

新疆野生樱桃李 SSR 体系的建立及应用

李 芳, 周 龙, 胡建芳

(中国农业大学 农学与生物技术学院 北京 100193)

摘 要: 为建立适宜新疆野生樱桃李的 SSR 分子标记技术体系, 通过对 PCR 反应程序、反应体系 (DNA 模板量、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、*Taq* 酶用量) 以及退火温度进行了探索, 建立了适宜野生樱桃李的 SSR-PCR 反应体系。结果表明: 在 25 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 1.0 mmol/L、引物 0.5 μ mol/L、dNTPs 0.20 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U、模板 DNA 30 ng、退火温度为 60 $^{\circ}$ C。SSR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 可筛选出稳定性好、多态性高的 SSR 引物。

关键词: 野生樱桃李; SSR-PCR; 反应体系

中图分类号: S 662.3(245) 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)13-0120-04

SSR 标记 (Simple Sequence Repeat) 是由几个 (多为 1~6 个) 碱基组成的基序串联重复而成的 DNA 序列。由于其具有数量丰富、多态性高、重复性好、发生频率高、共显性遗传等特点, 目前广泛应用于植物分类、亲缘关系分析、品种鉴别、遗传图谱构建以及品种保护等方面。在果树种质资源研究方面应用也很广泛, 如葡萄、猕猴桃、柑橘等^[1], 特别是葡萄种质资源的研究报道最多^[2], 在李属植物的遗传图谱构建^[3,4], 抗病育种^[5-6], 亲缘关系分析^[7,9], 辅助育种^[10] 等方面也有较多的报道。

野生樱桃李 (*Prunus sogdiana* Vass.) 起源于中国, 是一种珍贵的野生果树资源, 在我国仅在伊犁霍城县的大、小西沟有分布。此区位于伊犁河谷, 空气湿润, 雨量充足, 热量充沛是典型的逆温带地区。野生樱桃李也是中国稀有濒危树种之一, 为国家重点二级保护植物, 具有重要的研究和开发价值。但目前有关野生樱桃李分子标记等方面的文章还未见报道。现针对新疆伊犁霍城县大西沟山区的野生樱桃李通过建立和优化 SSR 反应体系, 以期对后续工作如分子标记、遗传图谱构建、基因定位、种质资源遗传进化分析等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生樱桃李种子于 2004 年 9 月采自新疆伊犁霍城

县大西沟山区, 2005 年播种育苗, 2006 年移植于中国农业大学试验田内。SSR 反应体系的构建和优化均以野生樱桃李为试材, 取健康 1 a 生枝上的新鲜叶片, 液氮处理后保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 取 0.5 g 叶片在液氮中研磨成粉末, 采用 CTAB 法提取 DNA。利用紫外分光光度计及 1 g/100mL 的琼脂糖凝胶电泳法检测所提取的 DNA 浓度和质量。样品稀释到所需要的浓度后, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 PCR 反应程序 SSR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 不同退火温度 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。退火温度梯度为 45、50、55、60、65、70 $^{\circ}$ C。

1.2.3 PCR 基本反应体系 以野生樱桃李 DNA 为模板, 引物序列如表 1 所示, 由英骏公司合成。该研究以 PS07A02 为例进行分析。设置 4 个模板 DNA 量, 分别为 15、30、60、90 ng 进行 PCR 扩增, 选择最优模板量。然后选择 4 个反应体积, 分别为 15、25、35、45 μ L, 选择最优反应体积。在最优模板量 (30 ng) 和最优反应体积 (25 μ L) 基础上, 确立基本反应体系: Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 引物 0.8 μ mol/L, Tris-HCl (pH 8.4) 200 mmol/L; KCl 200 mmol/L; $(NH_4)_2SO_4$ 100 mmol/L。dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、10 \times Buffer 均购北京索莱宝科技有限公司。

1.2.4 PCR 反应体系优化 在基本反应体系中进行单因素梯度优化试验, 包括 Mg^{2+} 浓度梯度 (0.1、1.0、1.5、2.5 mmol/L)、dNTPs 浓度梯度 (0.01、0.1、0.2、0.5 mmol/L)、*Taq* DNA 聚合酶浓度梯度 (0.1、1.0、1.5、2.0 U)、引物浓度梯度 (0.1、0.5、0.8、1.0 μ mol/L)。

第一作者简介: 李芳 (1981-), 女, 在读博士, 现主要从事果树生理与分子生物学研究工作。E-mail: lf824@163.com。

通讯作者: 胡建芳 (1963-), 女, 博士, 副教授, 现从事果树生理与分子生物学研究工作。E-mail: hujf@cau.edu.cn。

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技计划资助项目 (200931101-2); 国家科技支撑计划资助项目 (2007BAD3602)。

收稿日期: 2010-04-12

表 1 引物名称, 编号, 序列, 来源群体, 来源属, 溶解温度以及参考文献

引物名称与编号	引物序列	来源	种	温度/℃	参考文献
1BPPC T004	CTGACTGATCCATTTGCAGG	Enriched genomic libraries from 'O' Henry'	<i>P. persica</i>	68	[11] Dirlewanger et al. (2002)
	AGGGCATCTAGACCTCATTGTT			69	
2BPPC T012	ACTTCCATTGTCAGGCATCA	Enriched genomic libraries from 'O' Henry'	<i>P. persica</i>	66	Dirlewanger et al. (2002)
	GGAGCAACGATGGAGTGC			69	
3BPPC T014	TTGTCTGCCTCTCATCTTAACC	Enriched genomic libraries from 'O' Henry'	<i>P. persica</i>	69	Dirlewanger et al. (2002)
	CATCGCAGAGAACTGAGAGC			70	
4BPPC T028	TCAAGTTAGCTGAGGATCGC	Enriched genomic libraries from 'O' Henry'	<i>P. persica</i>	68	Dirlewanger et al. (2002)
	GAGCTTGCCATGAGAAGACC			71	
5BPPC T039	ATTACGTACCCTAAAGCTTCTGC	Enriched genomic libraries from 'O' Henry'	<i>P. persica</i>	70	Dirlewanger et al. (2002)
	GATGTCATGAAGATTGGAGAGG			69	
6PS01H 03	TGAGGAGCATAATGACAGT	Enriched genomic library from 'Napoleon'	<i>P. avium</i>	63	[12] Joobeur et al. (2000), [13] Cantini et al. (2001)
	TCACCATGTCATACT			59	
7PS07A02	CAGGGAATAGATAAGATG	Enriched genomic library from 'Napoleon'	<i>P. avium</i>	61	Joobeur et al. (2000), Cantini et al. (2001)
	TCTAATGGTGTGTTTCATT			61	
8PS08E08	CCC AATGAACAACTGCAT	Enriched genomic library from 'Napoleon'	<i>P. avium</i>	63	Joobeur et al. (2000), Cantini et al. (2001)
	CATATCAATCACTGGGATC			62	
9pchgms2	GTCAATGAGTTCAGTGTCTACACTC	Genomic library from 'Bicentennial'	<i>P. persica</i>	73	[14] Sosinski et al. (2000)
	AATCATAACATCATTCAGCCACTGC			71	
10pchms2	AGGGTCGTCTCTTTGAC	cDNA library from 'Suncrest'	<i>P. persica</i>	64	Sosinski et al. (2000)
	CTTCGTTTCAAGGCCCTG			64	

1.2.5 制板 将配制好的 6%变性聚丙烯酰胺胶溶液均匀灌入 2 块板(每块板先用蒸馏水擦拭 2 遍,再用酒精擦拭 2 遍。用擦镜纸在长板上均匀涂抹亲合硅胶、短板上均匀涂抹剥离硅胶)的空隙中,插入梳子,深浅适度,使梳子平面在一条水平线上,静置 30 min 使胶凝固。

1.2.6 电泳 在电泳仪上固定玻璃板,向电泳槽的上、下槽分别倒入 0.5× TBE 缓冲液(0.1 mol/L Tris, 0.083 mol/L 硼酸, 1 mmol/L EDTA),进行预电泳(U=600 V, P=70 W, I=10 A, 30 min),然后进行点样,点样量样品为 7 μL, Mark 3 μL。电泳(U=600 V, P=50 W, I=10 A, 1 h)。电泳结束后将板分开,进行染色。步骤依次为:10%冰醋酸 30 min→水洗 3 次(3 min/次)→0.1%硝酸银染色 30 min→水洗 10 s→显色液 20~30 min→水洗 5 min。电泳使用 JY-ECP3000 型电泳仪和 JY-CX2B 垂直板电泳槽。染色后进行照相并保存。

2 结果与分析

2.1 退火温度对 PCR 反应程序的影响

退火温度对 SSR-PCR 反应程序的影响如图 1 所示,退火温度在 45、50℃时,扩增产物电泳谱带有拖尾现象,背景颜色深,条带较复杂;而退火温度在 65、70℃时扩增产物获得的条带较少。退火温度在 55、60℃时扩增产物结果较好,谱带比较清晰,无明显拖尾现象,但 55℃扩增产物背景颜色略深,因此该研究认为针对引物 PS07A02 适宜的退火温度选择为 60℃。同时针对不同的引物在进行 SSR-PCR 反应程序时可根据引物所标出的退火温度进行适当调整 才能达到理想的效果。

2.2 PCR 基本反应体系

模板 DNA 量对 SSR-PCR 试验结果影响较大(图

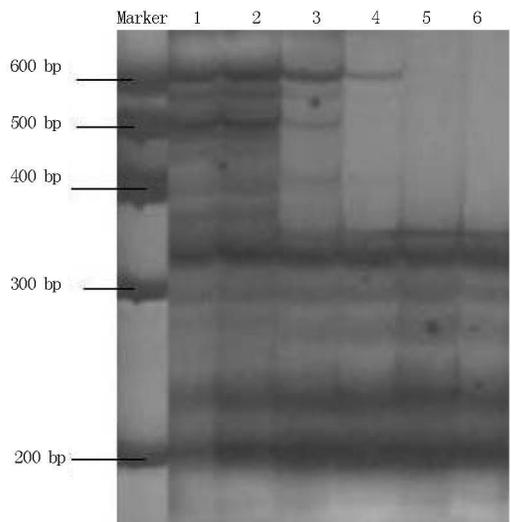


图 1 退火温度对 PCR 反应程序的影响
注:1~6 退火温度分别为 45、50、55、60、65、70℃。

2)。供试 4 个模板 DNA 量(15、30、60、90 ng)进行 PCR 扩增,浓度过低为 15 ng 时,背景较浅,条带数较少,PCR 效率较低,而模板 DNA 量为 30 ng 时背景颜色加深,条带数增加,当模板 DNA 量为 60、90 ng 时,背景颜色较深,故该研究认为模板 DNA 量以 30 ng 为宜。同时不同反应体积均得到较好的扩增结果,25 μL 得到的带型稍优,多态性更好,该研究选择常用的 25 μL 反应体系。

2.3 PCR 反应体系优化

SSR-PCR 反应体系优化的试验结果如图 3,当 Mg^{2+} 浓度为 0.1 mmol/L 时扩增产物几乎没有;说明 Mg^{2+} 浓度过低可导致 PCR 扩增失败;在 1.5、2.5 mmol/L 时扩增背景颜色较深且主弱带之间差异不明显。这可

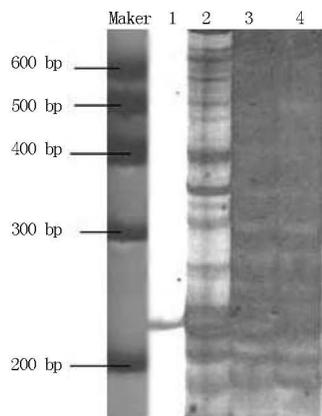


图2 模板 DNA 浓度对 PCR 基本反应体系的影响

注: 1~4 模板 DNA 浓度分别为 15、30、60、90 ng。

能与 Mg^{2+} 浓度增加而导致 *Taq* 酶活性增加有关。因此 Mg^{2+} 浓度确定 1.0 mmol/L 为宜。

dNTPs 浓度为 0.01 mmol/L 时, 没有扩增产物, 因为 dNTPs 是 PCR 反应的原料, 浓度过低会导致 PCR 产率过低。浓度为 0.10、0.20、0.50 mmol/L 时均有扩增条带, 尤以 0.20 mmol/L 时扩增主弱带最清晰并且稳定, 因此认为 dNTPs 的浓度为 0.20 mmol/L。

Taq DNA 酶浓度在 0.1 U 时几乎没有条带, 因为 *Taq* DNA 酶对 PCR 反应起催化作用, 浓度过低导致反应不能进行扩增失败, 当 *Taq* DNA 酶浓度较高在 2.0 U 时, 加剧了非特异性扩增, 导致背景颜色深且杂带多, 不便于对主带进行分析。酶浓度为 1.0 和 1.5 U 时扩增效果最好, 条带整齐, 且杂带最少。因此从节约角度考虑, 确定 *Taq* DNA 酶适宜用量为 1.0 U。

引物浓度对试验结果的影响较大。当引物浓度为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 时, 扩增没有获得条带, 引物浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时扩增效果最好, 谱带清楚。当引物浓度为 0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时背景较深, 且有弥散现象, 不易观察, 因此认为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 为引物适宜浓度。

综合上述结果, 优化后的 SSR-PCR 反应体系为: $25 \mu\text{L}$ 反应体系中, Mg^{2+} 1.0 mmol/L、引物 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、dNTPs 0.20 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U、模板 DNA 30 ng。SSR 扩增程序: 94°C 预变性 5 min, 35 个循环 (94°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 延伸 10 min。

2.4 引物筛选

利用上述建立和优化的 SSR-PCR 体系, 以野生櫻桃李 DNA 为模板用 10 对 SSR 引物进行筛选, 结果表明, 所有 10 对引物都能得到清晰的条带。其中 PS07A02 引物得到条带最清晰、重复性好、稳定性高。进一步利用这一引物对 30 个李品种进行 SSR-PCR 扩增, 其结果如图 4 所示, 可以看出 SSR 标记在不同品种间多态性较丰富, 表明确立的 SSR-PCR 反应体系稳定可靠, 可应用

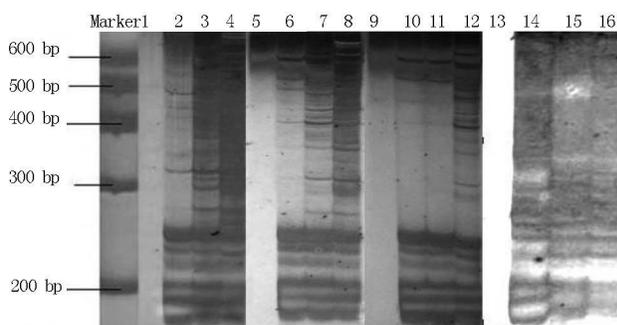


图3 基本反应体系中 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、*Taq* 酶浓度和引物浓度对 SSR 反应的影响

注: 1~4; Mg^{2+} 浓度分别为 0.1、1.0、1.5、2.5 mmol/L; 5~8; dNTPs 浓度分别为 0.01、0.1、0.2、0.5 mmol/L; 9~12; *Taq* 酶浓度分别为 0.1、1.0、1.5、2.0 U; 13~16; 引物浓度分别为 0.1、0.5、0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

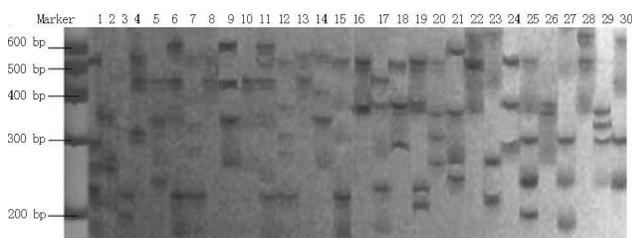


图4 引物 PS07A02 对 30 个李品种 DNA 的 SSR 扩增带型

注: 从左到右品种依次为: 大玫瑰、甘李、晚黑、大总统、斯坦雷、鲁耶尔、理查德早生、香扁李、锦西牛心李、安哥诺、黑宝石、黑琥珀、红肉李、拉罗达、威克森、凯瑟曼、龙园秋李、盖县大李、黄干核、东北美丽、早美丽、澳李 14、奈李、风味皇后、味厚、奉化李、木隼李、美丽李、水晶李、五香李。

于李属植物间遗传多样性分析以及进一步的分子标记、遗传图谱构建等方面的研究。

3 讨论与结论

SSR 标记具有多态性高、试验重复性好和共显性遗传的特点, 被广泛应用在作物遗传育种研究中。但对于不同植物 SSR 标记的技术体系有所不同。张琪静等^[15]在建立甜櫻桃 SSR-PCR 反应体系时采用了五因素四水平的正交实验和 10 个温度梯度, 共包括 160 个组合。该种试验设计虽然能得到较全面的信息, 但工作量非常大, 试验成本高, 并且由于不能在同一台 PCR 扩增仪上同时进行扩增, 容易形成误差。该试验采用了先构建基本反应体系, 再在基本反应体系中进行单因素梯度优化试验的方法, 既节约了成本, 又有的放矢的针对每一个因素, 观察其对试验结果的影响, 提高了工作效率。而且所有组合可以在同一台 PCR 扩增仪中同时进行, 减少了误差。

在对甜櫻桃模板 DNA 浓度进行研究时表明, 当模板 DNA 浓度在 10~40 ng, 对 SSR 扩增结果影响不大^[15]。而在试验中发现, 当 DNA 模板量为 15 ng 时, 获

得的条带很淡,不利于统计分析。当模板量为 60 ng 时,显影后,泳道背景颜色过深,且带型复杂,不便于观察。说明 DNA 模板量对野生樱桃李影响较大,同时也说明模板 DNA 浓度在不同植物间存在着差异。另外,在试验中发现,除了模板 DNA 浓度,退火温度和 $MgCl_2$ 浓度对 SSR 扩增结果也有较大影响。

在构建苹果 SSR 反应体系时发现^[16],退火温度的高低直接影响引物与模板 DNA 的特异性结合,退火温度过低,可导致非特异性扩增而降低特异性扩增效率,非特异性扩增条带较多,结果不可靠。退火温度逐渐升高时,非特异性扩增条带逐渐减少,但是过高的退火温度则会影响引物与模板的结合,从而降低 PCR 扩增效率,这和得到的结果相同。

多数研究表明, Mg^{2+} 浓度对 *Taq* DNA 聚合酶影响很大,可影响酶活性、引物退火和解链温度、产物的特异性以及引物形成二聚体等。研究表明 Mg^{2+} 浓度越低,获得的扩增产物越少,浓度越高,获得的扩增产物越多,但也包含了大量非特异扩增。这与该试验结果一致。

综合以上分析,从结果稳定性和经济性出发,建立和优化了野生樱桃李 SSR-PCR 反应体系为:25 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 1.0 mmol/L,引物 0.5 μ mol/L,dNTPs 0.20 mmol/L,*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U、模板 DNA 30 ng。SSR 扩增程序:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min,35 个循环(94 $^{\circ}C$ 30 s,60 $^{\circ}C$ 1 min,72 $^{\circ}C$ 1 min),72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。可供研究野生樱桃李种质资源和遗传育种时参考。

参考文献

[1] 姚利华,滕元文. EST-SSR 标记及其在果树研究中的应用[J]. 果树学报, 2008, 25(2): 219-224.
 [2] Thomas M R, Cain P, Scott N S. DNA typing of grapevines. A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness[J]. Plant Mol Biol, 1994, 25: 939-949.
 [3] Donadini L, Lain O, Geuna F, et al. Development of a new SSR-based linkage map in apricot and analysis of synteny with existing Prunus maps[J]. Tree Genetics & Genomes, 2007, 3: 239-249.

[4] Aranzana M, Pineda A, Cosson P, et al. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the Prunus genome[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106: 819-825.
 [5] Anna V B, Gregory L R, William V B, et al. Simple Sequence Repeat Markers for Detecting Sources of Tolerance to PTSL Syndrome in Prunus Persica Rootstocks[J]. Euphytica, 2006, 147: 287-295.
 [6] Sosinski B, Gannavarapu M, Hager L D, et al. Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* L. Batsch)[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 421-428.
 [7] Zhebentyayeva T, Reighard G, Gorina V, et al. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106: 435-444.
 [8] He T M, Chen X S, Xu Z, et al. Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54: 563-572.
 [9] Wünsch A, Carrera M, Homaza J L. Molecular Characterization of Local Spanish Peach (*Prunus persica* L.) Batsch Germplasm[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53: 925-932.
 [10] Arancha A M, Daorden E, Garéa E, et al. Fecund effect of accidental pollinations on the progeny of low setting Prunus interspecific crosses[J]. Euphytica, 2006, 147: 389-394.
 [11] Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, et al. Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.)[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 127-138.
 [12] Joobeur T, Peniam N, Vicente M C, et al. Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers[J]. Genome, 2000, 43: 649-655.
 [13] Cantini G, Iezzoni A F, Lamboy W F, et al. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats[J]. J Amer Soc Horticult Sci, 2001, 126: 205-209.
 [14] Sosinski B, Gannavarapu M, Hager L D, et al. Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* L. Batsch)[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 421-428.
 [15] 张琪静,张新忠,李贺,等. 甜樱桃 SSR 体系的建立、优化及应用[J]. 果树学报, 2007, 24(6): 770-773.
 [16] 徐兴兴,梁海永,甄志先,等. 苹果 SSR 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2006, 23(2): 161-164.

Establishment and Application of SSR System in Wild Myrobalan Plum (*Prunus sogdiana* Vass.)

LI Fang, ZHOU Long, HU Jian-fang

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: We have established SSR-PCR system in wild myrobalan plum (*Prunus sogdiana* Vass.) by optimization of PCR reaction program, reaction system (annealing temperature, template DNA, Mg^{2+} , dNTP, *Taq* DNA Polymerase and primer). In the end, we got optimum SSR marker systems in wild myrobalan plum. SSR system: template DNA 30 ng, Mg^{2+} 1.0 mmol/L, dNTP 0.20 mmol/L, *Taq* polymerase 1 U, primer 0.5 μ mol/L in 2.5 μ L system, reaction program: initial denaturation step for 5 min at 94 $^{\circ}C$, followed by 35 cycles at 94 $^{\circ}C$ for 30 s, 60 $^{\circ}C$ for 1 min and 72 $^{\circ}C$ for 1 min, followed by a final extension step at 72 $^{\circ}C$ for 10 min. High stability and polymorphism results had been obtained.

Key words: *Prunus sogdiana* Vass.; SSR-PCR; reaction system