

# 杜鹃花 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化

王书珍, 查三省, 程 呈, 张传进, 方元平, 金卫斌

(经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心, 黄冈师范学院 生命科学学院, 湖北 黄冈 438000)

**摘 要:**以杜鹃花为试验材料,采用正交实验方法,研究模板 DNA 浓度、ISSR 引物浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度等 5 个因素对 ISSR-PCR 反应体系的影响,以建立适合杜鹃花的 ISSR-PCR 最佳扩增体系。结果表明:杜鹃花 ISSR 反应体系的最佳条件为模板 DNA 用量为 60 ng/20 $\mu$ L,ISSR 引物浓度 0.60  $\mu$ mol/L,dNTPs 浓度 0.50  $\mu$ mol/L,*Taq* DNA 聚合酶浓度 30 U/mL, $Mg^{2+}$  浓度为 0.6 mmol/L。采用该反应体系可以从 10 份杜鹃花(*R. simsii*)基因组内扩增出稳定性高、重复性好 ISSR-PCR 产物。该研究为杜鹃花的遗传多样性分析、ISSR 指纹图谱构建、亲缘关系鉴定等研究奠定了基础。

**关键词:**杜鹃花;ISSR-PCR;引物筛选;正交优化

**中图分类号:**S 685.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0111-04

杜鹃花(*Rhododendron simsii*)属杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendroideae*)植物,是重要的园林绿化和盆栽观赏植物,在森林生态系统中对水土保持及生态系统的稳定意义重大,并因具有极高的观赏价值而被誉为“花中西施”和“木本花卉之王”<sup>[1-3]</sup>。杜鹃花分布广泛,遍及亚洲、欧洲、北美洲等地,并且因气候条件不同而形成了常绿大乔木、小乔木、灌木,以及落叶灌木等地理居群<sup>[2-3]</sup>。杜鹃花属含有近 1 000 个种,中国多达 571 种,滇藏川三省交汇处的横断山脉是世界杜鹃花的发源地和分布中心<sup>[4]</sup>。随着气候变化以及人类活动对环境的干扰加剧,杜鹃花的种质资源也受到不同程度的影响,部分稀有种甚至出现退化现象。因此,对现有的杜鹃花资源的遗传多样性现状进行科学评价及合理保护是杜鹃花资源可持续发展战略的重中之重。

简单重复序列区间标记(inter-simple sequence repeat,

ISSR)是 ZIETKIEWICZ 等<sup>[5]</sup>于 1994 年基于 PCR 扩增而建立的第二代 DNA 分子标记。ISSR 分子标记的引物是基因组内的 SSR 序列,由 1~4 个碱基重复单元构成的核心序列和几个锚定碱基构成,长度为 16~18 nt。ISSR 标记结合了 RAPD 和 SSR 标记的优点,具有多态性好、成本较低、所需要的 DNA 模板量少、操作简单等特点,因而被广泛应用于物种遗传多样性分析、种质资源鉴定、遗传图谱构建、QTL 定位、分子标记辅助育种等研究中<sup>[6]</sup>。ISSR 分子标记在杜鹃花的遗传学研究中也起着重要的作用,金则新等<sup>[7]</sup>利用 12 对 ISSR 引物对浙江省的 5 个云锦杜鹃居群的遗传多样性进行研究;彭婵等<sup>[8]</sup>利用 ISSR 引物对湖北古杜鹃群落的遗传多样性进行研究;赵芯等<sup>[9]</sup>用 12 个 ISSR 标记分析了浙江大明山 4 个鹿角杜鹃的遗传多样性和遗传结构;孔刚<sup>[10]</sup>采用 11 对 ISSR 引物分析了福建 15 份杜鹃花资源的遗传多样性和亲缘关系;LIU 等<sup>[11]</sup>利用 ISSR 标记对长白山北坡 4 个不同海拔高度牛皮杜鹃居群进行研究,发现遗传多样性水平随海拔增加而增高;赵凯等<sup>[12]</sup>利用 ISSR 标记对 5 个都支杜鹃居群的遗传距离与地理距离之间的关系进行分析。然而,对于生态旅游开发区的湖北龟峰山的杜鹃花资源,其 ISSR 遗传多样性研究则相对比较滞后。

该研究以湖北龟峰山的杜鹃花为研究对象,采用单因素试验和正交设计,对其 ISSR-PCR 反应体系进行优化,确定了适合杜鹃花(*R. simsii*)的最优 ISSR-PCR 反应

**第一作者简介:**王书珍(1984-),女,河南郑州人,博士,讲师,现主要从事植物分子遗传学等研究工作。E-mail:wangshuzhen04@163.com.

**责任作者:**金卫斌(1961-),男,湖北荆州人,博士,教授,现主要从事生态学等研究工作。E-mail:wangshuzhen710@whu.edu.cn.

**基金项目:**黄冈师范学院博士启动基金资助项目(2013030903);经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室开放基金资助项目(2013000403)。

**收稿日期:**2015-01-28

体系,以期为杜鹃花种群遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、指纹图谱构建等研究奠定技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的杜鹃花材料采自湖北龟峰山的中高纬度区。依据形态差异,采集 10 份差异明显的杜鹃花的健康新鲜叶片,置于自封袋内,并放于冰盒中带回实验室。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 杜鹃花基因组 DNA 提取

采用改良的  $3 \times$  ISSR-PCR 反应体系的因素与水平设计

表 1

水平	因素				
	dNTP 浓度 /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	模板 DNA /ng	引物浓度 /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Taq DNA 聚合酶浓度 /( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Mg <sup>2+</sup> 浓度 /( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
1	0.25	20	0.15	30	0.4
2	0.50	40	0.30	50	0.6
3	0.75	60	0.45	75	0.8
4	1.00	80	0.60	100	1.0

1.2.3 PCR 扩增 根据表 1 配置总体积为 20  $\mu\text{L}$  的 ISSR-PCR 反应体系,每管加入 2  $\mu\text{L}$   $10 \times \text{Taq}$  Buffer,并用无菌水补至总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,选用 ISSR 引物 5'-(AC)<sub>8</sub>T-3'在 Eppendorf Mastercycler gradient PCR 仪上进行扩增。PCR 扩增程序为 94℃预变性 7 min,35 个扩增循环(94℃变性 40 s;57℃退火 40 s;72℃延伸 90 s),72℃延伸 10 min。PCR 产物用 3%琼脂糖凝胶电泳检测并统计带型。

1.2.4 反应体系的稳定性检测 随机挑选 2 个 ISSR 引物(WR-1:5'-(CA)<sub>8</sub>T-3';WR-2:5'-(GA)<sub>8</sub>Y-3',其中 Y 是兼并碱基,代表 C 或者 G),对 10 份杜鹃花 DNA 样品进行扩增,以验证正交实验优化的杜鹃花 ISSR-PCR 反应体系的稳定性,每个引物重复 3 次。

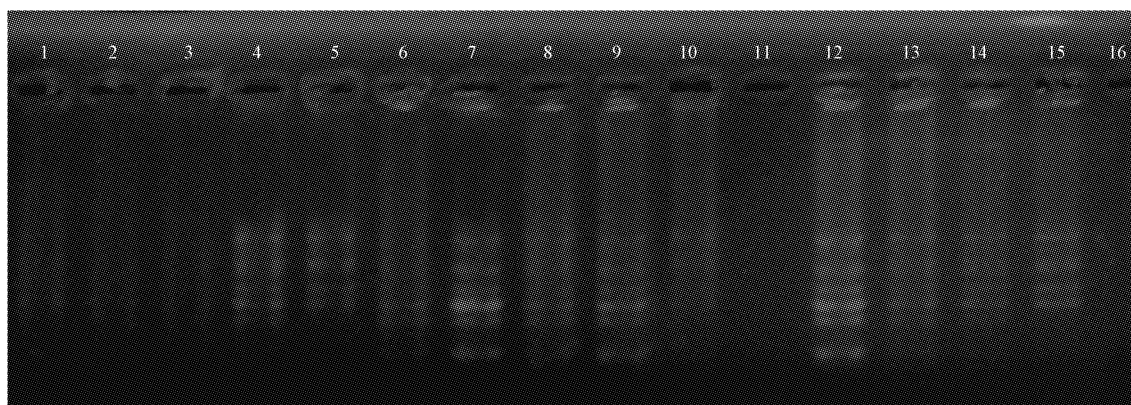
CTAB 法提取杜鹃嫩叶组织 DNA<sup>[13]</sup>。1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 DNA 的质量(DNA 的纯度和浓度),并用 UV300 紫外分光光度计精细测定 DNA 样品的浓度,调整基因组 DNA 浓度至 100 ng/ $\mu\text{L}$ ,并置 -20℃冰箱内保存备用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的正交实验设计 ISSR-PCR 反应体系的正交实验设计。用  $L_{16}(4^5)$  正交实验检测 dNTP 浓度、模板 DNA、引物浓度、Taq DNA 聚合酶浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度等 5 个因素对杜鹃 ISSR-PCR 反应扩增结果的影响,因素与水平设计见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 杜鹃花 ISSR-PCR 反应体系的正交优化实验

对 ISSR-PCR 扩增结果谱带的强弱和杂带的多少进行直观分析。研究表明,Taq DNA 聚合酶浓度、dNTP 浓度、引物浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、模板 DNA 浓度等 5 个因素均能够影响杜鹃花(*R. simsii*)ISSR-PCR 的扩增效果,不同的正交组合中 PCR 扩增条带谱各不相同。由图 1 可知,11 和 16 号正交组合并无 PCR 产物扩增;组合 1、2、3 的扩增产物在琼脂糖凝胶上是弥散的,亦即几乎无专一性扩增的 PCR 条带出现;剩余的 11 个组合有扩增条带出现(2~6 条),组合 10 和组合 6 则分别扩增出 2 条和 3 条带,组合 5、14、15 仅扩增了 4 条带,组合 4 和 13 则扩增了 5 条带出来。组合 7、8、9、12 均扩增出 6 条不同的带型,多态性较强。



注:1~16 为不同的处理组合编号,表 2 同。

图 1 正交实验设计杜鹃 ISSR-PCR 扩增结果

对比组合 1~4,在 dNTPs 浓度一致的情况下,DNA 浓度、引物浓度、模板 *Taq* DNA 聚合酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度等 4 种组分的量只有达到一定的值才能有 DNA 条带扩增出来。组合 8~10 和 12~15 等的背景噪音较高,其中组合 8 和 12 DNA 量较少,组合 9 的 *Taq* DNA 聚合酶浓度过低,组合 10 引物浓度过低,组合 13 的 dNTP 和引物浓度都较低,组合 14 体系中的  $Mg^{2+}$  相对浓度过高,组合 15 内的 dNTP 和 *Taq* DNA 聚合酶浓度都偏高。

表 2 ISSR-PCR 正交实验数据  
分析处理结果

处理号	A	B	C	D	E	条带数
1	1	1	1	1	1	0
2	1	2	2	2	2	0
3	1	3	3	3	3	0
4	1	4	4	4	4	5
5	2	1	2	3	4	4
6	2	2	1	4	3	3
7	2	3	4	1	2	6
8	2	4	3	2	1	6
9	3	1	3	4	2	6
10	3	2	4	3	1	2
11	3	3	1	2	4	0
12	3	4	2	1	3	6
13	4	1	4	2	3	5
14	4	2	3	1	4	4
15	4	3	2	4	1	4
16	4	4	1	3	2	0
$K_1$	5	15	3	16	12	
$K_2$	19	9	14	11	12	
$K_3$	14	10	16	6	14	
$K_4$	13	17	18	18	13	
极差 $R$	14	8	15	12	2	
因素主次顺序	C>A>D>B>E					

## 2.2 最优组合的确定

根据试验结果对各个处理组合进行评价,分为 16 个等级。按照极差大小分析可知,各因素对杜鹃 ISSR-PCR 扩增结果的影响程度大小排列如下:引物浓度>dNTP

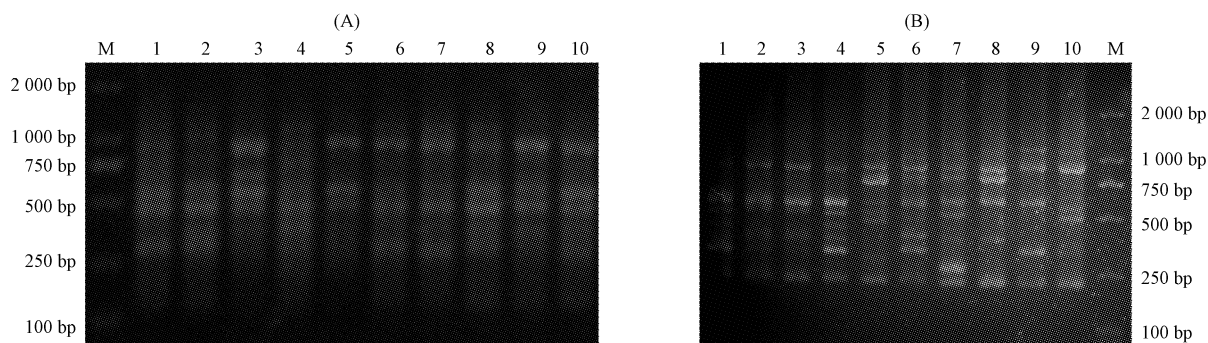
浓度>*Taq* DNA 聚合酶浓度>模板 DNA 浓度> $Mg^{2+}$  浓度;其中引物浓度为最主要的因素,其次是 dNTP 浓度,而  $Mg^{2+}$  浓度则为最次要的因素。试验结果表明 DNA 条带数最多、亮度最高的组合为 7 号组合  $A_2B_3C_4D_1E_2$  和 12 号组合  $A_3B_4C_2D_1E_3$ ,相比较而言,7 号组合的信噪比较低,且成本最低,即在 20  $\mu$ L 反应体系内含有 0.50  $\mu$ mol/L dNTPs,60 ng 基因组 DNA,0.60  $\mu$ mol/L 的 ISSR 引物,30 U/mL *Taq* DNA 聚合酶,以及 0.6 mmol/L  $Mg^{2+}$  离子。

## 2.3 反应体系的稳定性

采用优化出来的 7 号组合对采自龟峰山的 10 份杜鹃样品进行扩增。图 2 为随机挑选的 2 个 ISSR 引物 A 和 B 在 10 个杜鹃 DNA 样本内的扩增结果,带型清晰、多态性高、重复性好。表明该研究所优化出来的杜鹃 ISSR-PCR 反应体系是稳定可靠的,适合采用 ISSR 标记对杜鹃种群遗传学的研究。

## 3 讨论

ISSR 体系内组成成分的变化对 ISSR-PCR 的扩增稳定性和准确性均有一定的影响。因此,在利用 ISSR 分子标记分析杜鹃种群遗传多样性之前,对 ISSR-PCR 反应体系进行优化是非常必要的。该研究参照经典 PCR 反应体系,设计正交实验,发现引物的浓度、dNTP 浓度、*Taq* DNA 聚合酶量等 3 个因素是影响杜鹃 ISSR-PCR 扩增的主要因素,其中引物浓度为最主要的影响因素, $Mg^{2+}$  浓度则是影响该扩增体系的最次要因素,与贯叶连翘的研究结果恰恰相反<sup>[14]</sup>,可能的原因是该研究在设计  $Mg^{2+}$  浓度水平时设置的最低水平偏高,此外物种的差异也可能影响试验结果。采用 7 号组合在后续的遗传多样性分析中体系比较稳定,重复性比较强,即 20  $\mu$ L 反应体系内含有 0.50  $\mu$ mol/L dNTPs,60 ng 基因组 DNA,0.60  $\mu$ mol/L 的 ISSR 引物,30 U/mL *Taq* DNA 聚合酶,以及 0.6 mmol/L  $MgCl_2$  离子。



注:M 为 DNA marker 2 000,1~10 分别为 10 个杜鹃 DNA 样品。

图 2 不同 ISSR 引物(A)和(B)扩增结果检测结果



赵芯等<sup>[9]</sup>采用改良的 SDS 法提取鹿角杜鹃 (*Rhododendron latoucheae*) 基因组 DNA, 并利用单因素试验法得出了鹿角杜鹃 ISSR-PCR 反应体系的最优条件: 10  $\mu$ L 的 PCR 反应体积中含 5 ng 模板 DNA, 1.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.4 mmol/L dNTPs, 1 mg/mL BSA, 5 pmol 引物, 0.25 U *Taq* 酶。石绍高等<sup>[15]</sup>优化的高山杜鹃 (*Rhododendron lapponicum*) ISSR-PCR 最优反应体系 (25  $\mu$ L) 为: 0.64  $\mu$ mol/L 的引物, 0.68 mmol/L 的 dNTPs, 0.04 U/ $\mu$ L 的 *Taq* 酶, 2.08 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  离子, 1.6 ng/ $\mu$ L 的模板 DNA。郑宇等<sup>[16]</sup>优化出来的西洋杜鹃 (*Rhododendron hybridum*) ISSR-PCR 反应体系为: 20  $\mu$ L 反应体积中含 10 ng 模板 DNA, 0.25 mmol/L dNTPs, 2.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.4  $\mu$ mol/L 引物。

该研究与其他几个课题组<sup>[9,15-16]</sup>的 ISSR-PCR 体系成分的差异可能是由于所采用的研究对象及反应体系大小的差异造成的。该研究将为后续利用 ISSR 分子标记系统研究龟峰山野生杜鹃资源的分布模式、繁殖系统、遗传资源现状和进化潜力奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 鲜小林, 陈睿, 秦帆, 等. 四川杜鹃花资源调查及其育种意义研究[J]. 北方园艺, 2012(2): 92-96.
- [2] 冯国楣. 花中西施杜鹃花[J]. 园林, 2008(12): 124-125.
- [3] 王书珍, 张传进, 程华, 等. 杜鹃花表达序列标签资源中的微卫星信息分析[J]. 湖北林业科技, 2014, 43(2): 7-10.
- [4] WANG X Q, HUANG Y A, LONG C L. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the genus *Rhododendron*[J]. Hortscience, 2010, 45(9): 1394-1397.
- [5] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [6] 沈洁, 丁小余, 丁鸽, 等. 铁皮石斛居群差异的研究 II ISSR 指纹标记方法的建立与优化[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 291-294.
- [7] 金则新, 李钧敏, 顾奇萍. 云锦杜鹃自然居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1263-1267.
- [8] 彭婵, 张新叶, 杨彦伶, 等. 湖北麻城杜鹃古群落遗传多样性研究[J]. 湖北林业科技, 2010(4): 26-30.
- [9] 赵芯, 金则新, 李建辉, 等. 鹿角杜鹃遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学, 2010(3): 34-36.
- [10] 孔刚. 福建杜鹃花遗传多样性 ISSR 分析及其离体保存[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [11] LIU Y F, XING M, ZHAO W, et al. Genetic diversity analysis of *Rhododendron aureum* Georgi (Ericaceae) located on Changbai Mountain using ISSR and RAPD markers[J]. Plant Systematics and Evolution, 2012, 298(5): 921-930.
- [12] 赵凯, 王德元, 张文娟, 等. 都支杜鹃遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(5): 578-584.
- [13] 佟兆国, 王富荣, 章镇, 等. 一种从果树成熟叶片提取 DNA 的方法[J]. 果树学报, 2008, 25(1): 122-125.
- [14] 冯俊姣, 何苗, 联想. 贯叶连翘 ISSR-PCR 反应体系的建立与条件优化[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(36): 17525-17527.
- [15] 石绍高, 孙正海, 李世峰, 等. 高山杜鹃 ISSR-PCR 反应体系建立[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(27): 10977-10979, 11040.
- [16] 郑宇, 何天友, 陈凌艳, 等. 西洋杜鹃 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 福建林学院学报, 2011, 31(2): 126-130.

## Study on the Orthogonal Optimization of ISSR-PCR Reaction System of *Rhododendron simsii*

WANG Shuzhen, ZHA Sansheng, CHENG Cheng, ZHANG Chuanjin, FANG Yuanping, JIN Weibin

(Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resource Comprehensive Utilization, Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains, College of Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000)

**Abstract:** Taking *Rhododendron simsii* as material, the orthogonal test system was adopted to establish the ISSR-PCR amplification system and optimize amplification condition for *Rhododendron simsii*. The effect of template DNA concentration, ISSR primer concentration, dNTPs concentration, *Taq* DNA polymerase concentration, and  $Mg^{2+}$  concentration on amplification results of ISSR-PCR were studied. The results showed that the optimal 20  $\mu$ L ISSR-PCR reaction system including 60 ng genomic DNA, 0.60  $\mu$ mol/L primer, 0.50  $\mu$ mol/L dNTPs, 30 U/mL *Taq* DNA polymerase, and 0.6 mmol/L  $Mg^{2+}$ . This system also gave stable and reliable results in other ISSR primers. Therefore, the established ISSR-PCR reaction system would be helpful in the following genetic diversity analysis, the construction of ISSR fingerprints, phylogenetic analysis of *R. simsii*.

**Keywords:** *Rhododendron simsii*; ISSR-PCR; primer screening; orthogonal optimization