

山梨 SSR 反应体系的建立及其稳定性验证

李红莲, 王 强, 闫兴凯, 张茂君

(吉林省农业科学院 果树研究所, 农业部东北地区(吉林)果树科学观测实验站, 吉林 公主岭 136100)

摘 要:以山梨为试材,提取基因组 DNA,运用 5 因素 5 水平正交实验设计,对 SSR 反应体系中的 DNA 模板、 Mg^{2+} 、*Taq* 酶、dNTPs 和引物用量进行优化试验,确立适宜的 SSR 反应体系。结果表明:20 μ L 反应体系中,模板 DNA 10 ng、 Mg^{2+} (20 mmol/L) 2.5 μ L、*Taq* 酶 1.25 U、dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μ L、引物(10 μ mol/L) 1.5 μ L、10 \times PCR buffer 2.0 μ L;应用该 SSR 体系,在引物筛选试验及山梨 \times “幸水”后代群体中进行扩增,扩增效果较好,证实了该体系的适用性和稳定性。

关键词:山梨;SSR;反应体系;引物筛选

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)23-0104-04

山梨 (*Pyrus ussuriensis* Maxim) 是秋子梨野生类型,生长旺盛,是梨属植物中最抗寒的种类。由于其耐旱、耐涝、耐瘠薄,对腐烂病、黑星病、斑点病抵抗力强,在我国东北及内蒙梨产区用做砧木。

SSR (simple sequence repeat) 标记是由 MOORE 等^[1]于 1991 年提出的,由于其广泛分布于动植物基因组中,呈孟德尔遗传规律,有多态性丰富、重复性好、技术简单、特异性强等优点^[2],已被广泛用于居群遗传学分析、种质资源鉴定、遗传图谱绘制、目标性状基因定位等方面的研究^[3-6]。

SSR 技术应用于梨属植物的研究已有很多^[7-12],但在山梨上的应用报道很少。以该分子标记研究山梨等资源遗传多样性、目标性状精准鉴定和基因定位等将作为有效手段用于现代梨育种,并为科学利用山梨种质资源提供理论依据。

SSR 是基于 PCR 的一种分子标记技术,在利用已有的 SSR 反应体系进行山梨相关研究中,常出现扩增结

果受模板 DNA、 Mg^{2+} 、*Taq* 酶、dNTPs 和引物等因子浓度影响而不稳定的问题。因此,该试验开展了山梨 SSR 反应体系优化研究,以期建立一个适宜的 SSR-PCR 反应体系,为山梨及栽培秋子梨资源分子水平评价和高效率育种技术研发提供支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为山梨、“幸水”及山梨 \times “幸水”后代群体幼嫩叶片,采自吉林省农业科学院果树研究所秋子梨育种岗位试验园。用于 SSR-PCR 反应的 10 \times PCR Buffer、 Mg^{2+} (20 mmol/L) 购自北京索莱宝科技有限公司, dNTPs (10 mmol/L)、*Taq* 酶 (2.5 U)、植物基因组提取试剂盒购自北京天根生物技术有限公司。试验所用引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 利用北京天根生物技术有限公司生产的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行山梨基因组 DNA 的提取,方法略有改动, β -巯基乙醇调整为 10 μ L。获得的基因组 DNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 (电压 10 V/cm、电泳 30 min)。

1.2.2 PCR 体系的正交设计 体系优化材料为山梨,通过 5 因素 5 水平 $L_{25}(5^5)$ 正交实验设计,对 DNA 模板、 Mg^{2+} 、*Taq* 酶、dNTPs 和引物用量进行优化,正交设计共 25 种反应体系 (表 1)。

1.2.3 SSR-PCR 的扩增 按照表 1 设计的 PCR 扩增体系,另加入 2.0 μ L 10 \times PCR buffer,用高温灭菌的超纯水补足至 20 μ L,进行 PCR 扩增。PCR 反应在德国产的

第一作者简介:李红莲(1986-),女,硕士,助理研究员,现主要从事秋子梨新品种选育及配套栽培技术等研究工作。E-mail:hlh1129@126.com.

责任作者:张茂君(1963-),男,博士,研究员,现主要从事秋子梨新品种选育及配套栽培技术等研究工作。E-mail:nkyznj@sinac.com.

基金项目:国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-29-06);国家科技支撑计划资助项目(2013BAD02B01-5);吉林省科技支撑计划重点资助项目(20130206069NY);吉林省财政育种专项资助项目;吉林省创新工程资助项目。

收稿日期:2015-07-27

Eppendorf-PCR 仪上进行,扩增程序为:94℃预变性 4 min; 94℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 60 s,39 个循环; 72℃延伸 10 min;4℃保存。3 次重复,比较扩增效果。

表 1 25 个处理各因素及其水平组合

编号	模板	Taq 酶	引物	dNTPs	Mg ²⁺
1	0.25	0.1	0.25	0.2	0.5
2	0.25	0.2	0.50	0.4	1.0
3	0.25	0.3	0.75	0.6	1.5
4	0.25	0.4	1.00	0.8	2.0
5	0.25	0.5	1.50	1.0	2.5
6	0.50	0.1	0.50	0.6	2.0
7	0.50	0.2	0.75	0.8	2.5
8	0.50	0.3	1.00	1.0	0.5
9	0.50	0.4	1.50	0.2	1.0
10	0.50	0.5	0.25	0.4	1.5
11	1.00	0.1	0.75	1.0	1.0
12	1.00	0.2	1.00	0.2	1.5
13	1.00	0.3	1.50	0.4	2.0
14	1.00	0.4	0.25	0.6	2.5
15	1.00	0.5	0.50	0.8	0.5
16	1.50	0.1	1.00	0.4	2.5
17	1.50	0.2	1.50	0.6	0.5
18	1.50	0.3	0.25	0.8	1.0
19	1.50	0.4	0.50	1.0	1.5
20	1.50	0.5	0.75	0.2	2.0
21	2.00	0.1	1.50	0.8	1.5
22	2.00	0.2	0.25	1.0	2.0
23	2.00	0.3	0.50	0.2	2.5
24	2.00	0.4	0.75	0.4	0.5
25	2.00	0.5	1.00	0.6	1.0

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 取 3 μL PCR 产物, 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测(10 V/cm,250 min)。电泳结束后进行银染。LS 型(LED)高频医学影像观片灯上观察照相。

1.2.5 体系稳定性验证 采用优化后的体系,以山梨和“幸水”的 DNA 样品为模板,对 191 对引物进行初步筛选试验,筛选出具有差异性条带的引物进一步用于对山梨、“幸水”及山梨和“幸水”的杂交后代的扩增,3 次重复。

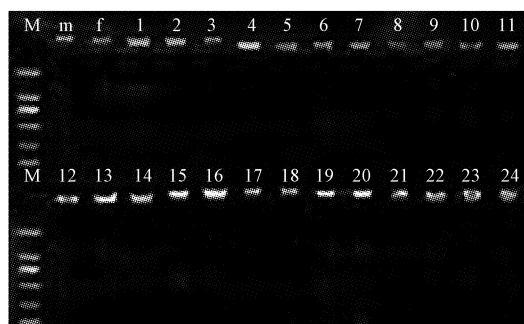
1.3 项目测定

利用 U-OO80D 紫外分光光度仪进行 DNA 的浓度和纯度测定,计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 浓度与纯度

用植物基因组试剂盒提取的所有供试材料的 DNA,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,条带清晰,说明所提取的 DNA 完整性好、无降解现象(图 1)。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.8~2.0,说明 DNA 纯度较高,符合 SSR 标记试验



注:M,Marker DL 2 000;m,山梨;f,“幸水”;1~24,山梨×“幸水”后代群体。

Note:M,Marker DL 2 000;m,*Pyrus ussuriensis* Maxim;f,‘Kosui’;1~24,part of the lines from the cross of *Pyrus ussuriensis* Maxim×‘Kosui’.

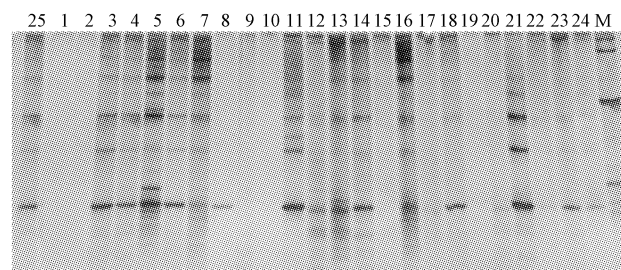
图 1 山梨、“幸水”及山梨×“幸水”杂交后代株系基因组 DNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis detection of genomic DNA of *Pyrus ussuriensis* Maxim, ‘Kosui’ and part of the lines from the cross of *Pyrus ussuriensis* Maxim×‘Kosui’

的要求。

2.2 多因素组合对 SSR-PCR 扩增的影响

SSR 标记得到的扩增条带是各因素相互之间优化的组合。按表 1 设计的 25 个处理进行 PCR 反应后,电泳结果见图 2。可以看出,除了 1、2、9、10、15、17 和 19 号组合外,其余均能扩增出产物,其中 8、18、20、23 和 24 号只扩增出了 1 条清晰的条带;12、13、16 号扩增条带较多但是较模糊;3、4、6、7、25 号条带较多较清晰,但与 5 号扩增的条带相比,主带较少;5 号扩增出来的条带较丰富且完整、清晰明亮、无非特异性扩增且没有拖尾现象,作为 SSR-PCR 的最适扩增体系,即 20 μL 反应体系中,模板 DNA 10 ng,Mg²⁺(20 mmol/L) 2.5 μL,Taq 酶 1.25 U,dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL,引物 (10 μmol/L) 1.5 μL,10×PCR buffer 2.0 μL。



注:M,Marker DL 2 000;1~25,正交设计 25 个扩增体系。

Note:M,Marker DL 2 000;1~25,25 systems about SSR-PCR orthogonal design.

图 2 SSR-PCR 正交实验设计 25 个体系扩增结果

Fig. 2 Amplified results of 25 systems about SSR-PCR orthogonal design

2.3 梨杂交后代 SSR-PCR 体系适用性、稳定性验证

2.3.1 引物筛选试验 利用优化的 SSR 扩增体系,从供试材料中选择抗寒性存在明显差异的山梨和“幸水”的 DNA 样品,对 191 对引物进行初步筛选试验,筛选出多态性引物 112 对,多态性比率为 58.3%。然后利用筛

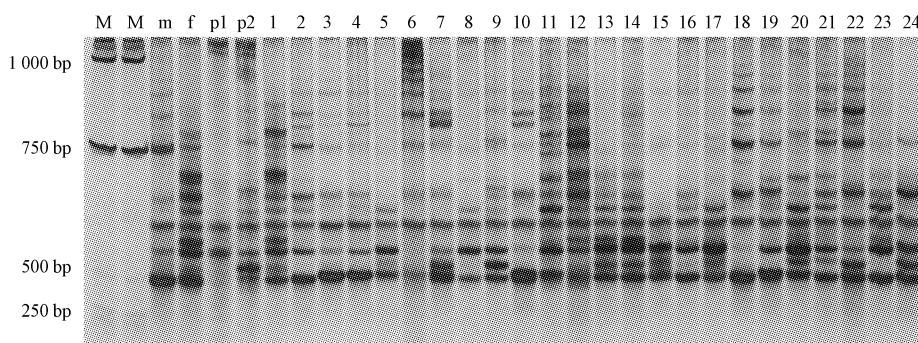
选出的多态性引物对高抗寒山梨、不抗寒“幸水”、高抗寒和不抗寒基因池进行 SSR 扩增,筛选出具有抗寒性分子标记特异性引物 6 个,所占比率为 3.12%,序列见表 2。

表 2 筛选出的引物序列

引物	正义引物(5'-3')	反义引物(5'-3')
NH029a	GAAGAAAACCAGAGCAGGGCA	CCTCCGCTCTCCACCATAT TAG
CH02e02	CTCATCAGTCTCACT GACTGTGTG	GTTTCTTAGGGTCAGGGTCGTCAGG
CHc01a,b	GCAGCTTGTGACAAGGGCTTT	TATCGTGCTACGGTGGTGGAG
CHg04b	GAGAGTAGTTGGGAGGTAAGTGC	AGAAACAACCAACAAACCTCCAC
CHm03a,b	TCTCTCCCCCTCTCCCTCTCTTG	AGTTCTGGGTTCCTACTGCTCT
NB113a	ATGAAATATGTCGTGTTGCCCTTAG	CCCTTCTCTAGCATGTTTCTCTAGAC

2.3.2 山梨×“幸水”杂交后代中的扩增结果 用优化后的 SSR-PCR 体系,利用引物 CHg04b 对山梨、“幸水”、高抗寒和不抗寒基因池及山梨×“幸水”杂交后代群体进行扩增,以验证该体系的适用性和稳定性。由图 3 可

知,采用优化后体系在山梨、“幸水”及其杂交后代群体均能有效扩增出比较稳定、清晰的 SSR 谱带。扩增片段范围在 250~1 000 bp。



注:M,Marker DL 2 000;m,山梨;f,“幸水”;p1,高抗寒基因池;p2,不抗寒基因池;1~24,山梨×“幸水”后代群体。

Note:M,Marker DL 2 000;m,*Pyrus ussuriensis* Maxim;f,“Kosui”;p1, gene pool of the high cold resistant hybrid offsprings;p2, gene pool of the low cold resistant hybrid offsprings;1-24, part of the lines from the cross of *Pyrus ussuriensis* Maxim×“Kosui”.

图 3 引物 CHg04b 对山梨、“幸水”及其杂交后代株系的 SSR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification results of *Pyrus ussuriensis* Maxim, “Kosui” and part of the lines from the cross of *Pyrus ussuriensis* Maxim×“Kosui” using primer CHg04b

3 讨论与结论

SSR 具有多态性高、重复性好且共显性等特点,是一种较为理想的分子标记技术,近年来在果树种质资源遗传多样性和基因分子标记等遗传育种领域已广泛应用。但 SSR 反应中的 DNA 模板、 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 和引物用量等的变化对整个反应体系都有很大影响。因而,确定各因素用量,建立稳定的 SSR 反应体系是 SSR 分析的前提。

传统的单因素试验优化反应体系,需要进行多次的梯度试验,过程比较繁琐,但是应用多因素联合优化的正交实验设计在减少试验规模的同时又不损失信息,并且能更快找到最优组合。

该研究发现,最适 DNA 用量为 10 ng,张琪静等^[13]

对甜樱桃的研究也得出,SSR 扩增 DNA 模板用量为 10 ng 时得到了与 25 ng 和 50 ng 相同的扩增结果,但是 10 ng 用量较其它 SSR 研究中的模板量要少^[14-16]。dNTPs 浓度与以往的研究相似,但最适 Mg^{2+} 浓度、引物用量和 *Taq* DNA 聚合酶用量分别相对于以往的研究偏高或偏低^[14-16],说明受果树种类基因型影响,不同的试验材料可能有其相应适合的反应体系。由于该研究以秋子梨试材为主,建立的反应体系是否适合其它栽培梨系统及其种间杂交后代有待于进一步研究。

该研究针对反应体系中的 DNA 模板、 Mg^{2+} 、*Taq* 酶、dNTPs 和引物等 5 个因素,在参考了前人研究中各因素用量的基础上,利用正交实验方法从 25 个体系中选出扩增条带较丰富且完整、清晰明亮、无非特异性扩增

且没有拖尾现象、背景干净的体系 5 作为 SSR 扩增的反应体系,即在 20 μL 反应体系中:模板 DNA 10 ng, Mg^{2+} (20 mmol/L) 2.5 μL , *Taq* 酶 1.25 U, dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.5 μL , 10 \times PCR buffer 2.0 μL 。并应用该优化 SSR 体系,进行了引物初步筛选试验,利用筛选出的特异性引物 CHg04b 对山梨 \times “幸水”杂交后代群体进行扩增,扩增效果较好。这为杂交后代鉴定、遗传图谱绘制、寻找与目标性状相连锁的分子标记等研究提供一定的技术参考。

参考文献

- [1] MOORE S S, SARGEANT L L, KING T J, et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species[J]. *Genomics*, 1991, 10(3):654-660.
- [2] 蒋彩虹,王元英,孙玉合,等. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展[J]. *中国烟草科学*, 2007, 28(2):1-5.
- [3] 朱英,陶刚,刘作易,等. SSR 分子标记的发展及其在动植物遗传育种中的应用[J]. *贵州农业科学*, 2006, 34(增刊):93-95.
- [4] 刘峰,东方阳,邹继军,等. 应用微卫星标记进行大豆种质多样性和遗传分析[J]. *遗传学报*, 2000, 27(7):628-633.
- [5] 郭瑞星,刘小红,荣廷昭,等. 植物 SSR 标记的发展及其在遗传育种中的应用[J]. *玉米科学*, 2005, 13(2):8-11.
- [6] ZHEBENTYAYEVA T N, REIGHARD G L, GORINA V M, et al. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106:425-444.
- [7] 曹玉芬. 梨栽培品种 SSR 标记遗传多样性研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2006.
- [8] 许靖诗,乌云塔娜,叶生品,等. 梨种质资源 SSR 引物的筛选与评价[J]. *中南林业科技大学学报*, 2012(7):80-85.
- [9] 高源,田路明,刘凤之,等. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱[J]. *园艺学报*, 2012(8):1437-1446.
- [10] 张东,舒群,滕元文,等. 中国红皮砂梨品种的 SSR 标记分析[J]. *园艺学报*, 2007(1):47-52.
- [11] 田义朝,王彩虹,贾彦利,等. 梨矮化基因 *pcDw* 的 SSR 标记定位[J]. *果树学报*, 2008, 25(3):404-407.
- [12] 毕红园. 山西梨属主要栽培品种 EST-SSR 指纹图谱的构建[D]. 太原:山西大学, 2013.
- [13] 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.
- [14] 徐兴兴. 苹果 SSR 反应体系的建立及品种资源遗传多样性分析[D]. 保定:河北农业大学, 2006.
- [15] 孙文英,张玉星,陈世昌,等. 梨 SSR 反应体系的优化[J]. *河南农业科学*, 2010(8):101-105.
- [16] 毕红园,王长彪,段永红,等. 采用正交设计法优化梨 SSR-PCR 体系[J]. *生物技术通报*, 2013, 1(5):111-115.

Establishment for SSR Reaction System of *Pyrus ussuriensis* Maxim and Its Stability Assessment

LI Honglian, WANG Qiang, YAN Xingkai, ZHANG Maojun

(Pomology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences/Scientific Observing and Experimental Station of Pomology (Jilin, Northeast Region), Ministry of Agriculture, Gongzhuling, Jilin 136100)

Abstract: Genomic DNA of young leaves of *Pyrus ussuriensis* Maxim was tested as the template, optimization experiments on some important parameters affecting SSR-PCR amplification were conducted to establish an optimum system suitable for SSR-PCR *Pyrus ussuriensis* Maxim. Orthogonal design was used to optimize SSR amplification system with five factors (including DNA template, Mg^{2+} , *Taq* polymerase, dNTPs and primer) at five levels, respectively. The results showed that, a suitable SSR-PCR reaction system was established, its total volume was 20 μL , containing 10 ng DNA template, 2.5 μL Mg^{2+} (20 mmol/L), 1.25 U *Taq* polymerase, 1.0 μL dNTPs (10 mmol/L), 1.5 μL primer (10 $\mu\text{mol/L}$) and 2 μL 10 \times PCR buffer. The reaction system was successfully applied in primer screening experiment and the amplification of the lines from *Pyrus ussuriensis* Maxim \times ‘Kosui’ using primer CHg04b, and indicated the suitability and stability of the system.

Keywords: *Pyrus ussuriensis* Maxim; SSR marker; reaction system; primer screening