

覃信梅, 卢永彬, 江祈贵, 等. 刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶基因的鉴定及序列分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(8): 56–60.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.012

刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶基因的鉴定及序列分析

覃信梅^{1,2}, 卢永彬³, 江祈贵³, 黄章平³, 黄夕洋²

(1. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004; 2. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室/广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006; 3. 广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室/广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006)

摘要:肌醇半乳糖苷合成酶基因与植物光合产物运输、种子耐脱水性、抵御生物与非生物胁迫和自我保护等生理生化过程密切相关。基于刺齿报春苣苔(*Primulina spinulosa*)转录组测序数据, 获得(鉴定)1个肌醇半乳糖苷合成酶基因。序列分析结果表明, 该基因全长1 347 bp (GenBank 登录号为 MG521418), 开放阅读框(ORF)为1 008 bp, 共编码335个氨基酸。进一步基于氨基酸序列的分析表明, 该基因编码的蛋白质分子量为38.05 ku, 理论等电点为5.09, 为亲水性蛋白, 含有1个与糖基转移酶家族蛋白相同的保守结构域; 刺齿报春苣苔的肌醇半乳糖苷合成酶基因与同科的旋蒴苣苔(*Boea hygrometrica*, FJ222452)的相似性高达90%, 两者在系统进化树上聚为1支。研究结果为进一步研究刺齿报春苣苔的肌醇半乳糖苷合成酶基因的分子结构和功能奠定了基础。

关键词:刺齿报春苣苔; 肌醇半乳糖苷合成酶基因; 基因序列分析; 信号肽

中图分类号: S184 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)08-0056-04

肌醇半乳糖苷合成酶(galactinol synthase, 简称 GolS)是糖基转移酶家族的一个亚家族, 能催化半乳糖和肌醇反应合成肌醇半乳糖苷, 为棉子糖系列寡糖的合成提供半乳糖基。棉子糖系列寡糖(raffinose family oligosaccharides, 简称 RFOs)主要包括棉子糖、水苏糖、毛蕊草糖等, 是高等植物中重要的可溶性小分子渗透调节物质^[1]。当植物受到环境胁迫时, 可以快速合成并积累不同种类的渗透调节物质来维持植物细胞内正常的生理机能, 调节植物以适应环境胁迫, 使植物免受胁迫伤害。一些体内不含棉子糖系列寡糖或其含量极低的植物, 在受到干旱、高盐和低温等逆境胁迫后, 棉子糖系列寡糖会迅速积累, 植株的抗逆性也随之增强。

肌醇半乳糖苷合成酶是植物体内棉子糖系列寡糖合成起始的关键酶, 调控着植物体内棉子糖系列寡糖的积累^[2]。目前已有研究表明, GolS 基因在一些植物受到逆境胁迫后表达量上升, 从而参与响应逆境胁迫, 如水稻(*Oryza sativa*)2个GolS 基因在干旱、盐处理下的表达量大幅度上调, 其中1个还可以积极响应冷胁迫^[3]。目前研究者已经从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分离出7个GolS 基因, 其中 AtGolS1、AtGolS2 由干旱、盐胁迫诱导, AtGolS2 基因在拟南芥中的超表达提高了肌醇半乳糖苷、棉子糖的含量, 并增强了植物的抗旱

能力, 而 AtGolS3 受到低温胁迫诱导^[4-5]。咖啡(*Coffea arabica*)中有3个GolS 类基因, CaGolS2 的表达量在干旱、盐胁迫下上调, CaGolS3 的表达量在干旱胁迫下上调, 而 CaGolS1 能够参与调控植物响应干旱、低温及盐胁迫^[6]。在杨树(*Populus*)的9个GolS 基因中, PtrGolS2、PtrGolS8 受到低温胁迫的诱导, PtrGolS3、PtrGolS4 和 PtrGolS6 受到盐胁迫的诱导, 而所有 PtrGolS 基因都参与到杨树植株对于干旱胁迫的应答中^[7-8]。木薯(*Manihot esculenta*)中有7个GolS 类基因, 其中 MeGolS1、MeGolS5 受到干旱诱导, 表达量明显上调, 能更迅速地积极响应干旱胁迫^[9]。在甘蓝型油菜^[10-11]、小盐芥^[12]和日本黄连^[13]等植物中也存在类似的生理现象。可见 GolS 基因在植物抵抗干旱、寒冷等逆境胁迫中起到重要作用。

刺齿报春苣苔(*Primulina spinulosa*)是苦苣苔科(Gesneriaceae)报春苣苔属多年生草本植物, 其叶肉质多汁, 为我国广西西南部所特有。目前, 关于刺齿报春苣苔的报道甚少, 主要研究集中在其离体快速繁殖方面^[14], 而对其功能基因的研究未见报道。报春苣苔属植物一般生长于阴湿的石灰岩岩壁上或洞穴中, 而刺齿报春苣苔则生长在阳光直射、光秃裸露的石灰岩缝隙中, 属于极端的耐旱种类。为了探讨刺齿报春苣苔的耐旱机制, 笔者对刺齿报春苣苔进行了转录组测序, 通过同源序列搜索(BLAST)筛选获得了刺齿报春苣苔的GolS 基因序列, 并对该基因序列及其编码的蛋白质进行了分析, 旨在为刺齿报春苣苔耐旱分子机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

刺齿报春苣苔试验材料采自广西扶绥县渠黎镇。采集同一居群的3~5个个体的顶端嫩叶(长度<1 cm), 采后迅速将其放入液氮中速冻保存。

收稿日期: 2017-11-17

基金项目: 广西自然科学基金(编号: 2015GXNSFAA139090); 广西喀斯特恢复与保护重点实验室基金(编号: 16-380-32); 广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室基金(编号: 18-A-01-03)。

作者简介: 覃信梅(1992—), 女, 广西博白人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: 15277335905@163.com。

通信作者: 黄夕洋, 硕士, 副研究员, 研究方向为植物学和分子生物学。E-mail: xiyang0687@163.com。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取、建库和测序 用改良的 TRIzol 法对总 RNA 进行提取^[15], 由北京诺禾致源生物信息科技有限公司对检测合格的 RNA 进行建库和测序。用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集 mRNA, 随后加入 fragmentation buffer(片断化缓冲液)将 mRNA 打断成短片段, 以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物(random hexamers)合成一链 cDNA, 然后加入缓冲液、dNTPs 和 DNA polymerase I (DNA 聚合酶 I)、RNase H(核糖核酸酶 H)合成二链 cDNA, 再用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA。将纯化的双链 cDNA 先进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 再用 AMPure XP beads 进行片段大小的选择, 最后进行 PCR 扩增, 并用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 得到最终的文库。文库构建完成后, 先用 Qubit 2.0 进行初步定量, 稀释文库至 1.5 ng/μL, 随后使用 Agilent 2100 对文库的 insert size(插入片段大小)进行检测, insert size 符合预期后, 使用 Q-PCR(定量 PCR)方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库的有效浓度应 > 2 nmol/L), 以保证文库质量。最后用 Illumina HiSeq™ 2500 对制备好的文库进行测序。

1.2.2 序列分析和系统树构建 在 GenBank 公共数据库中

下载苦苣苔科旋蒴苣苔(*Boea hygrometrica*)的 *GolS* 基因(登录号:FJ222452), 使用 Bioedit 中的 local BLAST 功能, 以测序获得的刺齿报春苣苔转录组为搜索库, 找出刺齿报春苣苔的 *GolS* 类基因。用 DNAMAN、Finder、TMPRED、SWISS-MODEL、NetPhos 2.0、SignalP 4.1 等软件进行序列的开放阅读框(ORF)、编码氨基酸、编码蛋白的理化性质分析。将筛选到的刺齿报春苣苔 *GolS* 基因序列在 GenBank 中进行 BLAST 搜索, 找到与之高度相似的同源序列, 并下载 11 种植物的同源序列, 基于该基因翻译的氨基酸序列, 用 DNAMAN 软件进行系统发育树的构建, 构建方法参考文献[16]。

2 结果与分析

2.1 基因的生物信息学分析

在本研究测序获得的 *P. spinulosa* 转录组数据库中(测序深度约为 6G), 笔者只筛选到 1 个 *GolS* 基因, 该基因序列全长 1 347 bp(GenBank 登录号为 MG521418), 使用美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站上的 NCBI ORF Finder 和生物信息学软件 DNAMAN 对该基因序列进行分析, 结果表明, 该序列包含 1 个 1 008 bp 的开放阅读框, 编码 335 个氨基酸(图 1)。

1	CCGGGACACACAACTACAGTCTAAAGCAGCGAAATTGTTCACTCAATTTGGTTTTCG
61	AGAAACATTAATCGGAGATTGATAATCATGGCTCCGGAGATTCTAACGCCGCCGTGAG
1	M A P E I S N A A V R
121	ACAGGCCTCCTCCGGTTGTCGAAAGCCGGCAGCATGCAGAGTCGGGCTTATGTCACATT
12	Q A S S G L S K A G S M Q S R A Y V T F
181	CTTGCTGGCGATGGTGATTATGTGAAAGGTGTCGTGGGGCTGGCTAAAGGGTTGAGGAA
32	L A G D G D Y V K G V V G L A K G L R K
241	GGTGGATTCTGCTTACCCTCTAGTGGTAGCGGTTCTGCCTGATGTGCCCGCTGAGCACCG
52	V D S A Y P L V V A V L P D V P A E H R
301	ACGTATTCTGCTGGAGCAAGGGTGCATAGTCAGGGAGATCGAACCTGTTTATCCGCGGA
72	R I L L E Q G C I V R E I E P V Y P P E
361	GAACAGACCCAGTTCGCTATGGCTTATTACGTGATCAACTACTCCAAGCTTCGGATTG
92	N Q T Q F A M A Y Y V I N Y S K L R I W
421	GGAGTTTGTGGAGTACAGCAAGATGATATACCTGGATGGTGATCCAGGTTTATGATAA
112	E F V E Y S K M I Y L D G D I Q V Y D N
481	CATAGACCCTTGTGACATGGAGAGCGGCTACTTTTACGCAGTAATGGACTGTTTCTG
132	I D H L F D M E S G Y F Y A V M D C F C
541	TGAGAAGACATGGAGTCAACCCGACAAATTTAAGATTGGGTACTGCCAGCAGTGCCTGA
152	E K T W S H T A Q F K I G Y C Q C Q C P D
601	CAAAGTACAGTGGCCTAAACAGTTGGGCCCAAGCCCTCTCTCTACTTCAACGCCGCAT
172	K V Q W P K Q L G P K P S L Y F N A G M
661	GTTTGTCTACGAGCCAGTCTTTCCTACTATCATGATCTCTTGAGACATCTCAAGATTAC
192	F V Y E P S L S T Y H D L D I L K I T
721	ACCTCCAACACCATTTCGAGAGCAGGATTTCTTGAATATGTTCTTTAAGGACGTTTACCG
212	P P T P F A E Q D F L N M F F K D V Y R
781	GCCAATCCCAACGTGTACAATTTAGTGTGGCCATGCTATGGCGCCACCCAGAAAACGT
232	P I P N V Y N L V L A M L W R H P E N V
841	GAATCTGGAGGAGGTGAAAGTGGTCCACTACTGTGCCGAGGATCCAAGCCATGGAGGTA
252	N L E E V K V V H Y C A A G S K P W R Y
901	CACCGGCAAGAAGCTAACATGCAGAGAGAAGACATCAAAATGCTTGTAAGAAATGGGC
272	T G E E A N M Q R E D I K M L K K W A
961	AGATATTTATGAAGATGAGACACTGAATTACAATTTCAACTCTGAGGCGGCGCCGCGGC
292	D I Y E D E T L N Y N F N S E A A P A A
1021	ATCAAAACCCAGTGGCGGCGGTGCTGACGGAGGCGGTGGTGTTCCTTCACTGCCAC
312	S E T Q L A A V L T E A G G V H F I A T
1081	CCCTCCAACAGCTTGATCAGCTCAGCTTTAGTAGTTTGTACCATGATTCTGATGCATAA
332	P P T A *
1141	GAGATGGACAATTTCTAATTTGTAATTTTATATACTCAAGCCCTAGATGATTATAGAATG
1201	ATGCCTAGGCTTTTTTGTAAATGTTTAAAGAATATGTCTCAATATATATTATATATCA
1261	ATCAACATATTTTGTTTCTTGTATACCATGTATCTCTGGTTAGTCGAATATATATTT
1321	TTTTAATGATTTCTAGCTTCTTGGAC

开放阅读框从甲硫氨酸(M)开始至终止密码(*)结束; A—丙氨酸; P—脯氨酸; E—谷氨酸; I—异亮氨酸; S—丝氨酸; N—天门冬酰胺; V—缬氨酸; R—精氨酸; Q—谷氨酰胺; G—甘氨酸; L—亮氨酸; K—赖氨酸; Y—酪氨酸; W—色氨酸; T—苏氨酸; F—苯丙氨酸; D—天门冬氨酸; H—组氨酸; C—半胱氨酸; W—色氨酸

图1 测序获得的刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶基因序列和推测的氨基酸序列

2.2 编码蛋白质的分析和疏水性预测

通过 DNAMAN 软件分析得出,本研究中 *GolS* 基因编码的蛋白质分子量为 38.05 ku, 等电点(pI)为 5.09。从图 2 蛋白

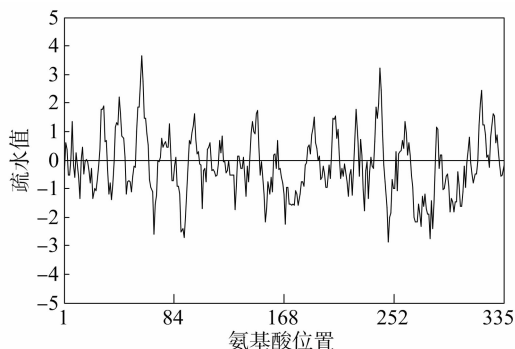


图2 刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶的疏水性分析结果

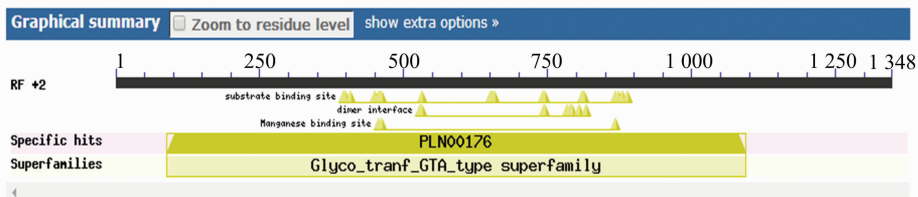


图3 刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶保守结构域

2.4 跨膜预测

用跨膜蛋白数据库 TMbase (http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测 *GolS* 蛋白的跨膜区域。从图 4 可以看出,该蛋白不存在跨膜结构蛋白,为膜内蛋白。

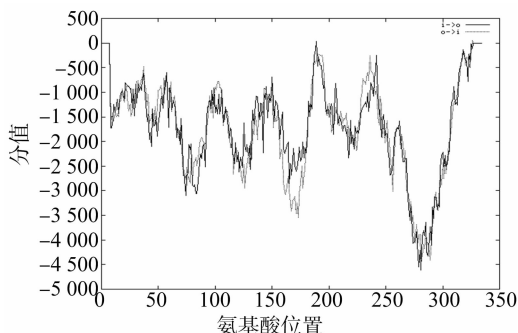


图4 刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶基因编码蛋白的跨膜区预测结果

2.5 蛋白质的磷酸化预测

通过在线蛋白磷酸化位点分析软件 NetPhos 2.0 Server 对 *GolS* 基因编码的蛋白进行预测,结果表明,该多肽链中预测分值在 0.5 以上的可能的磷酸化位点共有 13 个。其中,丝氨酸(Ser)可能的磷酸化位点共有 3 个,分别位于肽链的 18、22、203 位;苏氨酸(Thr)可能的磷酸化位点共有 3 个,分别位于肽链的 218、276、335 位;酪氨酸(Tyr)可能的磷酸化位点共有 7 个,分别位于肽链的 42、105、125、190、205、234、298 位。

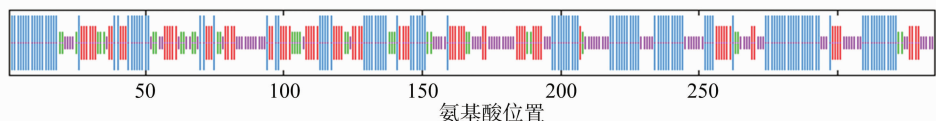


图6 刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶基因的二级结构预测结果

质序列的疏水性分析结果可以看出,*GolS* 基因编码的肽链中疏水值最大约为 3.66,最小值约为 -2.86,平均值是 -0.18,属于亲水性蛋白。

用在线分析软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行分析可知,该蛋白质带负电荷的氨基酸[天冬氨酸(Asp) + 谷氨酸(Glu)]总数为 41 个,带正电荷的氨基酸[精氨酸(Arg) + 赖氨酸(Lys)]总数为 29 个,分子式为 $C_{1733}H_{2618}N_{434}O_{498}S_{17}$,不稳定系数为 36.65,属于稳定性蛋白质。

2.3 功能结构域的分析

将编码的氨基酸序列用 NCBI 的 Conserved Domain Architecture Retrieval Tool 进行分析,发现该蛋白质具有 1 个与糖基转移酶家族(glycosyltransferases superfamily)蛋白相同的保守活性位点(conserved active sites,简称 CAS)结构域(图 3)。

2.6 糖基化位点和信号肽的分析

采用 NetNGlyc 1.0 对 *GolS* 基因编码的氨基酸序列进行分析,发现有 2 个潜在的 *N*-糖基化位点,但是糖基化一般发生在信号受体蛋白分子上,而用 SignalP 4.1 软件预测结果显示其没有信号肽(图 5),说明在体内这些预测的潜在的 *N*-糖基化位点可能不能真正地被糖基化。

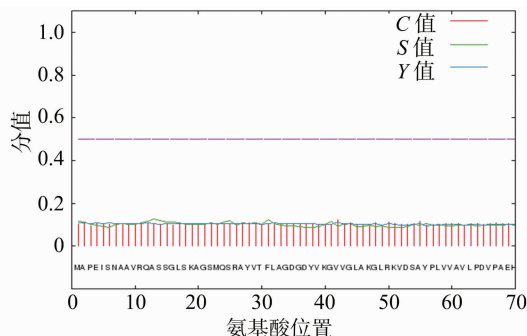


图5 刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶蛋白信号肽的分析结果

2.7 蛋白质的二级结构及三级结构预测

用 SOPMA 软件对 *GolS* 蛋白的二级结构进行预测,如图 6 所示, α -螺旋约占 37.91%,延伸直链约占 23.58%, β -转角约占 10.15%,无规则卷曲约占 28.36%,其中 α -螺旋为主要结构。

利用 SWISS - Model 对刺齿报春苣苔 *GolS* 蛋白的三级结构进行预测,结果表明,*GolS* 蛋白的三级结构含有 8 个 α - 螺旋,6 个 β - 折叠,其间由无规则卷曲连接(图 7)。

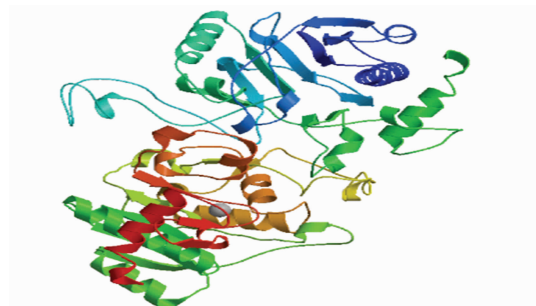


图7 SWISS-Model 模拟的刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶蛋白的三级结构

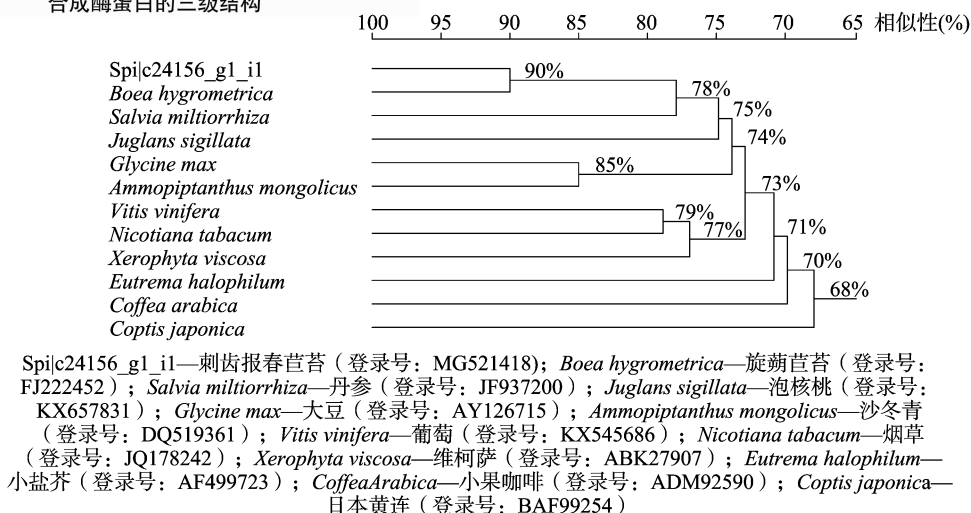


图8 基于氨基酸序列的刺齿报春苣苔肌醇半乳糖苷合成酶系统发育树

PtrGolS5 - 7^[8] 均被证明是受 ABA 诱导的。本研究通过转录组测序获得的刺齿报春苣苔 *GolS* 基因和已知的与抗旱相关的旋蒴苣苔 *GolS* 基因的相似性很高,推测其可能在刺齿报春苣苔耐旱过程中起重要作用,但是其作用机制是否与旋蒴苣苔相似,也受到转录因子 WRKY 的调控,因此可见参与 ABA 依赖的信号转导途径需要深入研究。另外,有研究发现,拟南芥中的 *GolS* 基因受到了 2 类转录因子的调控,热激因子(HSFs)可以激活 *AtGolS1* 的表达^[18], *DREB1A/CBF3* 可以激活 *AtGolS3* 的表达和增强抗旱耐冻性^[4]。至于刺齿报春苣苔的 *GolS* 基因否也受到不同转录因子的调控,其具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李 芳,汪晓峰. 植物中棉子糖系列寡糖代谢及其调控关键酶研究进展[J]. 西北植物学报,2008,28(4):852-859.
- [2] Keller F, Pharr D M. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl - sucrose oligosaccharides [M]//Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source - Sink Relationships. New York: Marcel Dekker, 1996: 157-183.
- [3] Sengupta S, Mukherjee S, Parween S, et al. Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: functional preference for higher plants? [J]. FEBS Letters, 2012, 586(10): 1488-1496.
- [4] Tajiri T, Ohsumi C, Iuchi S, et al. Important roles of drought - and

2.8 系统发育分析

刺齿报春苣苔 *GolS* 基因编码的氨基酸与旋蒴苣苔(*Boea hygrometrica*, 登录号: FJ222452) *GolS* 基因编码的氨基酸序列的相似性为 90%, 在系统树上聚为 1 支(图 8)。

3 讨论

已有报道显示,旋蒴苣苔中的 *GolS* 基因响应干旱胁迫,旋蒴苣苔肌醇半乳糖苷合成酶基因 *BhGolS1* 的启动子上含有 4 个与 WRKY 转录因子特异结合的顺式作用元件 W - box, 已证实该元件是旋蒴苣苔响应干旱胁迫的关键因子^[17]。在对旋蒴苣苔的研究中发现,WRKY 转录因子是通过 ABA(脱落酸)信号转导途径来调控 *BhGolS1* 的表达以响应干旱胁迫的,而且拟南芥中的 *AtGolS1*、*AtGolS2*^[4] 和毛果杨中的 *PtrGolS2*、

cold - inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2002, 29(4): 417-426.

- [5] Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage [J]. Plant physiology, 2008, 147(3): 1251-1263.
- [6] Dos Santos T B, Budzinski I G F, Marur C J, et al. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(4): 441-448.
- [7] Unda F, Canam T, Preston L, et al. Isolation and characterization of galactinol synthases from hybrid poplar [J]. Journal of experimental botany, 2011, 63(5): 2059-2069.
- [8] Zhou J, Yang Y, Yu J, et al. Responses of *Populus trichocarpa* galactinol synthase genes to abiotic stresses [J]. Journal of plant research, 2014, 127(2): 347-358.
- [9] 范 洁. 木薯肌醇半乳糖苷合成酶基因 *MeGolS5* 的抗旱功能研究[D]. 海南:海南大学, 2015: 46-49.
- [10] 卓加金. 油菜 *GolS* 基因的克隆、表达分析及种子脱水耐性的研究[D]. 北京:北京林业大学, 2009: 17-34.
- [11] Li X, Zhuo J J, Jing Y, et al. Expression of a *GALACTINOL SYNTHASE* gene is positively associated with desiccation tolerance of *Brassica napus* seeds during development [J]. Journal of plant physiology, 2011, 168(15): 1761-1770.

熊健,屈燕,冷秋思,等. 绿绒蒿 SSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(8):60-63.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.013

绿绒蒿 SSR-PCR 反应体系的建立与优化

熊健,屈燕,冷秋思,赵琬玥

(西南林业大学园林植物与观赏园艺省高校重点实验室/西南林业大学园林学院,云南昆明 650224)

摘要:为建立适合绿绒蒿属(*Meconopsis* Vig.)的 SSR 反应体系,以多刺绿绒蒿(*M. horridula*)为试材,应用 $L_{25}(5^6)$ 进行正交试验,对影响 SSR-PCR 的主要因素进行优化。结果发现, Mg^{2+} 对 PCR 反应效果影响最大,而 dNTPs 的影响最小。5 个因素水平的变化对绿绒蒿属 SSR-PCR 反应体系的影响从大到小依次为 $Mg^{2+} > Taq$ 酶含量 $>$ 引物浓度 $>$ DNA 模板量 $>$ dNTPs 浓度。适宜绿绒蒿属的 SSR 反应体系:总体积 25 μ L, Mg^{2+} 浓度 2 mmol/L, dNTPs 浓度 0.2 mmol/L,引物浓度 0.5 μ mol/L, DNA 模板量 60 ng, *Taq* 聚合酶量 1.6 U,其余用 ddH₂O 补充。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 1.5 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 最适退火温度 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。利用优化后的反应体系对同属另外 8 种绿绒蒿(*M. wallichii*, *M. racemosa*, *M. lingholm*, *M. prattii*, *M. rudis*, *M. napaulensis* Pinky, *M. paniculata*, *M. superba*) 进行 PCR 扩增,均获得优良的扩增产物。因此,该试验建立的反应体系适用于绿绒蒿属植物的 SSR-PCR 反应。

关键词:绿绒蒿; SSR; PCR 体系优化

中图分类号: Q949.95 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)08-0060-04

绿绒蒿是罂粟科(Papaveraceae)绿绒蒿属(*Meconopsis*)植物的总称,有“高山牡丹”之称。绿绒蒿是一年或多年生草本,花大而美丽,颜色丰富,有蓝色、紫色、红色、黄色、稀白色。全世界共有 49 种,1 种产自西欧,其余 48 种均分布于东亚的喜马拉雅地区,但最原始种恰在华中^[1]。我国有 38 种,集中分布于西南部。绿绒蒿不仅花色艳丽,具有很高的观赏价值,是著名的观赏植物,同时还是传统藏医药用植物,有清热解毒、利尿、消炎、止痛等功效^[2]。作为潜力巨大的药用观赏植物,目前绿绒蒿属大多数物种已处于濒危状态。

简单重复序列(simple sequence repeats,简称 SSR)又称

微卫星 DNA,是以 1~6 个碱基为基本单元的串联重复序列。SSR 分子标记具有多态性丰富、高信息量、共显性、检测方便等优点。SSR 分子标记是目前最为常用的微卫星标记之一^[3]。目前,在国内尚未有关于绿绒蒿属植物 SSR-PCR 反应体系的研究成果。本研究以多刺绿绒蒿为试材,通过正交设计试验对 SSR-PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、DNA 模板量、*Taq* 聚合酶量等 5 个主要因素进行探索优化,筛选出各因素的最适量,建立和优化绿绒蒿 SSR-PCR 的反应体系,为绿绒蒿属的遗传多样性研究提供技术支持和参考^[4]。

1 材料与方法

所有试验均于 2017 年 12 月 20 日至 25 日在西南林业大学园林学院实验室完成。

1.1 材料

试验以多刺绿绒蒿(*M. horridula*)为试材及 SSR 引物 P23 进行反应体系的正交设计试验,建立和优化反应体系,并选取 *M. wallichii*, *M. racemosa*, *M. lingholm*, *M. prattii*, *M. rudis*, *M. napaulensis* Pinky, *M. paniculata*, *M. superba* 等 8 种

收稿日期:2018-02-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460218);云南省高校重点建设学科(风景园林学)建设项目;云南省农业基础研究联合专项[编号:2017FG001(-68)];国家级质量工程园林专业综合改革试点项目(编号:50126002)。

作者简介:熊健(1993—),男,重庆人,硕士研究生,主要从事风景园林植物应用方向的研究。E-mail:xiangjian205@163.com。

通信作者:屈燕,博士,副教授,主要从事园林植物及中草药植物资源保护与开发利用研究。E-mail:flyersw@163.com。

- [12] Wang Z I, Li P H, Fredricksen M, et al. Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance[J]. Plant Science, 2004, 166(3): 609-616.
- [13] Takanashi K, Shitan N, Sugiyama A, et al. Galactinol synthase gene of *Coptis japonica* is involved in berberin tolerance[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(2): 398-405.
- [14] 汤正辉, 陈维伦, 石雷, 等. 刺齿报春苔苔苔的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 211.
- [15] Bariola P A, Howard C J, Taylor C B, et al. The *Arabidopsis thaliana* ribonuclease gene *RNAI* is tightly controlled in response to phosphate limitation[J]. The Plant Journal, 1994, 6(5): 673-685.

- [16] 杜玉杰. 构建分子系统树的简易方法[J]. 生物学通报, 2013, 48(4): 4-6.
- [17] Wang Z, Zhu Y, Wang L L, et al. A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* binding to the W-box elements of the galactinol synthase (BhGolSI) promoter[J]. Planta, 2009, 230(6): 1155-1166.
- [18] Panikulangara T J, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, et al. Galactinol synthase 1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2004, 136(2): 3148-3158.