

平欧杂种榛 ISSR 反应体系的优化与验证

魏 鑫¹, 魏永祥¹, 王 颖², 刘 成¹, 王兴东¹, 董文轩³

(1. 辽宁省果树科学研究所 辽宁 熊岳 115009; 2. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 3. 沈阳农业大学 园艺学院 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以 5'-(AG)₈(AGC)₃-3' 为引物对育种代号为 82-6 的平欧杂种榛品系的 ISSR 反应体系中各个主要影响因子进行优化筛选。结果表明:在 20 μL ISSR 反应体系中各组分的最适浓度分别是, DNA 模板为 2.5 ng/μL, Mg²⁺ 浓度为 1.875 mmol/L, 1×buffer(不含 MgCl₂), 引物的浓度为 0.3 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, dNTP 浓度为 200 μmol/L。并利用该优化体系对平欧杂种榛的 15 个品种(系)进行了 ISSR 扩增, 证实该体系稳定可靠。

关键词:榛子;ISSR;体系优化

中图分类号:S 664.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)04-0125-04

榛子榛科(Corylaceae)榛属(*Corylus* L.)植物, 又名榛树是世界四大坚果果树之一, 也是古老而宝贵的木本油料树种, 开发和利用榛子资源具有极其重要的经济效益。我国是榛树的原产国之一, 榛子的利用历史悠久。但自古以来以野生果实采摘为主, 园艺化栽培甚少。辽宁省经济林研究所梁维坚、许万英等人开展的榛子杂交育种获得成功, 培育出具有抗寒、大果、丰产特性并对我国气候适应性强的平欧杂种榛。于是, 从 20 世纪 90 年代开始, 我国进入了榛子的园艺化栽培阶段^[1-4]。

简单重复间序列(Inter-simple sequence repeats, ISSR)分子标记方法是加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等 1994 年建立的, 是一种基于 PCR 的微卫星类分子标记新技术, 根据位于反向排列的 SSR 之间的 DNA 序列多态性来鉴别个体。其优点是引物设计较为简单, 不需要知道 DNA 序列即可利用引物进行扩增。一般通过琼脂糖凝胶电泳就可以检测。ISSR 标记技术最早在作物上得到应用^[5], 近些年来在一些果树上也得到广泛应用^[6-10]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以沈阳农业大学榛树资源圃的 3 a 生平欧杂种榛 15 份资源为试材(具体名称及电泳泳道见表 1), 于 2007 年 5 月从田间选取刚萌发 1 a 生新梢上的幼叶放入冰盒

中迅速带回实验室, 用自来水和蒸馏水冲洗干净后再用滤纸吸干叶片表面水分, 投入液氮中速冻后放-70℃超低温冰箱中保存备用。

表 1 参试平欧杂种榛资源名称

泳道编号	品种名称	泳道编号	品种名称
1	82-81	9	82-32
2	84-2	10	81-67
3	84-308	11	83-63
4	81-31	12	85-145
5	81-18	13	85-57
6	84-487	14	85-49
7	85-8	15	82-6
8	84-24		

1.2 基因组 DNA 的提取

试验采用改良的 CTAB 法^[11]提取榛试材幼叶中的 DNA, 提取的总 DNA 样品分别用含 EB(0.5 μg/mL)的 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测和核酸蛋白分析仪检测。在紫外透射仪(UVP 3UVTM Transilluminator)上观察电泳结果, 用佳能 A610 数码相机拍照记录凝胶图像。

1.3 试剂

试验所用的 Taq DNA 聚合酶购自天根公司, dNTP 购自北京原平皓公司, 引物的合成来自于联星公司。

1.4 ISSR 反应体系优化

ISSR-PCR 反应体系在赵国芳^[12]实验方法的基础上进行了主要构成因素的进一步优化。首先在榛 ISSR 引物退火温度研究中, 在 PCR 反应体积为 20 μL, 内含 1×PCR 反应缓冲液(天根公司)、1.875 mmol/L MgCl₂(天根公司)、0.2 mmol/L dNTP(天根公司)、0.3 μmol/L 引物(TaKaRa)、1 U Taq DNA 聚合酶(天根公司)、DNA 2.5 ng/μL 条件下, 引物退火温度设 47.3℃、48.1℃、49.1℃、50.6℃、52.6℃、54.7℃、56.6℃、58.0℃、59.0℃、59.8℃10 个温度梯度, 根据引物的表现选择各引物所适合的退火温度。

第一作者简介:魏鑫(1982-), 男, 硕士, 研究实习员, 现主要从事果树种质资源和果树栽培生理工作。E-mail: run2010@163.com.

通讯作者:董文轩(1963-), 男, 博士, 教授, 现从事果树种质资源及遗传育种研究。E-mail: wxdong63@126.com.

基金项目:国家科技基础条件平台建设资助项目(2005DKA21002-07-29)。

收稿日期:2009-10-28

其次,在 ISSR 反应体系各反应成分用量的研究中,引物浓度设 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 μM 共 5 个梯度, DNA 模板设 20、30、40、50、60 ng 共 5 个梯度, Taq DNA 聚合酶设 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U 共 5 个梯度, dNTP 设 50、100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$ 共 6 个浓度梯度, Mg^{2+} 浓度设置 0.625、1.25、1.875、2.5、3.125 mM 共 5 个梯度,反应体系为 20 μL 。体系优化时,固定其他条件,每次改变 1 个参数,以确定该参数对 ISSR 结果的影响。

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 退火温度 54.7 ~ 59 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 进行 40 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应在美国 MJ 公司的 PTC-200 型 PCR 循环仪上进行。

表 2 ISSR 引物序列和适宜退火温度

引物名称	引物序列	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
E1	5'-(CA) ₈ A(AG)G-3'	59
E2	5'-(GA) ₈ (CT)C-3'	56.6
E3	5'-(AG) ₈ (CT)C-3'	54.7
E4	5'-(AC) ₈ (CT)A-3'	54.7
E5	5'-(AC) ₈ (CT)T-3'	59
E6	5'-(AG) ₈ C-3'	58
E7	5'-(CT) ₈ (AG)C-3'	54.7
E8	5'-(AGT)(GCT)(AGT)(AC) ₇ -3'	59
E9	5'-(AGC)(ACT)(AGC)(GT) ₇ -3'	54.7
E10	5'-(AG) ₈ (AGC)C-3'	56.6

2 结果与分析

2.1 平欧杂种榛 ISSR 分子标记最佳反应体系的建立

2.1.1 适宜退火温度的确定 不同引物的退火温度不同,同一引物对于不同的物种退火温度也可能不同。而退火温度对于 ISSR-PCR 反应影响明显。因此该试验基于梨属 ISSR 反应体系,以平欧杂种榛 82-6 号的总 DNA 为模板进行温度梯度试验。在美国 MJ 公司的 PTC-200 型 PCR 仪上进行扩增反应,10 个引物各自适宜的退火温度见表 1。如图 1 所示,当退火温度较低和较高时,试验扩增出的片段都较少,带也较弱。当退火温度达到 56.6 $^{\circ}\text{C}$ 时,引物 E10 扩增出的 DNA 谱带多且最清晰。因此引物 E10 适合于平欧杂种榛 ISSR 反应体系的退火温度为 56.6 $^{\circ}\text{C}$ 。

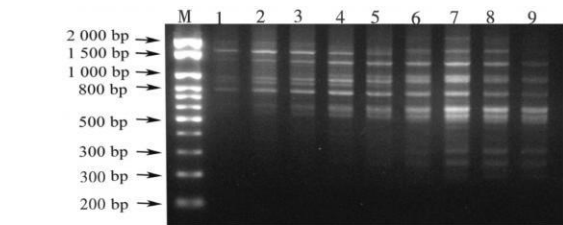


图 1 引物 E10 的不同退火温度对杂种榛 DNA 扩增结果的影响
注: M; 100 bp DNA ladder; 1~9 泳道的退火温度依次为: 47.3 $^{\circ}\text{C}$ 、48.1 $^{\circ}\text{C}$ 、49.1 $^{\circ}\text{C}$ 、50.6 $^{\circ}\text{C}$ 、52.6 $^{\circ}\text{C}$ 、54.7 $^{\circ}\text{C}$ 、56.6 $^{\circ}\text{C}$ 、58.0 $^{\circ}\text{C}$ 、59.0 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.2 模板 DNA 适宜浓度确定 PCR 反应中对模板浓度要求范围较宽,试验在 20 μL 反应体系中,固定 Mg^{2+} 浓度为 1.875 mM, 1 \times buffer (不含 MgCl_2), 引物的浓度为 0.3 μM , Taq DNA 聚合酶 1 U, dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, DNA 模板设 20、30、40、50、60 ng 共 5 个梯度。从图 2 所示,在其他因素不变的情况下, DNA 模板含量的变化对扩增结果影响不大,因此试验选择 DNA 模板含量为 50 ng。

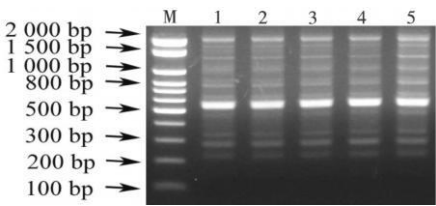


图 2 模板 DNA 含量不同对杂种榛 DNA 扩增结果的影响
注: M; 100 bp DNA ladder; 1~5 泳道的模板 DNA 含量依次为: 20、30、40、50、60 ng。

2.1.3 引物适宜浓度的确定 引物浓度是影响扩增的一个重要因素,合适的引物既能增加特异性又能增加敏感性。试验在 20 μL 反应体系中,固定 Mg^{2+} 浓度为 1.875 mM, 1 \times buffer (不含 MgCl_2), DNA 模板 2.5 ng/ μL , Taq DNA 聚合酶 1 U, dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 条件下,引物浓度设为 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 μM 共 5 个梯度,如图 3 所示:引物浓度的变化对扩增的影响不明显,试验选择引物的浓度为 0.3 μM 。

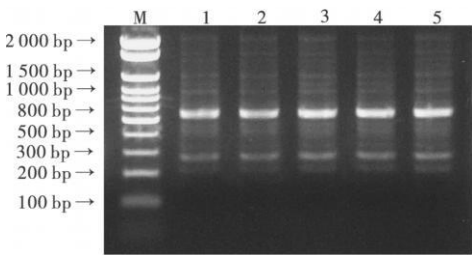


图 3 不同引物浓度对杂种榛 DNA 扩增结果的影响
注: M; 100 bp DNA ladder; 1~5 泳道的引物浓度依次为: 0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 μM 。

2.1.4 dNTP 适宜浓度的确定 dNTP 是 PCR 反应的原料。其浓度过高容易产生错配,同时与 Taq 酶竞争 Mg^{2+} ,使 Taq 酶不能充分发挥聚合活性;浓度太低则扩增产率低。在 20 μL 反应体系中,固定 Mg^{2+} 浓度为 1.875 mM, 1 \times buffer (不含 MgCl_2), 引物的浓度为 0.3 μM , DNA 模板 2.5 ng/ μL , Taq DNA 聚合酶 1 U 条件下, dNTP 设 50、100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$ 共 6 个浓

度梯度。如图 4 所示:dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时效果最佳。

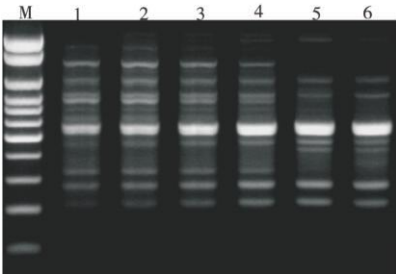


图 4 不同 dNTP 浓度对杂种榛 DNA 扩增结果的影响
注: M: 100 bp DNA ladder; 1~6 泳道的 dNTP 浓度依次为:
50、100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.1.5 Taq DNA 聚合酶适宜浓度的确定 酶的用量直接关系到实验结果, 用量过多不仅增加成本, 而且容易产生非特异性扩增产物, 量少则会使酶过早地消耗完, 产物合成效率低。在 20 μL 反应体系中, 固定 Mg^{2+} 浓度为 1.875 mM, 1 \times buffer(不含 MgCl_2), 引物的浓度为 0.3 μM , DNA 模板 2.5 ng/ μL , dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, Taq DNA 聚合酶设 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U 共 5 个梯度, 如图 5 所示: Taq DNA 聚合酶浓度除 0.5 U 外其它浓度的变化不会对 PCR 结果产生显著的影响, 同时考虑到节省经费, 试验中 Taq DNA 聚合酶浓度选择 1 U。

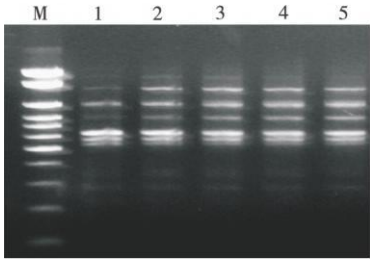


图 5 不同 Taq DNA 聚合酶含量对杂种榛 DNA 扩增结果的影响
注: M: 100 bp DNA ladder; 1~5 泳道的 Taq DNA 聚合酶含量依次为: 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U。

2.1.6 Mg^{2+} 适宜浓度的确定 Mg^{2+} 浓度是 ISSR-PCR 的一个主要变化因素, 作为 Taq 酶的辅助因子, Mg^{2+} 浓度不仅影响 Taq 酶的活性, 还能与反应液中的 dNTP、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效率, 模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性。在 20 μL 反应体系中, 固定 1 \times buffer(不含 MgCl_2), 引物的浓度为 0.3 μM , DNA 模板 2.5 ng/ μL , Taq DNA 聚合酶 1 U, dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, Mg^{2+} 浓度设 0.625、

1.25、1.875、2.5、3.125 mM 共 5 个浓度梯度, 如图 6 所示: Mg^{2+} 浓度在 1.875 mM 时条带最清晰。
2.2 优化后的榛属 ISSR-PCR 分析体系及验证
2.2.1 优化后的榛属 ISSR-PCR 分析体系 以上试验结果表明, 榛属植物 ISSR-PCR 分析的最适反应体系为: 20 μL 反应体系中, DNA 模板为 50 ng, Mg^{2+} 浓度为 1.875 mM, 1 \times buffer(不含 MgCl_2), 引物的浓度为 0.3 μM , Taq DNA 聚合酶 1 U, dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 退火温度 54.7~59 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 进行 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其扩增产物。

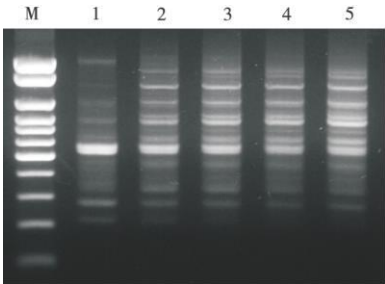


图 6 不同 Mg^{2+} 浓度对杂种榛 DNA 扩增结果的影响
注: M: 100 bp DNA ladder; 1~5 泳道的 Taq DNA 聚合酶含量依次为: 0.625、1.25、1.875、2.5、3.125 mM。

2.2.2 优化后的榛属 ISSR-PCR 分析体系的验证 应用上述体系选择 2 个引物对 15 份平欧杂种榛资源进行扩增实验, 以检测优化后榛属植物的 ISSR-PCR 反应体系的效果。结果如图 7、8 所示, 15 份资源都能扩出清晰、重复性好、多态性高的带, 表明优化确立的榛属植物 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠, 可应用于榛属植物的亲缘关系和遗传多样性的研究。

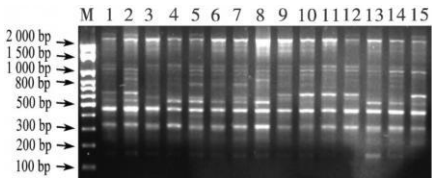


图 7 引物 E1 在 15 份杂种榛资源中的 ISSR 扩增结果

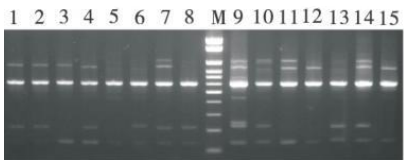


图 8 引物 E6 在 15 份杂种榛资源中的 ISSR 扩增结果

3 讨论

ISSR 分子标记技术受反应条件、扩增程序变化以及物种不同等诸多因素的影响。为确保 ISSR 分子标记的准确性和有效性,尤其是在某一树种上初次应用该技术,对 ISSR 反应体系进行优化是必不可少的。试验对引物退火温度、模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTP 浓度、Taq DNA 聚合酶浓度和 Mg^{2+} 浓度 6 个影响 PCR 反应体系的主要因素进行了研究。引物的退火温度对 ISSR 反应的结果有直接重要的影响。引物由于碱基序列的长短不同而具有不同的退火温度,同种引物在不同树种上的退火温度也可能不尽相同。从试验结果上看,当引物的退火温度过低或过高时扩增产物的条带较少且不是很清晰。这与桂腾琴^[13]在果梅和齐靖^[14]在枣上的研究规律相一致。选择适合的退火温度可以获得较好的条带及最多的信息量。

在试验中发现 Mg^{2+} 浓度较低时扩增产物较少且条带较弱,而浓度过高时又会出现条带弥散,背景模糊的现象。具体原因可能是 Taq DNA 聚合酶对 Mg^{2+} 浓度依赖性较高,适宜的 Mg^{2+} 浓度有利于 PCR 反应的顺利进行,使 PCR 反应扩增结果更为清晰。这与郭凌飞^[15]和付燕^[16]的研究结果相一致。

dNTP 浓度逐渐升高时,扩增片段逐渐清晰,当浓度大于 $250 \mu\text{mol/L}$,扩增片段减少且开始模糊不清。原因可能是 dNTP 为 PCR 反应的主要原料,浓度过低时,扩增产物的产量较少,造成谱带不清。而高浓度的 dNTP 易产生错误掺入,导致某些片段可能扩增不出产物。而试验中模板 DNA 浓度、引物浓度、Taq DNA 聚合酶浓度的变化对反应体系的影响不大。

参考文献

[1] 梁维坚 解明 董德芬 等. 榛子新品种选育研究[J]. 中国果树, 2000 (2): 4-6

- [2] 张宇和 梁维坚, 张育明, 等. 中国果树志·板栗榛子卷[M]. 1 版. 北京: 中国林业出版社, 2005: 193.
- [3] 张玲, 翟明普, 解明, 等. 榛子新品种 辽榛 1 号[J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1593.
- [4] 张玲, 翟明普, 解明, 等. 榛子新品种 辽榛 2 号[J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 151.
- [5] Ramesh V, Kantety, Zeng X P, Jeffrey L, Bennetzen et al. Assessment of genetic diversity in Dent and Popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification[J]. Mol Breeding, 1995(1): 365-373.
- [6] Moreno S, Martn J P, Ortiz J M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm[J]. Euphytica, 1998 (101): 117-125.
- [7] Fang D Q, Roose M L. Identification of dosely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers[J]. Theor Apple Genet, 1999, 95: 107-112.
- [8] Amau G, Lallemant J, Bourgoin M. Fast and reliable straw berry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification[J]. Euphytica, 2002(129): 69-79.
- [9] Pharmawati M, Yan G, Patrijk M, Finnegan. Molecular Variation and Fingerprinting of Leucadendron Cultivars (Proteaceae) by ISSR Markers[J]. Annals of Botany, 2005, 95: 1163-1170.
- [10] 代红艳 张志宏, 周传生, 等. 山楂 ISSR 分析体系的建立和优化[J]. 果树学报, 2007, 24(3): 313-318.
- [11] 李媛媛 代红艳, 郭修武, 等. 山楂总 DNA 提取方法的比较[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 115-118.
- [12] 赵国芳. ISSR 对梨属(*Pyrus* L.)栽培品种基因组的指纹分析[D]. 河北农业大学硕士学位论文, 2003.
- [13] 桂腾琴 乔爱民, 孙敏, 等. 果梅 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(10): 124-128.
- [14] 齐靖, 董祯, 申连英, 等. 枣 ISSR 扩增体系的建立[J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 209-212.
- [15] 郭凌飞 邹明宏, 曾辉等. 澳洲坚果 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学, 2008, 44(5): 160-164.
- [16] 付燕, 罗楠, 杨芬, 等. 枇杷属植物 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 果树学报, 2009, 26(2): 180-185.

Optimization of the Inter-simple Sequence Repeat Reaction System and Its Verification in Ping'ou Hybrid Hazelnut

WEI Xin¹, WEI Yong-xiang¹, WANG Ying², LIU Cheng¹, WANG Xing-dong¹, DONG Wen-xuan³

(1. Liaoning Fuit Reasearch Institute, Liaoning Xiongyao 115009; 2. Horticultural College of Jinlin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 3. College of Horticultural, Shenyang Agricultural Vniversity, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: The optimization of main influential factors of ISSR reaction system about the ping'ou breeding strain 82-6 was studied with primer 5'-(AG)₈(AGC)C-3'. The results showed that the optimum concentrations of components such as template DNA, Mg^{2+} , Buffer, primer, Taq DNA polymerase, dNTP in $20 \mu\text{L}$ reaction system were $2.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 1.875 mmol/L , $1\times$ buffer (without Mg^{2+}), $0.3 \mu\text{mol/L}$, 1 U, $200 \mu\text{mol/L}$. Amplifications of 15 ping'ou breeding varieties (strains) of hazelnut were achieved using this optimum system.

Key words: hazelnut; ISSR; optimization