GT)₁₂、(ACT)₁₂、(AAGT)₈、(AACT)₈、(AGAT)₈ 进行杂交。杂交反应体系: 25 μL 2×Hyb Solution, 10 μL 10 μmol · L⁻¹ 生物素标记的探针, 10 μL 连接产物,

加双蒸水至 50 μL 。杂交反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;70 $^{\circ}\text{C}$ 开始,每个循环降低 0.2 $^{\circ}\text{C}$,维持 5 s,循环 99 次;50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min;每个循环降低 0.5 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 s,循环 20 次;15 $^{\circ}\text{C}$ 保持。用链霉素亲和磁珠 (Promega Magne Sphere) 捕获结合了生物素探针的 DNA 片段,用洗脱液洗脱未结合的探针。具体操作如下:250 μL TE 洗涤 50 μL 混匀的磁珠 2 次,50 μL 1 \times Hyb Solution 平衡磁珠 2 次;将 DNA 和生物素探针混合物的杂交体系加入到磁珠中,于 16 $^{\circ}\text{C}$ 下 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡约 1 h 杂交;加入 400 μL Wash Solution I 洗脱 2 次,且第一次加入 400 μL Wash Solution II 于 45~48 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴振荡 2 min 洗脱 2 次,再次加入 400 μL Wash Solution II 混匀,于 50~53 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴振荡 2 min 洗脱 2 次。加入 200 μL TE 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 5 min 彻底洗脱富集 DNA,向上清液中加入 22 μL 3 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠和 445 μL 预冷的无水乙醇,沉淀 DNA。用 80% 乙醇洗涤,离心烘干后加入 20 μL TE 溶解。用接头 SuperSNX24-F 作为引物对富集产物进行 PCR 扩增回收,PCR 反应体系和程序与检测时相同。为增加富集的阳性率,重复以上步骤 1 次,进行 2 次富集,用 PEG8000 法纯化 DNA。

1.2.4 克隆与阳性筛选 将纯化后的富集产物克隆到 pEGM-T 载体中,连接反应在 PCR 仪上 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,将重组子转入大肠杆菌感受态细胞中培养 24 h。每板挑取 50~100 个白色单菌落,在另一含 Amp 的 LB 固体培养基平板上划线,并接种于菌落 PCR 反应液中,通过菌落 PCR (M13F 和 M13R 为引物) 筛选出阳性克隆,把划线的平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。取 3 μL 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其是否为含有目的片段的阳性菌落。选择 PCR 检测为阳性的菌落接种至 500 μL 含 Amp 的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养过夜,将培养菌液送往上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.5 序列分析与引物设计 首先,将测序结果导入 Geneious 4.8 软件中进行检测,使用 Trim-ends 和 Search for the motifs 工具去除载体和接头序列,对有叠峰的序列进行反向测序。然后,将经过处理的序列通过 Tandem Repeats Finder version 4 确

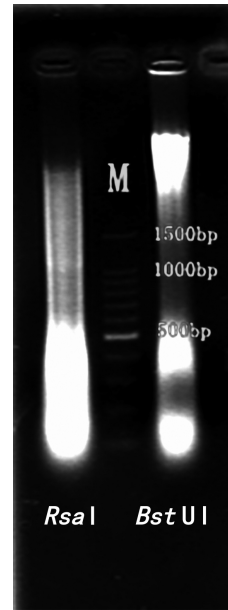


图 1 *Rsa I/Xmn I* 及 *BstU I/Xmn I* 酶切结果
Fig. 1 Restriction enzymes digestion of *Rsa I/Xmn I* and *BstU I/Xmn I*

定 SSR 位点,并分析位点的碱基重复序列和重复次数、查看序列长度及微卫星位点两端侧翼序列是否符合引物设计的要求 (Benson, 1999)。使用 Geneious 4.8 内嵌的引物设计功能进行引物设计。所设计引物送于上海生工生物工程有限责任公司合成。

1.2.6 引物稳定性、多态性筛选及评价 为了筛选扩增稳定性好、多态性高的引物和其最佳 PCR 条件,我们用设计的引物对 7 个不同地区采集的三叶木通进行 PCR 扩增,PCR 产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

将筛选出的高多态性 SSR 引物合成 5' 端荧光标记引物,其荧光基团为 FAM (蓝色), HEX (绿色)。选取采集于九江庐山的 48 个样本进行 PCR 扩增,送往北京阅微基因有限公司使用 ABI3730 遗传分析仪进行 STR 分型,内标均为 ROX500。

1.2.7 数据分析 首先,使用 Genemapper 4.1 软件进行数据统计,通过 Micro-Checker 2.2.3 检测哑等位基因 (Van Oosterhout et al, 2004)。然后,用 Genalex 6.5 (Peakall & Smouse, 2010) 计算出每个位点的等位基因数 (N_e)、有效等位基因数 (effective

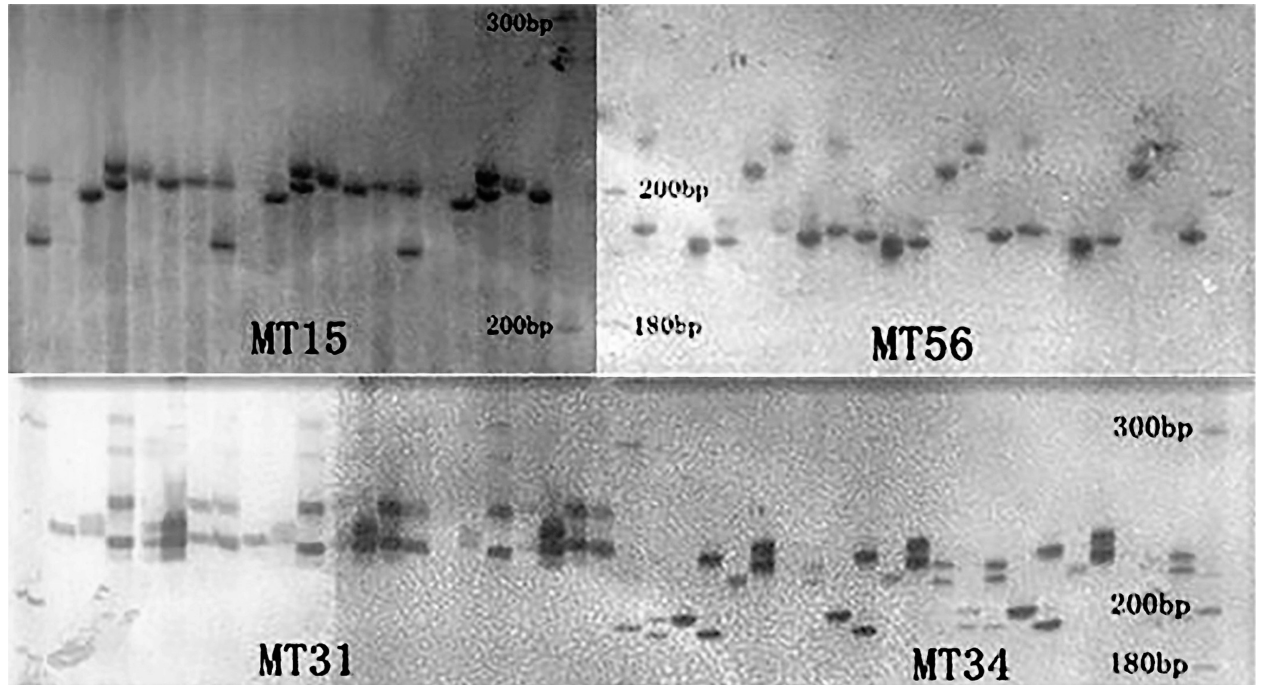


图 2 7 个样本部分引物筛选电泳图

Fig. 2 Electrophoresis detection picture of seven samples

number of alleles, N_e)、观察杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 及哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。最后, 使用 Power-Maker (Liu & Muse, 2005) 计算多态性信息指数 (polymorphic information content, PIC) 和连锁遗传不平衡 (linkage disequilibrium, LD)。所有 P 值均经 Bonferroni 法校正。

2 结果与分析

2.1 微卫星富集

选择 2 个限制性内切酶组合 (*Rsa* I 和 *Xmn* I、*Bst*U I 和 *Xmn* I) 对三叶木通基因组进行酶切, *Rsa* I 和 *Xmn* I 的组合酶切后基因组小片段电泳条带弥散, 大小分布在 100~1 500 bp 之间, 为后续实验的连接和杂交富集打好基础。*Bst*U I 和 *Xmn* I 的组合酶切片段较长, 片段长度集中在 100~200 bp、300~500 bp 及大于 1 500 bp, 这些酶切产物不利

于后续磁珠富集操作。本研究用金属浴加热进行漂洗, 先在 16 °C 下用 Washing Solution I 漂洗 1 次; 再用 Washing Solution II 分别在 45 °C 和 50 °C 下漂洗 2 次, 结果富集率太低。然后调整漂洗温度, 用 Washing Solution II 分别在 46 °C 和 51 °C 下漂洗 2 次, 获得所需目的片段, 且大大提高了阳性克隆率。

共挑取 230 个阳性克隆进行 PCR 检测, 大小在 300~1 000 bp 之间, 其中约有 40 个未扩增出目的片段, 部分菌落空载。在 190 个阳性克隆中挑选出片段长度不同的 150 个单菌落送往公司测序, 148 个测序成功。其中, 70 个含有微卫星序列, 富集率为 46.67%; 可设计引物的序列有 57 条, 占 SSR 序列的 81.43%。57 条可设计引物的序列共设计引物 63 对, 其中含双碱基重复单元的序列占 SSR 序列的 79.37%, 高于三碱基重复单元的序列占 SSR 序列的 20.63%。

2.2 引物筛选与分析

54 对引物扩增产物大小在 100~300 bp 之间。

表 2 16 对微卫星引物的基因序列和三叶木通居群的遗传多样性评估情况

Table 2 Primer sequences and genetic diversity estimates of sixteen microsatellite markers in *Akebia trifoliata*

位点名称 Locus name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	等位基因范围 Allele size range (bp)	重复单元 Repeat motif	退火温度 T_a (°C)	哑等位基因频率 Null allele frequency	N_a	H_e	H_o	PIC
MT15	F: TCAACACCGTCAATGGGAGGA R: AAGCAACAAAAAGAGTTGCTCATGAAT	209~242	(CA)12	53	0.212	13	0.830	0.479	0.842
MT19 *	F: AAAGCAGCTGAGGCCGATCA R: TCAGGAAACCCCTGTGTTTCA	174~204	(TC)34(CA)28	53	0.253	16	0.906	0.444	0.904
MT27 *	F: TCCAACCGTAGGAAAAGAAAA R: ACCACAAGGCAGAGATTTTG	176~194	(CCA)5	50	0.269	10	0.834	0.370	0.858
MT28 *	F: ACAACACTCTCTGAACCTTTAGC R: TCCAACCAACAAACACAAAACGA	176~210	(GA)7-(TC)19	55	0.137	17	0.920	0.667	0.905
MT29	F: TCTTCCCTCAACTGTATGGA R: ACTTGTGCCAGACTCCCA	213~240	(TC)10(CA)8	53	—	10	0.724	0.708	0.725
MT31 *	F: TCTGGGATTACTTGAGCAGGCA R: CGCTGACGTGCTAGCGACA	230~260	(TG)9(CA)8	51	0.162	14	0.855	0.583	0.836
MT33	F: ACAGAAGACTTGGTTTTGGGTGT R: ATGAGTCGAAGCCCCGCCCT	164~202	(TTG)4	53	—	13	0.757	0.688	0.732
MT34	F: TGAAGAGTGTCAATGCTTCCCT R: ACCCACAACCTGAGGTTCTCCA	194~238	(TC)20	56	0.100	20	0.936	0.750	0.919
MT35 *	F: TCAGTGAGTTACTTTTGCCTGT R: AGTGCTGAGGAACCTGCACATGA	129~163	(AG)16	51	0.062	18	0.909	0.792	0.895
MT38 *	F: TCCTTCAAAAAGTGACAGGAGGA R: ACTGTCAATCAACCTTGTGCC	159~234	(GT)16	53	0.232	16	0.851	0.458	0.868
MT39 *	F: TGACATGTTGATGTGCACGGAT R: TGCCAGTAGTACAACATGTAAG	195~223	(TG)14	55	0.163	13	0.887	0.596	0.879
MT40 *	F: GTGCGATCCAGACGCACCTC R: ACCTGAATGGGCATCCATTTGT	138~174	(TC)15	52	0.139	19	0.894	0.646	0.883
MT45 *	F: ACGAAAGTTGCACTCCTTCCCT R: TGCGCTGATGTGTTGTTGTCG	124~209	(AG)16(TG)18	52	0.264	22	0.916	0.426	0.884
MT48 *	F: TTTGCAGCGCCACACGACCT R: ACCCATTCGAGCCTTCTGTC	172~210	(AG)21	53	0.156	16	0.921	0.630	0.895
MT56 *	F: AGAAAGGGAGTGTAGGAAATGC R: GCAACCGACCTTGAACCTCCGACG	180~224	(AG)13	53	0.119	22	0.922	0.702	0.898
MT62 *	F: TCCAGCCAACCTCCAACCATGTCA R: ACATCTCTTTCCACACTCCCA	107~202	(TC)17(CA)5	55	0.085	16	0.900	0.750	0.859
平均值 Mean						15.938	0.873	0.606	0.861

注: T_a . 退火温度; N_a . 等位基因数; H_o . 观察杂合度; H_e . 期望杂合度; PIC. 多态性信息指数; * 显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.05$).

Note: T_a . Annealing temperature; N_a . Observed number of alleles; H_o . Observed heterozygosity; H_e . Expected heterozygosity; PIC. Polymorphic information content; * Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$).

先用 7 个 DNA 样本为模板初次筛选出条带清晰、有多态性的引物 33 对;再用 48 个 DNA 样本为模板进一步对 33 对引物进行筛选,选出条带清晰、非特异性条带少、多态性较高及扩增效率稳定的引物 16 对,可以用于 SSR 位点分析。

48 个样品的三叶木通居群中共检测到 220 个等位基因,每个位点的等位基因数为 10~22 个,平

均等位基因数为 15.938 个,观察杂合度为 0.370~0.792,期望杂合度为 0.724~0.936,多态性信息指数为 0.725~0.919(均值为 0.861),其中 12 个位点经 Bonferroni 校正后仍然偏离哈迪-温伯格平衡,呈现纯合子过剩状态,检测到 14 个位点存在大小不等的哑等位基因频率。发现了 3 个引物对 (MT33-MT45, MT15-MT56 和 MT35-MT62) 存在

连锁不平衡(表 2)。

3 讨论与结论

随着高通量测序技术的发展,使得 SSR 位点获得更加低廉、高效,越来越多的研究利用简化基因组测序和转录组测序技术进行高效的微卫星开发(万冬梅等,2016)。在群体遗传和进化研究中需要的微卫星位点数量较少,磁珠富集法可在 1 周内完成微卫星富集文库构建工作,其高效、快捷的特点更适合少量微卫星引物的开发(王静等,2015)。在本研究中,因实验室熟练掌握了磁珠富集法,故选用该方法构建三叶木通的微卫星富集文库,在 148 个成功测序的阳性克隆中获得 70 个富含微卫星的序列,富集效率较高,达到 46.67%。虽然本研究使用了 8 种不同的探针,包括双碱基重复、三碱基重复和四碱基重复,但富集的微卫星序列主要以双碱基重复为主(79.37%),三碱基和四碱基重复含有量较少。开发的 16 对引物中仅有 2 对引物为三碱基重复(MT27,MT33)。这与前人报道的植物中微卫星序列主要以双碱基重复为主一致(Morgante & Olivieri, 1993)。

利用筛选到的 16 对引物对采自庐山的三叶木通居群进行遗传分析,共扩增出 220 个多态性条带,发现以上引物的平均等位基因数为 15.938 个,观察杂合度为 0.370~0.792,期望杂合度为 0.724~0.936,这与李丽(2010)的研究结果相近。多态性信息指数(PIC)是评估微卫星引物多态性水平的重要参数,普遍认为 $PIC > 0.5$ 为高多态引物, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中多态引物, $PIC < 0.25$ 为低多态引物(Botstein et al, 1980)。本研究开发的 16 对引物多态性信息指数范围为 0.725~0.919,平均值为 0.861,表明以上引物具有较高的多态性,可以有效地用于三叶木通遗传多样性分析。哈迪-温伯格平衡检验表明有 12 个位点显著偏离了 HWE。经 Micro-Checker 检验发现,以上位点均有哑等位基因存在(0.062~0.269),表明哑等位基因可能是导致位点偏离 HWE 的原因之一。其他因素,如采样、近交、营养繁殖等均有可能是导致偏离 HWE 的原因(Li et al, 2009)。

综上所述,本研究开发的 16 对 SSR 多态性引物可用于三叶木通遗传分析,进一步补充和完善了木通微卫星分子标记工具,为三叶木通种质资源评价和开发等后续研究打下了坚实基础。

参考文献:

- AN JP, HA TKQ, KIM JW, et al, 2016. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the stems of *Akebia quinata* [J]. *Molecules*, 21(8):1091.
- GROVER A, SHARMA PC, 2016. Development and use of molecular markers: past and present [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 36(2):290-302.
- BENSON G, 1999. Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences [J]. *Nucl Acids Res*, 27(2):573.
- BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, et al, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 32(3):314.
- DOYLE JJ, DOYLE JL, 1987. A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 19(1):11-15.
- FENG H, 2010. On current research of chemical compositions and pharmacological action of *Akebia trifoliolate* [J]. *J Xi'an Univ Arts Sci (Nat Sci Ed)*, 13(4):16-18. [冯航, 2010. 三叶木通化学成分和药理作用研究进展 [J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 13(4):16-18.]
- Flora of China Editorial Committee, 2001. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [M]. Beijing: Science Press, 29: 4. [中国植物志编辑委员会, 2001. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 29: 4.]
- GLENN TC, SCHABLE NA, 2005. Isolating microsatellite DNA loci [J]. *Method Enzymol*, 395:202-222.
- HUANG PB, CHEN SH, WANG F, et al, 2016. SRAP analysis on *Akebia Decne.* germplasm resources [J]. *Hubei Agric Sci*, 55(7):1747-1750. [黄佩蓓, 陈世华, 王飞, 等, 2016. 木通属植物种质资源的 SRAP 分析 [J]. 湖北农业科学, 55(7):1747-1750.]
- LI L, YAO X, CHEN X, et al, 2009. Development and characterization of microsatellite loci in Chinese medicinal plant *Akebia trifoliolate* ssp. *australis* and cross-species amplification in closely related taxa [J]. *Conserv Genet*, 10(4): 959-962.
- LI L, CHEN XZ, YAO XH, et al, 2010. Geographic distribution and resource status of three important *Akebia* species [J]. *J Wuhan Bot Res*, 28(4): 497-506. [李丽, 陈绪中, 姚小洪, 等, 2010. 三种木通属植物的地理分布与资源调查 [J]. 武汉植物学研究, 28(4):497-506.]
- LI L, 2010. Population genetics of three medicinal *Akebia* species [D]. Beijing: Graduate University of Chinese Academy of Science:48-51. [李丽, 2010. 三种药用木通属植物的居群遗传学研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院: 48-51.]

- LIU K, MUSE SV, 2005. Power marker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, 21(9):2128-2129.
- LUO KM, LIU XW, YANG YY, et al, 2008. The growth and fruiting habit of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz under the cultivation condition [J]. *Guizhou Agric Sci*, 36(3):123-124. [罗克明, 刘学武, 杨永英, 等, 2008. 三叶木通栽培条件下的生长结果习性 [J]. *贵州农业科学*, 36(3):123-124.]
- MORGANTE M, OLIVIERI AM, 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics [J]. *Plant J*, 3(1):175-182.
- PEAKALL R, SMOUSE PE, 2010. Genalex 6: genetic analysis in Excel. population genetic software for teaching and research [J]. *Mol Ecol Notes*, 6(1):288-295.
- SUN Z, YE LJ, ZHANG F, et al, 2016. Development of microsatellite markers for *Sargentodoxa cuneata* (Lardizabalaceae) using next-generation sequencing technology [J]. *Appl Plant Sci*, 4(5):1600003.
- VAN OOSTERHOUT C, HUTCHINSON WF, WILLS DP, et al, 2004. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data [J]. *Mol Ecol Resour*, 4(3):535-538.
- WAN DM, HAN M, LI CA, et al, 2016. Development of microsatellite in marsh tit *Parus palustris* using illumina miseq [J]. *J Liaoning Univ (Nat Sci Ed)*, 43(3):252-257. [万冬梅, 韩梅, 李成安, 等, 2016. 基于高通量测序的沼泽山雀简化基因组微卫星位点的开发 [J]. *辽宁大学学报(自然科学版)*, 43(3):252-257.]
- WAN MC, LIU XW, BAN XZ, et al, 2008. The fruit character and nutrition composition of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz under the cultivation condition [J]. *Guizhou Agric Sci*, 36(3):121-122. [万明长, 刘学武, 班小重, 等, 2008. 三叶木通栽培条件下果实性状及营养成分分析 [J]. *贵州农业科学*, 36(3):121-122.]
- WANG J, HU W, YANG Y, et al, 2015. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Eomecon chionantha*, a monotypic sepecies endemic to China [J]. *Plant Sci J*, 33(6):855-860. [王静, 胡苑, 阳亿, 等, 2015. 中国特有单种属血水草的微卫星分子标记开发与评价 [J]. *植物科学学报*, 33(6):855-860.]
- WENZ H, ROBERTSON JM, MENCHEN S, et al, 1998. High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis [J]. *Genome Res*, 8(1):69-80.
- ZHONG WM, MA YH, 2016. Analysis and evaluation of nutritional components in *Akebia trifoliata* seeds [J]. *SW Chin J Agric Sci*, 29(1):169-173. [仲伟敏, 马玉华, 2016. 三叶木通种子的营养成分分析与评价 [J]. *西南农业学报*, 29(1):169-173.]

《广西植物》再次入选北大中文核心期刊

近日,期刊编辑部收到北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》2017年版编委会的“入编通知”,我所主办的《广西植物》入编《中文核心期刊要目总览》2017年版(第8版)(即中文核心期刊)之植物学类核心期刊。这是《广西植物》自1996年以来连续七次入选北大中文核心期刊,并入编《中文核心期刊要目总览》。

此次入选中文核心期刊是《广西植物》主管主办单位和编辑部多年努力的成果,离不开主管主办单位领导的大力支持,凝聚了期刊编辑、编委、审稿专家、作者的辛勤汗水,也离不开读者一如既往的信赖与支持。在此,对广大专家、作者、读者致以诚挚的谢意!《广西植物》将以此为新的办刊起点,始终坚持正确的办刊宗旨,坚持“争创名牌,构筑精品”的办刊理念,竭力报道植物科学领域的新发现、新进展和读者关注的热点问题,积极开辟办刊新思路、新方法,不断提高

刊物质量和学术影响力,再接再厉,为广大植物学科技工作者提供更好的学术交流平台,为推动植物学科技进步做出积极的贡献!

据悉,《中文核心期刊要目总览》(2017年版,即第8版)仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系包括被摘量(全文、摘要)、被摘率(全文、摘要)、被引量、他引量(期刊、博士论文、会议)、影响因子、他引影响因子、5年影响因子、5年他引影响因子、特征因子、论文影响分值、论文被引指数、互引指数、获奖或被重要检索工具收录、基金论文比(国家级、省部级)、Web下载量、Web下载率等16个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达49种,统计到的文献共计93亿余篇次,涉及期刊13953种。参加核心期刊评审的学科专家近8000位。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1981种核心期刊。