

鸭梨 Hc ISSR-PCR 反应体系的优化

支 婷¹, 刘 春 琴², 崔 建 州¹, 杜 克 久¹

(1. 河北农业大学 林学院 河北 保定 071000; 2. 沧州市农林科学院 河北 沧州 061001)

摘 要:应用正交设计的方法对影响鸭梨 Hc ISSR-PCR 反应的 4 个因素(模板 DNA、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶)进行 5 个水平的优化试验,以 DPS 7.55 软件分析。结果表明:鸭梨 Hc ISSR-PCR 的最佳反应体系(20 μ L)为:模板 DNA 60 ng、引物浓度 0.4 μ mol/L、dNTPs 浓度 0.1 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 2 U。

关键词:鸭梨 Hc ISSR-PCR 反应体系; 正交设计; 优化
中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)12-0089-04

鸭梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Yali)属白梨系统,原产于河北,是古老的优质高产品种。鸭梨距今栽培历史已有千年,在长期的栽培过程中,会自发的产生新变异类型。据文献记载^[1],我国已从不少鸭梨产区筛选出优良芽变品系和优良单株,其中大果系 8 个、优质系 2 个、自花结实系 3 个、早熟系及垂枝系各 1 个。鸭梨抗梨黑星病能力弱,属高感梨黑星病品种,梨黑星病的危害常给鸭梨生产造成严重损失。从鸭梨自然突变体中选育既抗梨黑星病,又能保持鸭梨优良品质的芽变品系或单株,是目前解决鸭梨发生梨黑星病的根本措施。

鸭梨 Hc 疑似普通鸭梨芽变新品种,发现于沧州泊头市鸭梨园,经连续数年田间观测,鸭梨 Hc 高抗梨黑星病。鸭梨 Hc 外观除叶色较深外,与对照普通鸭梨无明显差异,果实口感与普通鸭梨一样。将其枝条嫁接到其它梨树,嫁接树也表现对梨黑星病抗病。为快速区分鸭梨 Hc 抗梨黑星病是可遗传的芽变还是由环境因素引起的饰变,常采用分子标记方法进行鉴定。

ISSR(inter simple sequence repeat,简单序列重复区间)分子标记技术^[2]是一种新型的微卫星类分子标记技术,它综合了其它分子标记技术的优点,能反映出比 RFLP、SSR 和 RAPD 更丰富的多态性^[3];为显性标记,具有较好的稳定性;引物退火温度较高(一般为 52~55 $^{\circ}$ C),保证了 PCR 扩增的重复性;DNA 用量少;操作简单;成本低。因此,ISSR 分子标记技术被广泛用于品种资源鉴定^[4-6]、亲缘关系分析^[7]、遗传多样性研究^[8,9]以及作为构建遗传图谱的有力工具。由于 ISSR 同样是基于 PCR 的一种标记技术,反应条件易受到各因素影响。为了能够实现 ISSR 分析结果的可靠性和重复性,通常需要对其反应体系进行优化。

第一作者简介:支婷(1984),女,在读硕士,研究方向为林木化学保护。E-mail:tingtingzhi@126.com。
责任作者:杜克久(1965),男,博士,教授,现主要从事植物基因工程方面的研究工作。E-mail:dukejiu@yahoo.com.cn。
基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD08A03-5);国家公益性行业科研专项资助项目(200803011-9);河北省林业局资助项目(0207216)。
收稿日期:2011-03-28

参考文献

[1] 《辞海》编委会. 辞海[M]. 6 版. 上海:上海辞书出版社,2009:1466.

[2] 王秀娟. 城市园林绿地规划[M]. 北京:化学工业出版社,2009.

[3] 苏平. 园林植物环境[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,2005.

[4] 马履一,王瑞辉,徐军亮. 北京市主要园林绿化植物耗水性及节水灌溉制度研究[M]. 北京:中国林业出版社,2009.

Water Maintenance of Urban Green Space in the Northern China

SUN Dong-ming¹, FU Yu-lian²

(1. Sheng-long Landscape Engineering Limited Company, Beijing 100027; 2. Mei-huan Landscape Engineering Limited Company, Beijing 100078)

Abstract: Most of northern cities are in the arid and semiarid regions, influenced by the monsoon climate, relative lack of water. The growth of urban green space needs plenty of moisture, which forms a sharp contradiction with water resource of cities. Water conservation should be the primary principles, when making water maintenance. Only based on the factors such as climate, species, growth stage to irrigation and drainage, we could ensure the circulation of green space environment in northern cities.
Key words: northern China; urban green space; water maintenance

梨 ISSR-PCR 反应体系的优化研究^[10-11] 虽有报道,但由于药品、材料、方法不尽相同,无法建立一种统一的模式。该试验旨在优化鸭梨 Hc ISSR-PCR 反应体系,为进一步对鸭梨 Hc 进行芽变品种鉴定研究提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材为鸭梨 Hc 组培苗嫩叶。于春季在沧州泊头市鸭梨园采摘枝梢,带回河北农业大学林学院进行组织培养获得。用于鸭梨 Hc 总 DNA 提取的 UNIQ-10 柱式新型植物基因组 DNA 抽提试剂盒,以及用于 ISSR-PCR 反应的 *Taq* DNA Polymerase、BM2000 DNA Marker、ISSR 引物均购自上海生物工程有限公司。dNTPs Mix 为上海普洛麦格生物产品有限公司提供。引物经初步筛选,选用 UBC822 即(TC)₈A 作为正交实验的固定引物。

1.2 试验方法

1.2.1 鸭梨 Hc 总 DNA 的提取与检测 选用 DNA 抽提试剂盒提取鸭梨 Hc 嫩叶基因组 DNA,配制 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测基因组 DNA 的大小和完整性。用核酸浓度纯度检测仪测定 DNA 浓度和纯度,稀释至 20 ng/ μ L 备用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应因素的确定 试验使用含 15 mmol/L Mg^{2+} 10 \times *Taq* PCR Buffer,所有处理采用 1 \times *Taq* PCR Buffer[1.5 mmol/L Mg^{2+}]。对影响 ISSR-PCR 反应的其余 4 个因素(模板 DNA、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶),按照 *L*₂₅(5⁴)进行四因素五水平的正交实验设计(表 1、2)。使用 ABI 2027 Thermal Cycler 进行 PCR 扩增反应,反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,52 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物用含有 0.1 μ L/mL Goldview 的 1.5% 琼脂糖凝胶在不超过 5 V/cm 电压下电泳,并在凝胶成像仪中成像。

表 1 ISSR-PCR 反应各因素水平

因素	水平(体系终浓度)				
	1	2	3	4	5
DNA 浓度/ ng \cdot (20 μ L) ⁻¹	20	40	60	80	100
引物浓度/ μ mol \cdot L ⁻¹	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
dNTPs 浓度/ mmol \cdot L ⁻¹	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
<i>Taq</i> DNA 聚合酶/ U \cdot (20 μ L) ⁻¹	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

2 结果与分析

2.1 电泳结果评分

按照表 2 正交设计的 25 个处理设 2 组重复分别进行 PCR 反应后,所得产物电泳,结果见图 1A、图 1B 所示。根据电泳结果,将 25 个处理从高到低依次打分。条带数量丰富、清晰度高、背景低的最佳产物记为

表 2 ISSR-PCR 反应的因素水平 *L*₂₅(5⁴)

编号	模板 DNA	引物	DNTPs	<i>Taq</i> DNA 聚合酶
	/ng \cdot (20 μ L) ⁻¹	/ μ mol \cdot L ⁻¹	/mmol \cdot L ⁻¹	/U \cdot (20 μ L) ⁻¹
1	20	0.2	0.1	0.5
2	20	0.3	0.15	1.0
3	20	0.4	0.2	1.5
4	20	0.5	0.25	2.0
5	20	0.6	0.3	2.5
6	40	0.2	0.15	1.5
7	40	0.3	0.2	2.0
8	40	0.4	0.25	2.5
9	40	0.5	0.3	0.5
10	40	0.6	0.1	1.0
11	60	0.2	0.2	2.5
12	60	0.3	0.25	0.5
13	60	0.4	0.3	1.0
14	60	0.5	0.1	1.5
15	60	0.6	0.15	2.0
16	80	0.2	0.25	1.0
17	80	0.3	0.3	1.5
18	80	0.4	0.1	2.0
19	80	0.5	0.15	2.5
20	80	0.6	0.2	0.5
21	100	0.2	0.3	2.0
22	100	0.3	0.1	2.5
23	100	0.4	0.15	0.5
24	100	0.5	0.2	1.0
25	100	0.6	0.25	1.5

25 分;与此相反,最差的记为 1 分。2 次重复分别独立统计,2 次重复的结果来看,各处理组合的反应均具较高的一致性。依处理次序得到的分数分别记为:(图 1A)13,17,19,15,10,5,20,16,6,4,21,2,23,25,24,7,3,22,18,9,12,14,1,11,8;(图 1B)11,17,21,16,13,12,22,18,4,9,21,2,23,25,24,5,3,20,19,8,10,15,1,6,7。

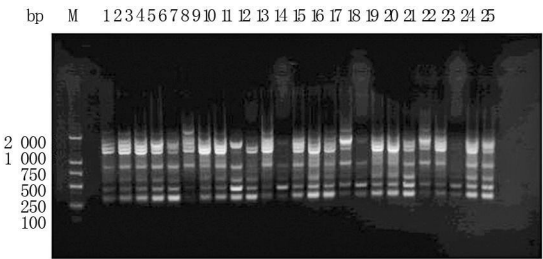


图 1A 鸭梨 Hc ISSR-PCR 产物电泳结果

注 M: Marker DL2000, 1~25 对应表 2 中的编号。下同。

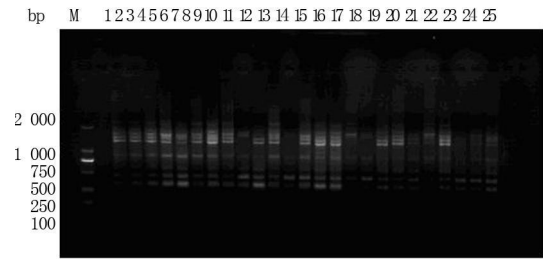


图 1B 鸭梨 Hc ISSR-PCR 产物电泳结果

2.2 各因素间对鸭梨 Hc ISSR-PCR 反应影响的差异分析

应用 DPS 7.55 数据处理软件对以上各处理及评分结果进行方差分析(表 3)。由 *F* 值可知, 引物浓度对 PCR 反应结果的影响最小, *Taq* DNA 聚合酶的用量影响最大。各因素水平变化对 ISSR-PCR 反应的影响顺序为: *Taq* DNA 聚合酶> 模板 DNA> dNTPs> 引物。由于各因素水平间的差异均达到了极显著水平, 可以进一步进行因素内的多重比较分析。

表 3 鸭梨 Hc ISSR-PCR 反应
各因素间方差分析

变异来源	方差	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模板 DNA	675.4	4	168.85	55.5123	0.0001
引物	196.4	4	49.1	16.1425	0.0001
dNTPs	328.8	4	82.2	27.0247	0.0001
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	958.8	4	239.7	78.8055	0.0001
误差	73	24	3.0417		
总和	2702				

2.3 因素内各水平对鸭梨 Hc ISSR-PCR 结果的影响

为了分析各因素的最佳反应水平, 在对各因素进行方差分析后, 继续对各因素内各个水平进行多重比较。从表 3 中 *F* 值可看出, 模板 DNA 用量在进行优化的 4 个因素中对 PCR 结果的影响处于第 2 位。在 20 μL 的体系中, 模板 DNA 40 ng 与 80 ng 水平间差异不显著, 其余任何二者组合间的差异均达到显著水平(图 2), 其中当模板 DNA 用量为 60 ng 时, 扩增的条带最清晰。因此, 确定模板 DNA 用量为 60 ng 为最佳反应水平。

引物浓度对 ISSR-PCR 结果的影响表现为: 在 20 μL 体系中, 引物浓度为 0.2、0.3、0.6 μmol/L 水平间差异不显著, 0.4 μmol/L 与 0.5 μmol/L 水平间差异也不显著, 但 0.2、0.3、0.6 μmol/L 均与 0.4、0.5 μmol/L 水平间差异达到显著水平(图 3)。虽然根据方差分析, 引物浓度对 PCR 结果的影响最小, 但依据单独对引物进行的梯度试验, 0.4 μmol/L 水平表现较好。因此, 选用 0.4 μmol/L 作为引物浓度的最佳反应水平。

dNTPs 在 0.1、0.15 与 0.2 mmol/L 水平间表现无显著性差异, 但与 0.25、0.3 mmol/L 水平间差异均达到显著。从图 4 可知, dNTPs 在 0.1 与 0.2 mmol/L 水平上效果较好, 在 0.15 mmol/L 略有下降趋势。因此, 考虑到试验成本, 选择 dNTPs 的最佳反应浓度为 0.10 mmol/L。

根据方差分析结果, 试验中 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 PCR 结果的影响最大。1 U 与 1.5 U; 2 U 与 2.5 U 水平间无明显差异, 但 0.5、1、1.5 U 均与 2、2.5 U 水平有显著差异(图 5)。当 *Taq* DNA 聚合酶浓度过低(即小于 0.5 U)时, PCR 产物信号弱, 所能提供的信息

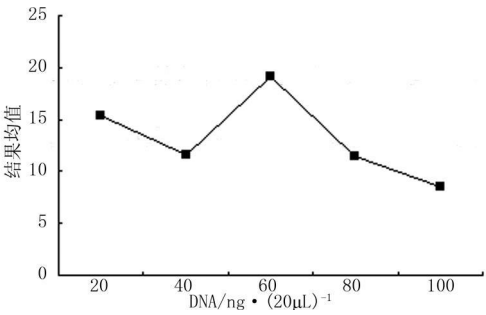


图 2 结果均值与模板 DNA 浓度关系

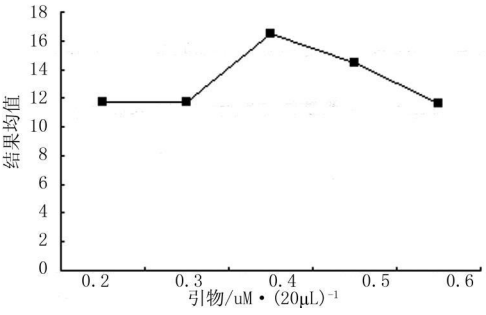


图 3 结果均值与引物浓度关系

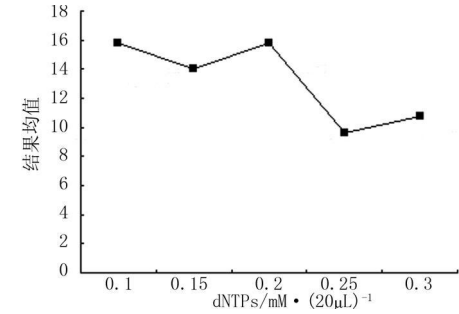


图 4 结果均值与 dNTPs 浓度关系

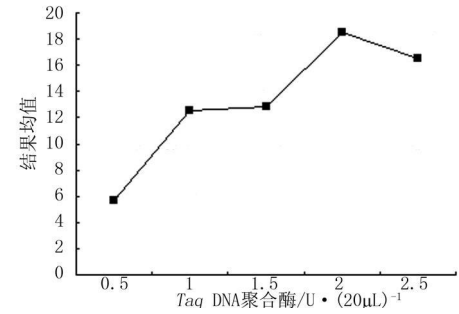


图 5 结果均值与 *Taq* DNA 聚合酶浓度关系

少; 当浓度过高(即大于 2 U)时, 扩增的特异性降低, 产生弥散片断, 使条带不清晰。因此在 20 μL 的反应体系中, *Taq* DNA 聚合酶选用 2 U 作为最佳反应水平。

3 结论与讨论

试验对影响 PCR 扩增结果的 4 个因素(模板 DNA 用量、引物浓度、dNTPs 浓度、以及 *Taq* DNA 聚

合酶)进行正交优化试验,并借助 DPS 数据处理软件分析结果,最终确立 20 μ L 鸭梨 Hc ISSR-PCR 最优反应体系为 60 ng 模板 DNA、0.4 μ mol/L 引物、0.1 mmol/L dNTPs、2 U *Taq* DNA 聚合酶。

以往对 ISSR-PCR 体系进行优化,较多采用单因素试验法。此法过程繁琐,需要进行多次梯度试验,且不能兼顾各因素间的交互作用。正交实验设计具有均衡分散、综合可比及可伸缩、效应明确等特点,既能考察各因素的交互作用,也能较快地找到最佳的水平组合^[12,13],通过一次试验即可得到最佳反应体系,不仅节省时间、降低成本,而且对结果的分析更为科学。

试验中 10 \times *Taq* PCR Buffer 含有 15 mmol/L Mg^{2+} ,故所有水平组合 Mg^{2+} 浓度均用 1.5 mmol/L。前人研究表明, Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应的结果影响较大。 Mg^{2+} 作为 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂,当 Mg^{2+} 不足时, *Taq* DNA 聚合酶的作用效率低。 Mg^{2+} 还能与 dNTPs 分子中的磷酸基团结合,影响引物与模板的结合效率、产物的特异性、退火温度等^[14]。曾艳玲等^[19]对白梨“六月酥”进行 ISSR-PCR 优化时,确定 Mg^{2+} 最佳的反应浓度为 2.0 mmol/L。依据其他学者对不同植物材料进行 ISSR-PCR 正交优化结果发现,在 20 μ L 反应体系中,通常确定 *Taq* DNA 聚合酶的用量为 1 U。由于该试验采用 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L,可能造成 Mg^{2+} 量不足,导致 *Taq* DNA 聚合酶作用效率低。因此,最终确定 *Taq* DNA 聚合酶选用 2 U/20 μ L 为最佳反应水平。

ISSR-PCR 反应对模板 DNA 用量要求范围较宽。曾艳玲^[10]、谢海运^[15]、卢莉^[16]、宁静^[17]、林萍^[18]等分别对“六月酥”梨树、水曲柳、茶树、落叶松进行 ISSR-PCR 反应体系正交设计优化时,均认为模板 DNA 用量对反应结果影响最小,模板 DNA 在 10~200 ng/20 μ L 之间扩增的结果相同。试验中模板浓度对反应结果影响不是最小,模板浓度从 20~100 ng/20 μ L 均能扩增清晰条带,说明模板浓度对反应结果影响较小。产生此结果,可能是由于反应结果评分带有主观成分,不可避免产生试验误差。因此,如果能对 ISSR-PCR

扩增结果建立客观的评价标准,将会更好地促进该方法的应用。

参考文献

- [1] 马艳芝,张玉星. 鸭梨及其变异类型的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学, 2010, 11(4): 479-482.
- [2] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [3] McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm[J]. Euphytica, 2000, 113(2): 135-144.
- [4] 张青林, 罗正荣. ISSR 及其在果树上的应用[J]. 果树学报, 2004, 21(1): 54-58.
- [5] 李洪果, 乌云塔娜, 杜金松, 等. 13 个砂梨品种 ISSR 分子鉴别[J]. 内蒙古农业大学学报, 2009, 30(4): 29-35.
- [6] 段伟, 闫文德, 乌云塔娜, 等. 14 个杏李品种的 ISSR 分析及分子鉴别[J]. 内蒙古农业大学学报, 2010, 31(2): 147-153.
- [7] 王进, 何桥, 欧毅, 等. 李种质资源 ISSR 鉴定及亲缘关系分析[J]. 果树学报 2008, 25(2): 182-187.
- [8] 徐志祥, 涂艺声, 李跃进, 等. 14 个南丰柑桔品种及品系间的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(6): 1146-1150.
- [9] 卓书斌, 黄小凤, 袁志永, 等. 台湾青枣不同品种表型差异和遗传多样性研究[J]. 现代农业科学, 2009, 12(2): 13-16.
- [10] 曾艳玲, 谭晓风, 曾晓峰. 采用正交设计方法优化梨 ISSR-PCR 反应体系[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(11): 1235-1238.
- [11] Luisa M C, Luis G, Cristina O. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination[J]. Journal of American Society Horticultural Science, 2001, 126(5): 517-522.
- [12] 汪结明, 项艳, 吴大强, 等. 杨树 ISSR 反应体系的建立及正交设计优化[J]. 核农学报, 2007, 21(5): 470-473.
- [13] 桂腾琴, 孙敏, 乔爱民, 等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系[J]. 果树学报 2009, 26(1): 108-112.
- [14] 申洁, 侯思宇, 孙朝霞, 等. 正交优化枣树 ISSR-PCR 反应体系的研究[J]. 华北农学报, 2010, 25(2): 116-120.
- [15] 谢运海, 夏德安, 姜静, 等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种, 2003, (3): 445-450.
- [16] 卢莉, 张强, 王玉花, 等. 利用正交设计优化茶树 ISSR 反应体系[J]. 经济林研究, 2010, 28(1): 14-19.
- [17] 宁静, 黄建安, 李娟, 等. 茶树 ISSR-PCR 反应体系的正交优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(4): 414-417.
- [18] 林萍, 张含国, 谢运海. 正交设计优化落叶松 ISSR-PCR 反应体系[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 34-37.

Optimization of ISSR-PCR Reaction System of *Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Yali Hc

ZHI Ting¹, LIU Chun-qin², CUI Jian-zhou¹, DU Ke-jiu¹

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Cangzhou Academy of Agriculture and Forestry Science, Cangzhou, Hebei 061001)

Abstract: The orthogonal design was used to optimize ISSR-PCR amplification system of *Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Yali Hc in four factors (DNA template, primer, dNTPs, and *Taq* DNA polymerase) at five levels respectively. The results of PCR was analyzed by software DPS 7.55, and the best level of each factor were selected. The most suitable ISSR-PCR reaction system was 60 ng DNA template, 0.4 μ mol/L primer, 0.1 mmol/L dNTPs, 2.0 U *Taq* DNA polymerase in 20 μ L reaction system.

Key words: *Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Yali Hc; ISSR-PCR reaction system; orthogonal design; optimization