

石斛 SSR 标记的开发及可转移性分析

邱道寿, 郑希龙, 蔡时可, 郑锦荣, 罗焕明, 张蕾, 邓瑞云, 李武, 刘晓津*

(广东省农业科学院作物研究所, 广东省农作物遗传改良重点实验室, 广州 510640)

摘要: 当前已开发的石斛(*Dendrobium*)SSR 标记仅 100 余对, 难以满足研究的需要。为开发更多石斛分子标记, 本研究通过生物信息学方法从公共核酸数据库搜索石斛 SSR。结果表明, GenBank 收录的 3599 条石斛 DNA 序列经拼接获得 1343 条 Uni-DNA 序列。经搜索, 共检测出 283 个 SSR, 分布于 205 条 Uni-DNA 序列, 平均每 2815 bp 含一个 SSR。通过序列比对, 删除 86 条已开发引物的 SSR-DNA 序列, 从剩余的 119 条序列设计 76 对引物, 并在石斛属 32 个种间进行可转移性分析, 结果显示 47 对引物得到有效扩增, 种间可转移率为 51.1%~95.7%, 平均为 75.9%。有效扩增引物中有 46 对在石斛种间具多态性, 检测出等位基因数 2~8 个, 平均 4.0 个。选取 10 对多态性引物扩增 60 份铁皮石斛资源, 每对引物检测出等位基因数 2~5 个, 平均 3.4 个。根据 SSR 扩增带型将 60 份铁皮石斛资源聚为 5 大类, 同一类型内的表型较类群间接近。对 DM121 扩增产物测序表明铁皮石斛种内的 SSR 等位变异由 SSR 重复次数差异造成, 而石斛种间的 SSR 等位变异还包含 SSR 位点侧翼序列的插入缺失以及替换。

关键词: 石斛; SSR; 开发; 可转移性; 多态性

中图分类号: Q949.71⁺8.43

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)05-0500-10

Development and Transfer Analysis of SSR in *Dendrobium*

QIU Dao-Shou, ZHENG Xi-Long, CAI Shi-Ke, ZHENG Jin-Rong,
LUO Huan-Ming, ZHANG Lei, DENG Rui-Yun, LI Wu, LIU Xiao-Jin*

(Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences,
Key Laboratory of Crops Genetics and Improvement of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To date, only 100 SSR markers in *Dendrobium* have been developed, which are far from sufficient for research applications. To develop molecular markers, we mined SSR of *Dendrobium* from public nucleotide data through bioinformation methods. Some 1343 Uni-DNA sequences were assembled from the 3599 DNA sequences of *Dendrobium* from GenBank. By scanning the Uni-DNA sequences, 283 SSRs were distributed in 205 Uni-DNA sequences, with an average frequency of 1 SSR per 2815 bp. Sequence alignment indicated that 86 of the 205 SSR-DNA sequences had already been used to design primers. In this study, 76 primer pairs were designed from the remaining 119 sequences for transferability analysis among 32 *Dendrobium* species. Results showed that 47 primer pairs were amplified effectively with transfer rates ranging from 51.1% to 95.7% (average 75.9%). Of which, 46 primer pairs were able to detect polymorphism among the *Dendrobium* species with 2~8 alleles (average 4.0 alleles). Ten pairs of polymorphic primers were selected to detect polymorphism in 60 accessions of *D. officinale*, and 2~5 alleles (average 3.4 alleles) were found per SSR locus. Based on the SSR amplification pattern, the 60 accessions of *D. officinale* were clustered into

收稿日期: 2012-11-06, 修回日期: 2013-08-07。

基金项目: 广东省社会发展项目(2011A030100002); 广东省部产学研结合项目(2011B090400537); 广东省良种培育和引进项目(粤财农[2011]584 号 粤农计[2011]143 号); 广东省农科院院长基金项目(201109)。

作者简介: 邱道寿(1965-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事岭南药材育种与生物技术研究(E-mail: dsqiu@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: lxj6306@aliyun.com)。

five clusters, and phenotypes were closer within clusters than between clusters. The sequencing of the amplified fragment of DM121 revealed that allele variation within *D. officinale* was attributed mainly to the variation of SSR repeat numbers, whereas allele variations among *Dendrobium* species were also caused by a single base indel and substitution in the microsatellite flanking region.

Key words: *Dendrobium*; SSR; Development; Transfer; Polymorphism

石斛(*Dendrobium* Sw.)为兰科第二大属, 全球共有 1500~1600 种^[1], 我国有 76 种^[2]。尽管我国石斛资源仅占世界 5%, 但其药用开发利用一直走在前沿。药用石斛的基原植物为铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)、金钗石斛(*D. nobile* Lindl.)、马鞭石斛(*D. fimbriatum* Hook. Vat. *oculatum* Hook.)及其近似种。其中, 铁皮石斛尤为珍品, 位列“中华九大仙草”之首。药用石斛具有益胃生津, 滋阴清热之功效。用于热病津伤、口干烦渴、胃阴不足、食少干呕、病后虚热不退、阴虚火旺、骨蒸劳热、目暗不明、筋骨痿软等症^[3]。此外, 石斛兰具有极高的观赏价值, 因其花姿优雅、花色鲜艳、花形优美、花期长, 被喻为“四大观赏洋兰”之一。然而, 由于毁林开荒以及过度采挖, 野生石斛资源遭到很大破坏, 很多种类已被列为重点保护珍稀濒危药用植物^[4-7]。因此, 保护野生石斛资源已迫在眉睫, 而开展野生石斛资源的收集和研究则是保护石斛资源实现我国药用石斛可持续利用的关键。

近年来分子标记逐步应用于石斛种质资源研究, 其中 SSR(Simple Sequence Repeats, 简单序列重复)标记由于具有多态性高、可重复性强、共显性等优点, 成为石斛主要分子标记之一。然而, 目前已开发的石斛 SSR 标记仅 100 余对^[8-15], 难于满足研究的需要。因此, 开发 SSR 标记成为近期石斛分子标记研究的重要内容。

随着测序技术的发展, 公共数据库中快速增长的 DNA 序列成为 SSR 标记的重要来源。从核酸数据库中开发 SSR 标记具有简便、快捷、节约成本等诸多优点^[16], 现已成为动植物 SSR 标记开发的主要途径。鉴于此, 本研究拟利用 GenBank 收录的石斛 DNA 序列, 采用生物信息学方法开发 SSR 标记, 并对其在石斛属种间的可转移性以及铁皮石斛资源中的遗传多样性进行系统分析与评价。本研

究旨在通过石斛 SSR 标记开发和可转移性分析为后续研究者提供更多具有多态性的石斛 DNA 标记。

1 材料和方法

1.1 实验材料

从 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载石斛 DNA 序列 3599 条(截止 2012 年 3 月 20 日), 其中 Nucleotide 序列 2796 条, EST(Expressed Sequence Tag, 表达序列标签)序列 802 条, GSS(Genome Survey Sequence, 基因组勘测序列)序列 1 条。

32 个石斛(*Dendrobium*)种用于 SSR 可转移性分析, 60 份铁皮石斛资源用于 SSR 多态性分析, 材料由广东省旱地作物资源库南药资源圃提供(表 1)。

1.2 基因组 DNA 提取

每个材料取生长期叶片 1 g, 采用植物基因组大量提取试剂盒提取(BioTeke, China), 超微量紫外/可见分光光度计(ND-2000C, Thermo, USA)测量 DNA 浓度。

1.3 DNA 序列拼接

采用 TIGR 基因指数聚类工具(TIGR Gene Indices Clustering Tools, 简称 TGICL, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/>) 对石斛 DNA 序列进行拼接。当 DNA 序列重叠超过 50 个核苷酸且相似度达到 90%, 同时序列不匹配长度不超过 20 个核苷酸时被认为符合拼接要求。

1.4 SSR 位点搜索

采用自动搜索 SSR 位点的 Perl 脚本 MicroSatellite (MISA, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 在 Uni-DNA 序列中搜索 SSR 位点。在本研究中, SSR 位点的搜索设置几个限制因子: 最短 15 bp, 二核苷酸最少重复 8 次, 三核苷酸至少重复 5 次, 四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸至少重复

表 1 32 种石斛样品的名称与来源
Table 1 Name and origin of the 32 samples of *Dendrobium* species

序号 No.	种名 Species	产地 Locality	序号 No.	种名 Species	产地 Locality
1	重唇石斛 <i>D. hercoglossum</i>	广西 Guangxi	17	喇叭唇石斛 <i>D. lituiflorum</i>	云南 Yunnan
2	唇石斛 <i>D. aphyllum</i>	云南 Yunnan	18	霍山石斛 <i>D. huoshanense</i>	安徽 Anhui
3	卓花石斛 <i>D. anosmum</i>	广东 Guangdong	19	美花石斛 <i>D. loddigesii</i>	广西 Guangxi
4	翅萼石斛 <i>D. cariniferum</i>	浙江 Zhejiang	20	广西石斛 <i>D. scoriarum</i>	云南 Yunnan
5	密花石斛 <i>D. densiflorum</i>	海南 Hainan	21	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	浙江 Zhejiang
6	束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>	广西 Guangxi	22	梳唇石斛 <i>D. strongylanthum</i>	云南 Yunnan
7	短棒石斛 <i>D. capillipes</i>	浙江 Zhejiang	23	金钗石斛 <i>D. nobile</i>	云南 Yunnan
8	鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i>	云南 Yunnan	24	拟滇桂石斛 <i>D. nidiangui</i>	云南 Yunnan
9	反瓣石斛 <i>D. ellipsophyllum</i>	广东 Guangdong	25	报春石斛 <i>D. primulinum</i>	缅甸 Burma
10	晶帽石斛 <i>D. crystallinum</i>	云南 Yunnan	26	齿瓣石斛 <i>D. devonianum</i>	云南 Yunnan
11	铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	云南 Yunnan	27	球花石斛 <i>D. thyrsiflorum</i>	云南 Yunnan
12	流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>	广西 Guangxi	28	小美石斛 <i>D. bellatulum</i>	云南 Yunnan
13	剑叶石斛 <i>D. acinaciforme</i>	云南 Yunnan	29	翅梗石斛 <i>D. trigonopus</i>	云南 Yunnan
14	细叶石斛 <i>D. hancockii</i>	云南 Yunnan	30	聚石斛 <i>D. lindleyi</i>	云南 Yunnan
15	钩状石斛 <i>D. aduncum</i>	云南 Yunnan	31	棒节石斛 <i>D. findlayanum</i>	云南 Yunnan
16	聚石斛 <i>D. lindleyi</i>	云南 Yunnan	32	杯鞘石斛 <i>D. gratiosissimum</i>	云南 Yunnan

4 次, 不包含单核苷酸类型。

1.5 SSR 引物设计

根据 SSR 位点两端的保守区域, 采用 Primer premier 5 软件设计引物。引物设计基于下列原则: (1) 溶解温度 (T_m) $50^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$, 最适温度 55°C ; (2) 扩增产物大小 $80 \sim 350\text{ bp}$; (3) 引物长度 $18 \sim 26\text{ bp}$; (4) 引物 GC 含量 $40\% \sim 60\%$ 。

1.6 PCR 扩增

PCR 反应体系 ($20\text{ }\mu\text{L}$): $1 \times \text{PCR buffer}$ (50 mmol/L KCl , $10\text{ mmol/L Tris-HCl}$, $\text{pH }8.3$, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 0.1% 明胶), 1 U Taq DNA 聚合酶 , $50 \sim 100\text{ ng 模板 DNA}$, $0.15\text{ }\mu\text{mol/L 引物}$, 0.2 mmol/L dNTP 。反应条件为 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 1 min , 55°C 退火 30 s , 72°C 延伸 1 min , 35 个循环; 72°C 延伸 5 min 。扩增产物在 6.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳(电泳缓冲液 $1\times\text{TBE}$, 电压 75 V , 时间 2.5 h), $0.1\%\text{ AgNO}_3$ 染色, 于 BIORAD 凝胶成像系统下观察、照相、读带。

1.7 PCR 产物克隆与测序

采用 PAGE 胶回收试剂盒(Biotek, China)回收扩增产物, 回收产物与克隆载体 pMD18-T 连接后转化大肠杆菌 $\text{DH}5\alpha$ 感受态细胞, 重组子经鉴定后送北京华大基因有限公司测序。

1.8 数据统计与分析

观察各 SSR 位点在供试样本间 PCR 扩增条带的差异, 清晰带赋值为“1”, 无扩增带的赋值为“0”, 用 Excel 软件统计整理。采用 Simpson 指数计算 SSR 位点的多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC)^[13]。

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n pi^2$$

式中 n =该位点的等位基因数, pi =第 i 个等位基因在群体中的频率。采用遗传进化分析软件 NTSYSpcl 2.1 (<http://www.exe-tersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>) 进行聚类分析, 所用的聚类方法为 UPGMA。

2 结果与分析

2.1 DNA 序列拼接

为了减少冗余序列, 提高 DNA 序列质量, 获得比单个 DNA 序列更长, 且来自同一位点的共有序列, 本实验采用 TIGCL 工具对石斛 DNA 序列进行拼接。结果表明, 3599 条 DNA 序列经拼接后共获得 1343 条 Uni-DNA 序列, 其中片段重叠群 (contigs) 160 条, 单片段 (singletons) 1183 条。

2.2 SSR 分布频率及特点

利用 Perl 脚本 MISA 在 Uni-DNA 序列中搜索 SSR, 结果从 1343 条 Uni-DNA 序列中共搜索到

283 个 SSR, 分布于 205 条 DNA 序列, 其中含有 SSR 1 个以上的 DNA 序列 76 条, 平均每 2815 bp 1 个 SSR(表 2)。

已搜索到的石斛 SSR 种类较为丰富, 二至六核苷酸重复均存在, 但出现的频率存在较大差异(表 2)。二核苷酸重复出现频率最高, 共 209 个, 占总 SSR 的 73.8%, 其次是三核苷酸重复(65 个, 23.0%)、四核苷酸重复(4 个, 1.4%)、五核苷酸(3 个, 1.1%)和六核苷酸重复(2 个, 0.7%)。

所有重复平均长度为 31.4 bp, 其中二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸平均 SSR 长度分别为 34.7、23.2、25、20、27 bp。

在搜索出的石斛 SSR 中共观察到 19 种重复基序(repeat motif), 其中二、三、四、五、六核苷酸重复基序分别为 3、8、3、3、2 种。出现频率最高的 3 种重复基序包括 AC/GT (37.8%)、AG/CT (34.6%) 和 AAG/CTT (18.0%), 其余 16 种重复基序仅占 9.5%(表 3)。

表 2 石斛 DNA 序列中无冗余 SSR 搜索结果
Table 2 Summary of mining SSR in *Dendrobium* DNA sequences

查询项目 Searching item	片段重叠群 (bp) Contigs	单片段 (bp) Singletons	合计 (bp) Total
检测的序列总数 Total number of sequences examined	160 (132370)	1183 (664173)	1343 (796543)
鉴定的 SSR 总数 Total number of identified SSRs	42	241	283
含 SSR 的序列数 Number of SSR containing sequences	32	173	205
含 1 个以上 SSR 的序列数 Number of sequences containing more than 1 SSR	7	44	51
复合型 SSR 的数目 Number of SSRs present in compound formation	9	61	70
二核苷酸 Di-nucleotide	26	183	209
三核苷酸 Tri-nucleotide	14	51	65
四核苷酸 Tetra-nucleotide	1	2	3
五核苷酸 Penta-nucleotide	1	1	2

表 3 石斛中 19 种 SSR 基序的出现频率与数量
Table 3 Occurrence and number of repeats of 19 SSR motifs in *Dendrobium*

重复基序 Repeat motifs	重复单元数 Number of repeat units										合计 Total
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	>12	
AC/GT	-	-	-	-	17	15	10	7	5	53	107
AG/CT	-	-	-	-	20	13	9	3	5	48	98
AT/AT	-	-	-	-	1	1				2	4
AAC/GTT	-		1	1		1					3
AAG/CTT	-	10	10	5	5	3	6	5	5	2	51
ACC/GGT	-		1								1
ACG/CTG	-		1	1							2
AGC/CGT	-					1					1
AGG/CCT	-	2		1							3
AGT/ATC	-	1									1
CCG/CGG	-	3									3
AAAG/CTTT	1										1
AAAT/ATTT		1									1
AGAT/ATCT					2						2
AATAT/ATATT	1										1
ACAGC/CGTGT	1										1
AGCTC/AGTCG	1										1
AATACT/ATGATT		1									1
AATGCG/ACGCTT	1										1
合计 Total	5	18	13	8	46	33	25	15	15	105	283

2.3 SSR 引物设计及多态性检测

为了避免对同一 SSR-DNA 序列重复设计引物, 将前人开发的 113 对 SSR 引物与本研究搜索到的 205 条 SSR-DNA 序列进行比对^[8-15], 发现有 86 条 SSR-DNA 序列已被用于开发 SSR 引物, 其中 12 条被重复设计出 25 对引物(表 4)。鉴于此, 本研究只针对剩余的 119 条 SSR-DNA 序列设计引物, 共设计引物 76 对, 其余 43 条序列由于 SSR 侧翼序列太短或者结构复杂而未能成功设计。已设

表 4 同一位点已设计的引物

Table 4 Primers designed from identical loci

SSR 位点数 No. of SSR loci	引物 Primer	SSR 位点数 No. of SSR loci	引物 Primer
1	GSSR3, BWH009	7	GSSR29, DO-07
2	GSSR8, S136	8	GSSR30, BWH007
3	GSSR15, DO-03, DO-11	9	XML005, F8
4	GSSR16, DO-01	10	XML007, F27
5	GSSR22, BWH012	11	YYH003, YYH004
6	GSSR25, OA23	12	YYH009, YYH012

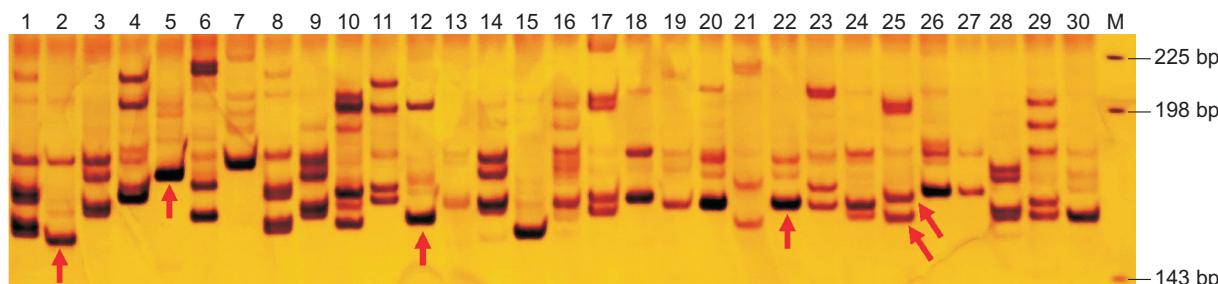
注: 标记 OA、DO、F、XML、YYH、BWH、GSSR 引自参考文献 [8,9,10,11,12,14,15]。

Note: Marker OA, DO, F, XML, YYH, BWH and GSSR was derived from references [8,9,10,11,12,14,15].

计引物的 DNA 序列包含 5 种重复类型, 其中含二、三、四、五、六核苷酸重复分别为 45、25、3、2、1 条。

采用新设计的 76 对引物扩增 32 个石斛种基因组 DNA, 检测 SSR 在石斛种间的可转移性。结

果发现有 47 对引物能扩增出清晰条带, 其余 29 对无扩增产物。可扩增引物有 45 对扩增长度与预期相近, 另外 2 对明显大于预期。47 对可扩增引物在石斛种间的可转移率为 51.1%~95.7%, 平均为 75.9%, 其中 46 对检测出多态性, 占可扩增引物的 97.9%。每对多态性引物检测出等位基因数 2~8 个(图 1、表 5、表 6), 平均 4.0 个, 表明 SSR 在石斛种间多态性高。为进一步检验 SSR 在石斛种内的多态性, 随机挑选 10 对 SSR 引物(DM4、DM6、DM8、DM34、DM45、DM68、DM81、DM112、DM121、DM141)扩增 60 份铁皮石斛资源基因组 DNA, 结果 10 对引物均能检测出多态性, 检测等位基因数 2~5 个, 平均 3.4 个, 被检测位点的多态性信息量(PIC)为 0.473~0.787, 平均 0.684(图 1)。将 10 对引物的扩增带型数字化后聚类分析。结果显示 10 对 SSR 引物能够区分 56 份铁皮石斛资源, 但未能将 NYT69 与 NYT70、NYT107 与 NYT108 区分开。在相似系数为 0.55 处, 60 份资源被划分为 5 大类, 各类群依次包含 4、42、11、2 和 1 份资源(图 2)。进一步观察铁皮石斛的形态性状发现同一类群内铁皮石斛的表型较类群间接近, 其中单独聚为一类的品系 NYT112 表型与其他类群差异最大, 该品系由铁皮石斛与霍山石斛杂交获得。另外, NYT69 与 NYT70、NYT107 和 NYT108 表型极为相似。



1~15 代表石斛种类: 卓花石斛(1), 翅萼石斛(2), 密花石斛(3), 束花石斛(4), 短棒石斛(5), 鼓槌石斛(6), 反瓣石斛(7), 晶帽石斛(8), 唇石斛(9), 流苏石斛(10), 剑叶石斛(11), 细叶石斛(12), 钩状石斛(13), 聚石斛(14), 喇叭唇石斛(15); 16~30 代表铁皮石斛品系: NYT11 (16), NYT12 (17), NYT13 (18), NYT14 (19), NYT15 (20), NYT22 (21), NYT32 (22), NYT38 (23), NYT45 (24), NYT47 (25), NYT49 (26), NYT51 (27), NYT52 (28), NYT56 (29), NYT57 (30); M 代表 DNA marker; 箭头标示的条带为测序条带。

1-15 represent *Dendrobium* species: *D. anosmum* (1), *D. cariniferum* (2), *D. densiflorum* (3), *D. chrysanthum* (4), *D. capillipes* (5), *D. chrysotoxum* (6), *D. ellipsophyllum* (7), *D. crystallinum* (8), *D. aphyllum* (9), *D. fimbriatum* (10), *D. acinaciforme* (11), *D. hancockii* (12), *D. aduncum* (13), *D. lindleyi* (14), *D. lituiflorum* (15); 16~30 represent lines of *D. officinale*: NYT11 (16), NYT12 (17), NYT13 (18), NYT14 (19), NYT15 (20), NYT22 (21), NYT32 (22), NYT38 (23), NYT45 (24), NYT47 (25), NYT49 (26), NYT51 (27), NYT52 (28), NYT56 (29), NYT57 (30); M represents DNA marker. Bands indicated by the arrows were sequenced.

图 1 引物 DM121 扩增的微卫星等位基因聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of microsatellite alleles amplified with the primer DM121

表 5 石斛 SSR 引物的特性
Table 5 Characteristics of SSR primers in *Dendrobium*

引物 Primer	正向引物 Forward primer sequence (5'-3')	反向引物 Reverse primer sequence (5'-3')	重复基序 Repeat motif	预期大小 Expected size (bp)	实际大小 Size (bp)	等位基因数 Allele No.	转移率 Transfer rate
DM2	GAGTCGTAAGAGGCAGTTGT	AATGGATGGTATCTATGTCGTAT	(AGTCG)4	276	276~310	3	100.0%
DM3	CTCCGGCGCTAGCTGTTGC	TCACTTGCAGATGGGGAGC	(TC)13	178	178~200	2	100.0%
DM4	GGCGTCCGAGCTTCCCAGTT	GCATCACCAACCACGTCCAAT	(ATGCGA)4	233	600~700	3	84.4%
DM5	CTCCAAATGATGTGATTACCGTT	ATGCTATACCAGTCAAATTCTCAC	(CT)19	243	243~290	6	93.8%
DM6	GGGGAGGGTTGCAAATATG	CGCTGCGTCCAGTAATCAC	(CT)26	257	257~280	5	75.0%
DM7	AAAGCGTCAATAAGGAACTAAC	CACTGTAGCAATGGAGCGAAGATAG	(AAG)8	250	250~290	5	81.3%
DM8	GGGAGCAGGAAGCCAAAGACAA	CGCAGACGCCAACACCAAA	(AG)18	286	280~300	6	96.9%
DM9	TCAATCTGATAAGAAGAGGTGGCT	TGAAGGGCATTAAGAAGAGCA	(GCT)7	142	140~160	4	96.9%
DM34	CACATCGTCCGTATCCAC	GCCTAGCCTAAGAAACTCACCT	(CAG)8	248	210~250	4	84.4%
DM36	TGGCAACGAAGATTACATAGTG	GGCGGCAACTCCATTCA	(CTT)10	280	260~290	4	78.1%
DM45	TATAGGGTTGAAATTGAGGG	TATGGTTGGTGGAGGCAAAGTAA	(GT)83	208	200~300	4	25.0%
DM59	CTAAATGTGAGTGGGTGAGAGGTG	GGGTGCCGCATCCCAAGCT	(GT)32	154	154~165	2	100.0%
DM60	GATCATGTTAGGGTTGAAAT	AAAAGACTTGGCTAAGAAGTACAA	(GT)17	230	200~230	2	18.8%
DM68	AGCATTTGAGATGGGTGATC	ATTGTCCTCGCCGATATGAGTA	(CT)16(CA)20	197	190~230	4	100.0%
DM76	TCAAATTGAATGTAACATCCCT	AATCAAATCGACTTAACATGGTTA	(CA)20	246	246~256	2	28.1%
DM81	CTCCAATACCGATATGCTG	TCGGCTACAGGTAAAGTGG	(GA)31	107	100~115	2	100.0%
DM85	AGCAAAGCCAACGACAGC	CCTCTTCCCTCCGATCCTC	(TG)26	180	290~350	4	75.0%
DM112	CTGGCATTGCTTGGTTATTCT	GACCGAACACCTTAGACCTATTT	(AC)10	255	240~260	4	71.9%
DM113	CTCCTCCAACCTTCTTAGC	GATCCTCAGACTGAAAACCTAG	(AGAT)8	150	150~210	6	81.3%
DM118	TCTGATAACTGACTGAGGTGC	AGGAAGGAAAAGATAAGGGA	(CTT)7	99	90~110	3	75.0%
DM119	GGTCCCTGAGAAAGAGCATAG	CACACAACCTCCACTCATAAGG	(GA)21	111	80~120	6	93.8%
DM120	AAAGATGTGCAATGTCACCAAAT	GCTCATTTATGCCTCTCTCAA	(AC)14	126	80~130	7	96.9%
DM121	GATGAAGAGCGCGGTGTT	AAAGCAACAATAAGAACCCCCC	(GAG)7	161	140~180	8	96.9%
DM122	TCATTGAAGGTCAAGCATGGA	AGTCGCCCTAGATGGTTGGT	(ACA)7	269	269	1	6.3%
DM123	ATAGTGGGATAAAGGCTG	ATCAGTATCCACAACTTTA	(TTG)9	184	180~210	4	100.0%
DM125	TCATTAGGGCACTTGATTACTTACA	ATTCTGATAATCTGACTGAGGTGC	(AGA)9	222	210~230	4	96.9%
DM137	CTGACTGAGGTGCAGAGGTTG	CCTGATGATGAGTATGAAGAGGC	(CTT)9	152	130~160	4	100.0%
DM141	GGCACTATTCCAAGACTACCA	GCAACCACATCGCAACTTAT	(AATA)5	219	210~240	4	81.3%
DM142	GGCACTATTCCAAGACTACCA	CGACGACATCGCAACTTATT	(TATAT)4	207	220~250	5	90.6%
DM165	CCATCGGTTTCATTGATCTGTT	GCGTAGCGTATCGTCTCTCAA	(GGC)5	257	230~280	4	96.9%
DM169	CGAAAGATGCGGACCAGA	ATGAAATGAAGGGTTGAGGTAT	(AG)8	263	263~350	6	68.8%
DM171	CGTCCAAGCACAGTAGCTCTCA	TGTCTCCACATTCTACAAAAA	(CA)8	188	188~205	3	21.9%
DM172	CATCCTGGTTAATGTAACAAAG	AATACTGGTTCTAATGCTA	(GT)8	108	108~150	4	34.4%
DM178	TCCTCCAGCTAACACCATCA	CGCCACCCCTACACTAAAGAAA	(CA)9	290	290~310	3	100.0%
DM180	ATCGGGCTTGGTTGATTAC	CTGTCGGTAGGATAAGCAAAA	(CA)9	125	125~135	3	78.1%
DM182	AGCTCAAGACTGGGTAGATTGGA	TTACGGCTGCCCTAACAGAAAT	(AC)9	239	220~239	2	43.8%
DM183	TGATGATGAATACGAAGAGCCAG	TGATTAAGGTGCAGAAGTTACTCT	(AAG)6	139	139~150	2	43.8%
DM184	TTGCTGCTGCAGAAATTGAGC	AAAGGGAAAGCACATGCCAGT	(TCT)6	162	162~180	3	87.5%
DM186	GCCTTCTACAGCACGGGTCT	GGAAATCTGAAACCAGGAGGC	(TTC)6	232	180~280	7	100.0%
DM188	AGAAGAGTGTGCGATGAGGTGCAG	ATGTTAACCGCCCTAACAGAAA	(AGA)5	183	290~310	3	50.0%
DM189	CCATTCCGCTGTATAACCTG	AGCAGGCCGTCTAACAAAC	(GCG)5	291	280~300	3	93.8%
DM193	GGACGCACCATTAACATTAC	GTCTGTAGGATGAAACGAAAGC	(TTC)5	155	155~170	3	59.4%
DM194	GGACTCACTGAAAGCGCAACA	ATTGAAGGCAAGGAAGGCAGT	(CT)8	210	200~240	5	59.4%
DM195	CGCTGAAAGTTGAGTTGGAGA	AAGTTGAGCGGAAAGCAAAAGC	(GA)8	123	120~150	5	56.3%
DM198	AAAAGCACTCAAAGACAAAATCAA	GATGAGTGAAGGGATGGGTGC	(TCT)6	258	210~270	4	100.0%
DM199	GTGTCTGCCGAGTAAAGC	ACGTACCGGTTACCAAGGTCT	(TGC)6	216	216~235	4	100.0%
DM200	GTCAGAATGGTGGCGGTGCT	GCAGGAAACAATTCAATATGAGCC	(TGG)6	98	98~120	5	43.8%

表 6 SSR 引物在 32 种石斛中的可转移性
Table 6 Transferability of SSR primers among 32 *Dendrobium* species

转移率

Transfer 80.9 93.6 89.4 63.8 80.9 85.1 74.5 83.0 61.7 74.5 89.4 80.9 74.5 76.6 57.4 74.5 78.7 78.7 68.1 76.6 74.5 85.1 72.3 95.7 61.7 72.3 72.3 68.1 51.1 83.0 83.0 66.0
rate (%)

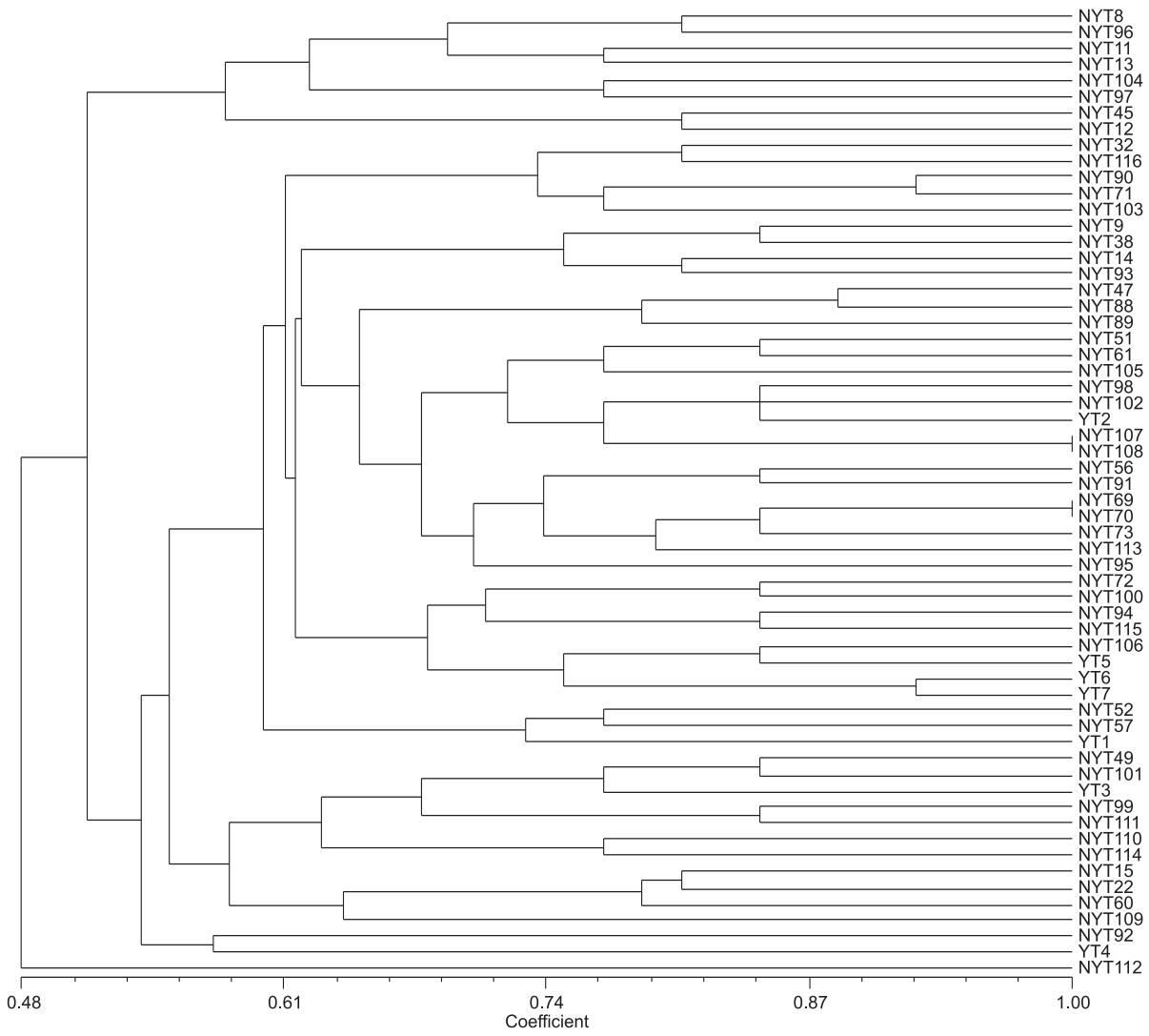


图 2 基于 60 个铁皮石斛品系 SSR 数据生成的非加权配对组算术平均法 (UPGMA) 聚类图
Fig. 2 Dendrogram was generated using unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) based on SSR data of 60 lines of *D. officinale*

为揭示石斛 SSR 多态性的成因, 将引物 DM121 在 3 个石斛种 (*D. capillipes*、*D. hancockii*、*D. cariniferum*) 和 2 个铁皮石斛品系中 (NYT15、NYT49) 的扩增产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳回收主带 DNA, 随后进行测序 (图 1)。结果表明, DM121 在 NYT15 和 NYT49 中的主带 DNA 序列仅在 SSR 位点上存在差异, 其中 NYT49-2 比 NYT49-1 增加 3 个 AGG 基序, NYT15 则比 NYT49-1 多出 2 个 AGG 基序。而 *D. cariniferum*、*D. capillipes*、*D. hancockii* 和 *D. officinale* (NYT15 和 NYT49) 在 DM121 位点上除了 SSR 重复次数差异外, 其侧翼序列也存在差异, 包括两处插入缺失

(InDel, insertion and deletion) 和三处碱基替换 (C-G、G-A 和 A-T) (图 3)。上述结果说明铁皮石斛品系间 SSR 多态性由 SSR 重复次数差异造成, 而石斛种间的多态性则与 SSR 重复次数变动, 侧翼序列的插入缺失和碱基替换有关。

3 讨论

本研究从总长 796543 bp 的 Uni-DNA 序列中共搜索到 283 个 SSR 位点, 平均每 2814 bp 出现一个 SSR。与水稻 (*Oryza sativa*)、高粱 (*Sorghum vulgare*)、短柄草 (*Brachypodium sylvaticum*) 等单子叶植物^[18] 相比, 本研究中石斛 SSR 频

重复序列以虚线框标示。点突变和插入缺失区用实线框标记。

Repetitive sequences are indicated in dashed box. Point mutations and indel regions are marked by box with solid line

图 3 引物 DM121 扩增的 6 条 SSR 与源自 DNA 序列(登记号: FJ821157)的原始 SSR 的序列比对
 Fig. 3 Alignment of sequences obtained from six SSR bands amplified by DM121 primers and original SSR-derived DNA sequence (accession No.; FJ821157)

率明显偏高，这除了与石斛基因组序列特性有关外，还与 DNA 序列的组成有关。用于开发 SSR 的 3364 条 DNA 序列中有 212 条序列来自 SSR 富集文库，这些序列导致统计结果偏离正常水平。剔除上述 212 条 SSR 序列，SSR 出现频率为 1/6887 bp，仍高于短柄草、高粱，但略低于水稻，而与蝴蝶兰 (*Phalaenopsis amabilis*) 相比，石斛 SSR 出现频率稍高^[19]。

本研究供试的 76 对 SSR 引物中有 29 对未能有效扩增，其原因可能是扩增区段存在较复杂的高级结构。在可扩增的 47 对引物中，2 对扩增产物片断大于预期长度，由于这 2 对引物来自 EST 序列，推测其扩增产物包含内含子。此外，电泳检测扩增产物还发现一些扩增产物存在多条电泳带的现象，由于本研究采用的退火温度较高，其原因可能是石斛基因组较复杂^[20]，存在多个与引物同源的序列。

近年来公共数据库中核酸序列的增加极大方便了 SSR 标记的开发。例如，肖冬长等曾利用 GenBank 中收录的石斛 Nucleotide 序列开发了 21 对扩增效果良好的 SSR 引物^[15]。但公共数据库 DNA 序列的共享性常导致同一 SSR 位点被不同研究团队重复设计引物。本文共发现 12 个石斛 SSR 位点被重复设计引物。为此，在做好序列拼接的基础上，应将 SSR-DNA 序列与前人开发的 SSR 引物进行仔细比对，剔除已开发引物的 DNA 序列，避

免对同一位点重复设计引物。

本研究利用新开发的 SSR 引物扩增 32 个石斛种，不仅方便新标记在所检测石斛种中的直接利用，同时还揭示 SSR 在石斛种间具有较高可转移性(75. 9%)。一般来说，植物 SSR 在属间可转移性极低，但在属内具有较高的可转移性，但不同物种间可转移性仍存在一定差异^[21-24]。显然，SSR 在石斛属内较高的可转移性极大地减轻了引物开发的工作量，同时为研究种间进化关系提供了一条有效的途径。除了可转移性外，本研究开发的 SSR 在石斛种间和种内均具有高度的多态性，且聚类分析结果与表型分类相似，说明 SSR 对石斛具有良好的鉴别能力，可作为品种资源鉴定的一个辅助工具。

参考文献:

- [1] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛彩色图谱 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 1-40.
 - [2] 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1998.
 - [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 版,一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 87, 266.
 - [4] 淳泽. 药用石斛的资源危机与保护对策 [J]. 资源开发与市场, 2005, 21(2): 139-140.
 - [5] 蒋波, 詹源庆, 黄捷. 金钗石斛濒危原因及其野生资源保护 [J]. 中国野生植物资源, 2005, 5: 37-39.
 - [6] 何涛, 淳泽, 罗傲雪, 范益军, 刘静, 胡明珠. 四

- 川石斛野生资源及其保护研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2008, 5: 710–715.
- [7] 李耀亭, 陈乃富, 邓辉, 刘明珍, 何祥林. 霍山石斛产业化发展的问题与对策 [J]. 生物学杂志, 2009, 02: 67–69.
- [8] Yue G H, Lan-Chan L T, Hong Y. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties [J]. *Mol Ecol Resour*, 2006, 6: 832–834.
- [9] Gu S, Ding X Y, Wang Y, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Dendrobium officinale*, an endangered herb endemic to China [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7: 1166–1168.
- [10] Fan W J, Luo Y M, Li X X, et al. Development of microsatellite markers in *Dendrobium fimbriatum* Hook, an endangered Chinese endemic herb [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, 9: 373–375.
- [11] 谢明璐, 侯北伟, 韩丽, 马艳红, 丁小余. 珍稀铁皮石斛 SSR 标记的开发及种质纯度鉴定 [J]. 药学学报, 2010, 05: 667–672.
- [12] Yuan Y H, Hou B W, Xu H J, et al. Identification of the geographic origin of *Dendrobium thyrsiflorum* on Chinese herbal medicine market using tri-nucleotide microsatellite markers [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34: 1794–1800.
- [13] 郑基阳, 陈乃富, 王晖, 高鹏, 邵剑文, 朱国萍. 霍山石斛微卫星标记的筛选及遗传多样性分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 21: 2926–2931.
- [14] Hou B, Tian M, Luo J, et al. Genetic diversity assessment and ex situ conservation strategy of the endangered *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using new tri-nucleotide microsatellite markers [J]. *Plant Syst Evol*, 2012, 298: 1483–1491.
- [15] Xiao D, Zhang Z, Guan Y. Microsatellite markers primer designing and screening from *Dendrobium officinale* [J]. *Biotech Bull*, 2012, 7: 88–92.
- [16] Man Y, Wang Y, Zhang L, et al. Development of microsatellite markers in *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) based on the NCBI data platform [J]. *Am J Bot*, 2011, 98: e310–315.
- [17] Weir B S. *Genetic Data Analysis: Method for Discrete Population Genetic Data* [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Incorporated, 1990: 445.
- [18] Sonah H, Deshmukh R K, Sharma A, et al. Genome-wide distribution and organization of microsatellites in plants: an insight into marker development in *Brachypodium* [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e21298.
- [19] 张君毅, 陈瑞凤. 蝴蝶兰 EST-SSRs 分析 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(6): 559–563.
- [20] 王立安, 徐晋麟. 石斛属的染色体数 I. 10 种 [J]. 武汉植物学研究, 1989, 7(2): 112–114, 209–210.
- [21] Chandra A, Tiwari K K, Nagaich D, et al. Development and characterization of microsatellite markers from tropical forage *Stylosanthes* species and analysis of genetic variability and cross-species transferability [J]. *Genome*, 2011, 54: 1016–1028.
- [22] Wang H, Walla J A, Zhong S, et al. Development and cross-species/species transferability of microsatellite markers discovered using 454 genome sequencing in chokecherry (*Prunus virginiana* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, DOI: 10.1007/s00299-012-1315-z.
- [23] Lesser M R, Parchman T L, Buerkle C A. Cross-species transferability of SSR loci developed from transcriptome sequencing in lodgepole pine [J]. *Mol Ecol Resour*, 2012, 12: 448–455.
- [24] Liang X, Chen X, Hong Y, et al. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species [J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 24: 35.

(责任编辑: 王豫鄂)