

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201401020

贺燕飞,李同建,吴永恒,等. 苧麻叶绿体 SSR 引物筛选及分析[J]. 广西植物,2015,35(4):464-467

He YF,Li TJ,Wu YH,et al. Screening and analysis of chloroplast SSR primers in ramie[J]. *Guihaia*,2015,35(4):464-467

## 苧麻叶绿体 SSR 引物筛选及分析

贺燕飞<sup>1,2</sup>, 李同建<sup>2</sup>, 吴永恒<sup>2</sup>, 赵珊红<sup>2</sup>, 徐玲玲<sup>2</sup>, 廖亮<sup>2\*</sup>

(1. 江西农业大学 园林与艺术学院, 南昌 330045; 2. 九江学院 药学与生命科学学院, 江西 九江 332000)

**摘要:** 叶绿体微卫星标记为单亲遗传(除部分裸子植物外),有独立的进化路线,它在植物遗传多样性、群体遗传结构、系统发育分析及杂种鉴定等研究上用途广泛,是研究谱系地理的有效手段。苧麻的主产地和主要分布区均在我国,但其谱系地理研究目前尚未见有报道。该研究选择来自全国不同地区的 52 个苧麻样本,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,在 23 对已知通用叶绿体 SSR 引物中筛选出适用于苧麻谱系地理研究的 SSR 引物,并利用筛选到的多态引物对 52 个苧麻样本进行聚类分析和单倍型网络图分析。结果表明:从 23 对通用引物中共筛选出 16 对适用于苧麻的多态引物,其平均多态信息含量为 0.105 3,虽然以上引物多态性较低,但能够用于野生苧麻的遗传分析研究;这 52 个苧麻样本聚为 10 支,分为 8 个单倍型,初步分析表明叶绿体 SSR 遗传变异速率较慢,不适用于苧麻种内的系统发育研究,但以上引物能够检测苧麻种内单倍型变异,可用于苧麻的谱系地理研究。

**关键词:** 苧麻; 叶绿体 SSR; 引物筛选

**中图分类号:** Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)04-0464-04

## Screening and analysis of chloroplast SSR primers in ramie

HE Yan-Fei<sup>1, 2</sup>, LI Tong-Jian<sup>2</sup>, WU Yong-Heng<sup>2</sup>, ZHAO Shan-Hong<sup>2</sup>,  
XU Ling-Ling<sup>2</sup>, LIAO Liang<sup>2\*</sup>(1. *College of Landscape and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;**2. School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang 33200, China*)

**Abstract:** Given a maternal inheritance nature (except for some gymnosperms) and a low frequency of genetic recombination, chloroplast satellites markers are especially useful in plant genetic diversity analysis, population genetic structure analysis, phylogenetic analysis and hybrid identification, which is an effective means of phylogeography. The main producing area and main distribution area of ramie is in China, but the phylogeography research on ramie have not been reported. This article's aim is to screen polymorphism cpSSR primers appropriate for phylogeography from universal cpSSR primers. In this paper, 23 pairs of universal cpSSR primers were screened using 52 ramie samples from different locations all over the country, by polyacrylamide gel electrophoresis. And clustering analysis and cpDNA haplotypes analysis of 52 ramie samples were conducted using the screened primers. Sixteen out of them were polymorphic, and the average polymorphism information content of them was 0.105 3. Although the polymorphism of these primers was low, they could be used in the research of genetic analysis in ramie. Fifty-two samples were clustered into ten groups and divided into eight haplotypes, and primarily analysis showed that the genetic variation of cpSSR remains slow, these primers were not suitable for phylogenetic research. However, these primers were able to detect haplotype variation, and suitable for the phylogeography research on ramie.

**Key words:** ramie; cpSSR; primers screen

收稿日期: 2014-11-21 修回日期: 2015-02-29

基金项目: 国家自然科学基金(31060050); 江西省自然科学基金(2008GZLN0044); 江西省教育厅重点科研项目(GJJ08431); 九江市科技支撑计划项目。

作者简介: 贺燕飞(1987-), 女, 河南三门峡人, 硕士研究生, 主要研究方向为植物系统进化, (E-mail) 405870034@qq.com。

\*通讯作者: 廖亮, 博士, 教授, 研究方向为植物分子生物学, (E-mail) Liaol58@163.com。

苧麻(*Boehmeria nivea*), 被称为“中国草”, 为荨麻科(Urticaceae)苧麻属(*Boehmeria*)多年生草本宿根植物, 是优良天然韧皮纤维作物和纺织工业的重要原料(陈建华等, 2011)。我国苧麻人工栽培已有五千年历史, 栽培品种类型极为丰富。苧麻种质资源是我国苧麻育种和生产的宝贵财富, 也是确保我国苧麻业处于国际优势地位的基础。但苧麻是多年生异花授粉作物, 分布广, 易杂交, 又能进行无性繁殖, 通过长期的自然杂交和人工杂交繁殖, 使得苧麻的遗传背景十分复杂(唐冬丽等, 2011)。而苧麻群体遗传学研究少见报道。因此, 开展苧麻群体遗传学等方面的研究, 对了解苧麻的进化、指导苧麻育种、开辟苧麻研究与利用等领域具有重要意义。

叶绿体基因组为单亲遗传(除部分裸子植物外), 在进化过程中相对保守, 且在种子植物中, 花粉分离和种子散布是决定群体遗传结构的重要因素。一般认为, 单亲遗传的叶绿体基因组有效群体较小, 叶绿体基因组的遗传变异容易受到群体遗传效应影响(如遗传漂变)(Birky *et al.*, 1983; Petit, 2005)。因此, 叶绿体基因组是研究系统发育、群体分化和谱系地理的有效手段, 而目前国内主要是基于叶绿体 *trnL-F* 序列对苧麻系统发育的研究。然而, 在生物进化过程中, 不同序列之间的进化速度是不同的, 单凭某一种序列的分析结果不能得出可靠的结论(廖亮等, 2009; 唐冬丽等, 2011), 也不足以全面分析苧麻系统发育、群体分化和谱系地理等。

高等植物的叶绿体微卫星(chloroplast SSR, cpSSR)是以单核苷酸 A 或 T 为重复单元组成的多核苷酸重复串联序列, 在叶绿体基因组中分布十分广泛, 由于 cpSSR 不仅兼有核基因组 SSR 标记的高多态性、多等位性、共显性等特点(Provan *et al.*, 2001), 而且呈单亲遗传模式, 兼顾到叶绿体基因组结构简单、相对保守等特点(Kaundun *et al.*, 2002), 使 cpSSR 技术已广泛应用于植物群体遗传结构、基因流、胞质遗传特性、物种演化、谱系地理等方面研究(Biss *et al.*, 2003; Lian *et al.*, 2003; Sukhotu *et al.*, 2004), 成为研究苧麻种下变异及其进化规律的有效手段。而国内用 cpSSR 对野生苧麻进行遗传分析的研究未见报道。本文通过分析 cpSSR 通用引物在苧麻野生群体中是否存在多态性, 验证其能否用于群体遗传学的分析, 可为其在苧麻谱系地理研究中应用打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

52 份材料均来自广西、广东、贵州、湖南、四川、陕西、湖北、安徽、福建、浙江、江西等 11 个省(区)的 52 个地区。由于苧麻异交性较强, 广泛存在克隆繁殖, 导致其居群内变异较小, 本研究主要是筛选 cpSSR 多态性引物, 每个居群取 1 个样品。采集新鲜、完整的植物幼嫩叶片, 硅胶干燥,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

### 1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 提取、PCR 扩增和电泳 苧麻基因组 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法(Doyle *et al.*, 1987)。选择 23 对位于基因间隔区的叶绿体微卫星通用引物(Chung *et al.*, 2003), 对 52 份苧麻材料进行 PCR 扩增, 扩增产物用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶在 55 W 恒功率条件下电泳, 银染、拍照(Benbouza *et al.*, 2006)。

1.2.2 数据统计与分析 与 Ladder Marker 对比记录条带大小, 录入 Excel 表格, 建立数据矩阵。利用 Popgene 32 软件进行等位基因观察数、有效等位基因数、香农信息指数、多态基因位点百分比等遗传参数分析。用 Power Marker V 3.25 软件, 分析等位基因频率和引物的多态信息含量, 并构建基于 NJ 算法的 52 个苧麻个体聚类树状图。利用 NETW 4611 软件构建基于 MJ 算法的苧麻 Net Work 单倍型网络图。

## 2 结 果 与 分 析

### 2.1 引物筛选分析

23 对 cpSSR 引物中筛选出 16 对多态引物, 片段大小在 220~350 bp 之间, 多态基因位点数 16, 多态基因位点百分比为 69.57%, 每对引物可检测到等位基因 1~3 个。平均等位基因数 1.869 6, 平均有效等位基因数 1.140 1, 平均等位基因频率为 0.938 1, 平均香农信息指数为 0.221 5, 平均多态信息含量 0.105 3, ccSSR2 的多态信息含量最低为 0.102 8, ccSSR9 的多态信息含量最高为 0.303 2(表 1)。

### 2.2 苧麻个体聚类树分析

使用 NJ 算法构建 52 个苧麻个体的系统树(图 1), 共分为 10 支, 其中 III 分为两支, 遵义、娄底归为一支, 勐仑、龙州和阳春归为一支。IV 分为两支, 其

表 1 苕麻 16 对 cpSSR 多态引物的遗传多样性参数  
Table 1 Diversity statistics of 16 pairs of cpSSR primers

基因座 Locus	样本数 Sample size	观察等位基因数 A	有效等位基因数 Ne	等位基因频率 F	香农信息指数 I	多态信息含量 PIC
ccSSR1	52	3.000 0	1.214 7	0.903 8	0.364 7	0.166 5
ccSSR2	51	2.000 0	1.124 5	0.942 3	0.223 7	0.102 8
ccSSR4	52	3.000 0	1.216 9	0.903 8	0.381 3	0.170 4
ccSSR5	48	2.000 0	1.180 3	0.923 1	0.286 8	0.131 9
ccSSR6	52	2.000 0	1.165 5	0.923 1	0.271 2	0.131 9
ccSSR8	51	2.000 0	1.169 0	0.923 1	0.274 9	0.131 9
ccSSR9	52	3.000 0	1.489 0	0.807 7	0.619 0	0.303 2
ccSSR10	46	2.000 0	1.188 8	0.923 1	0.295 4	0.131 9
ccSSR11	51	2.000 0	1.169 0	0.923 1	0.274 9	0.131 9
ccSSR12	52	2.000 0	1.165 5	0.923 1	0.271 2	0.131 9
ccSSR13	48	2.000 0	1.132 7	0.923 1	0.233 8	0.131 9
ccSSR18	50	2.000 0	1.172 6	0.923 1	0.278 8	0.131 9
ccSSR19	52	2.000 0	1.165 5	0.923 1	0.271 2	0.131 9
ccSSR20	50	2.000 0	1.172 6	0.923 1	0.278 8	0.131 9
ccSSR21	49	2.000 0	1.176 4	0.923 1	0.282 7	0.131 9
ccSSR23	52	3.000 0	1.319 0	0.865 2	0.487 0	0.228 0
mean	51	1.869 6	1.140 1	0.938 1	0.221 5	0.105 3

中澜沧、富宁和绿春归为一支，巴卡单独归为一支；V、Ⅶ、Ⅷ三个分支中均仅有一个苕麻个体。此系统树分辨率较低，不能说明苕麻的系统发育关系。

### 2.3 苕麻单倍型网络图分析

52 个苕麻个体聚类归为 8 个单倍型(图 2)。其中单倍型 A 占苕麻总个体数的 71.16%，单倍型 B 占苕麻总个体数的 3.85%，单倍型 C、D、E、H 分别占苕麻总个体数的 1.92%；单倍型 G 占苕麻总个体数的 5.77%，单倍型 F 占苕麻总个体数的 11.54%。其中单倍型 A 分布最为广泛，几乎分布于苕麻所有分布区；单倍型 B、G、H 分布于云南、广西地区，单倍型 F 分布于陕西、福建、浙江，单倍型 C、D、E 则分别分布于广东、贵州、湖南三省。

## 3 讨论

### 3.1 引物的多态性

Botstein *et al.* (1980) 提出多态信息含量(PIC)是衡量基因变异程度高低的指标。本研究表明 cpSSR 引物在苕麻野生群体中多态性较低。产生此现象的原因可能有两方面：一是由于引物的通用性和序列保守性密切相关，但与遗传多态位点互为矛盾。尽管引物具有较高的通用性，但位点过于保守，揭示物种多态性能力较低(魏潇等, 2013)。二是选用的引物所检测的微卫星重复序列均为单碱基重复序列，聚丙烯酰胺凝胶电泳对检测单碱基差

异的灵敏度较弱。而与之相比，DNA 单链构象多态性(SSCP)，作为一种单核苷酸多态性(SNPs)筛选方法，主要用于各种点突变，可能会检测到较多的突变(谢晓兵等, 2011)，因此，可选用此方法检测单碱基重复序列的多态性。尽管所选叶绿体微卫星引物在苕麻中多态性较低，但能够在苕麻野生群体中检测到突变，可应用于苕麻群体遗传和种质资源分析。

### 3.2 苕麻的聚类分析

运用 cpSSR 分子标记构建 52 个地区苕麻样品的系统树，52 个苕麻样本聚类为 10 个平等分支，但系统树分辨率低，结合其地理分布未能清晰说明苕麻的演化关系，说明所筛选的 cpSSR 引物不适用于苕麻种内的系统发育研究；而运用 cpSSR 分子标记构建的单倍型网络图，结果显示 52 个苕麻样本聚类为 8 个单倍型，显示不同地区苕麻存在丰富的单倍型变异。虽然本研究所用样本数较少，不能准确分析苕麻的系统演化和谱系地理关系，但筛选的 cpSSR 引物能够用于检测苕麻种内单倍型变异，为苕麻谱系地理研究打下了基础。

### 参考文献：

- Birky CW, Maruyama T, Fuerst P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results[J]. *Genetics*, **103**:513-527
- Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP, *et al.* 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels[J]. *Biotechnol Agron Soc Environ*, **10**:77

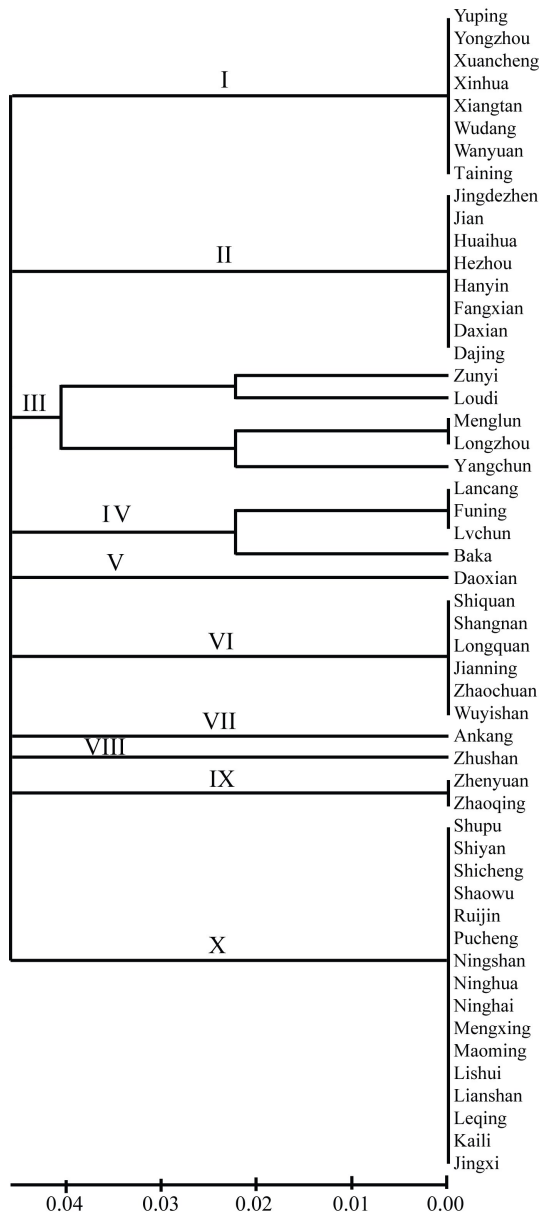


图 1 基于 NJ 法构建的 52 个苧麻个体聚类树

Fig. 1 Tree of 52 samples based on Neighbor-Joining algorithm

- Biss P, Freeland J, Silvertown J, *et al.* 2003. Successful amplification of rice chloroplast microsatellites from century-old grass samples from the park grass experiment[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **21**: 249–257
- Bostein D, White RL, Skolnick M, *et al.* 1980. Construction of a genetic linkage map in a using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Genet*, **32**(3): 314–331
- Chen JH(陈建华), Xu Y(许英), Wang XF(王晓飞), *et al.* 2011. Advances in research on germplasm resources in genus *Boehmeria* Jacq. (苧麻属植物资源基础研究进展)[J]. *J Plant Gen Res* (植物遗传资源学报), **12**(3): 346–351

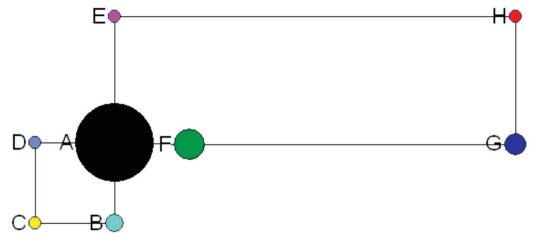


图 2 52 个苧麻个体单倍型聚类图 圆圈大小表示单倍型频率; 线段长短表示亲缘关系远近。

Fig. 2 Network dendrogram of 52 samples Circle size is proportional to haplotypes; Line length is proportional to genetic distance.

- Chung SM, Staub JE. 2003. The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa[J]. *Theor Appl Genet*, **107**(4): 757–767
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, **19**(1): 11–15
- Kaundun SS, Matsumoto S. 2002. Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea *Camellia sinensis* [J]. *Genome*, **45**(6): 1 041–1 048
- Liao L(廖亮), Li TJ(李同建), Liu ZL(刘中来), *et al.* 2009. Phylogenetic relationship of Ramie and its wild relatives based on cytogenetics and DNA sequences(基于细胞学和 DNA 序列的苧麻与其野生近缘类群系统关系研究)[J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), **35**(10): 1 778–1 779
- Lian C, Oishi R, Miyashita N, *et al.* 2003. Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis[J]. *Mol Ecol*, **12**: 609–618
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, *et al.* 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations[J]. *Mol Ecol*, **14**: 689–701
- Provan J, Powell W, Hollingsworth PM. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution [J]. *Trends Ecol Evol*, **16**: 142–147
- Sukhotu T, Kamijima O, Hosaka K. 2004. Nuclear and chloroplast DNA differentiation in Andean potatoes[J]. *Genome*, **47**: 46–56
- Tang DL(唐冬丽), Jia HH(贾红辉), Jiang JX(蒋建雄), *et al.* 2011. Study on phylogenetic relationships of *Boehmeria* based on TrnL-F regions (利用 TrnL-F 序列探讨苧麻属植物的系统发育关系)[J]. *Lett Biotechnol* (生物技术通讯), **22**(1): 45–48
- Wei X(魏潇), Zhang QP(章秋平), Liu WS(刘威生), *et al.* 2013. Distribution analysis of chloroplast microsatellite in chloroplast DNA in peach (*Prunus persica* L.) (桃叶绿体全序列微卫星分布规律研究)[J]. *Liaoning Agric Sci* (辽宁农业科学), (2): 5–8
- Xie XB(谢晓兵), Yu JW(于霁雯), Wu MC(吴曼), *et al.* 2011. Analysis of SSCP for cotton differentially expressed genes related to fiber development (利用 SSCP 技术分析棉花纤维差异表达的基因)[J]. *Cotton Sci* (棉花学报), **23**(4): 306–310