

栓皮栎 ISSR 反应体系的建立

李娜, 张存旭, 崔晓燕, 蒋鸿刚, 郭乐, 刘伟

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:以栓皮栎叶片为试材,采用单因素试验设计对栓皮栎 ISSR 反应条件进行系统优化,建立了栓皮栎 ISSR 的最佳反应体系和扩增程序。结果表明:PCR 反应体系总体积为 25 μL ,其中 10 \times Buffer 2.5 μL ,30 ng 模板 DNA,1.5 U *Taq* 聚合酶,2.5 mmol/L Mg^{2+} ,0.6 $\mu\text{mol/L}$ 引物,0.3 mmol/L dNTPs;扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,51.5~59.0 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。在此条件下从 100 条 ISSR 引物中筛选出 12 条多态性好、稳定性高的引物对陕西省天然群体共 22 个栓皮栎个体的 DNA 进行扩增,共得到 166 个位点,其中 142 个为多态位点,多态位点百分率为 85.54%,*Nei* 指数为 0.2928,Shannon 信息指数为 0.4381,表明栓皮栎的遗传多样性处于较高水平。

关键词:栓皮栎;ISSR;体系优化;遗传多样性

中图分类号:S 792.189 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0093-05

栓皮栎(*Quercus variabilis* Blume.)为我国特有分布极为广泛的落叶乔木之一,是我国最主要的软木工业原料,也是重要的木材、薪炭、天麻、栲胶、食用菌生产等的资源树种和发展生物质能源的树种^[1-2],其提取物有延长肺癌、食管癌等肿瘤患者生存期、减轻其症状的功效^[3],可见栓皮栎具有较高的经济及生态价值,目前利用 ISSR 技术对栓皮栎的研究尚鲜见报道。ISSR(简单重复序列区间)技术,因其具有试验过程更为简单、快速,多态性和重复性高,所需 DNA 量少,无需知道基因组序列信息且成本较低^[4]等优点,现已广泛应用于林木遗传多样性分析、种质资源鉴定、分子标记辅助育种等领域。鉴于 ISSR 技术是一种建立在 PCR 反应基础上的分子标记技术^[5],其反应条件易受多种因素的干扰且具有物种特异性,为保证 ISSR 试验结果的稳定性和可重复性,有必要对其反应体系中的影响因素进行优化,该研究采用单因素试验设计拟构建一套适合栓皮栎的 ISSR 反应体系和扩增程序,在此反应体系下从 100 条 ISSR 通用引物中筛选出适合栓皮栎 ISSR 分析的有效引物并优化其退火温度,在此基础上,对陕西省楼观台栓皮栎天然群体的遗传多样性进行初步分析,以期为进一步利用 ISSR 技

术进行栓皮栎遗传多样性及遗传结构分析、遗传图谱构建、分子标记辅助育种等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为栓皮栎嫩叶,采自陕西省周至县楼观台的秦岭国家植物园栓皮栎天然成林,随机选取 22 株栓皮栎个体,个体之间至少间隔 30 m,采集健康植株上的嫩叶并将其放入装有硅胶的封口袋中,做好标记,带回实验室贮于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 的提取参照任耀忠^[3]的方法,用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的浓度和纯度,用超纯水将 DNA 样品浓度调至 10 ng/ μL , -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 ISSR 扩增反应条件优化 将 Martin 等^[6]的反应体系及扩增程序设定为该试验的原初反应体系和程序,PCR 反应体系总体积为 25 μL ,其中 10 \times Buffer 2.5 μL ,经初步筛选出的引物 UBC857 作为体系优化研究的固定引物,PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上以 90 V 电压进行电泳分离, GelRed 染色显带,凝胶成像系统下拍照,记录。模板 DNA 设置 10、20、30、40、50、60、70 ng 7 个梯度,依次与图 1 编号相对应, M 为 100 bp Marker; *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa) 设置 0.50、1.00、1.50、1.75、2.00、2.50 U 6 个梯度,依次与图 2 编号相对应, M 为 DL 2 000 Marker; Mg^{2+} 设置 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 5 个梯度,依次与图 3 编号相对应, M 为 DL 2 000 Marker; 引物设置 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、

第一作者简介:李娜(1988-),女,硕士研究生,现主要从事林木遗传育种科学等研究工作。E-mail:657874432@qq.com.

责任作者:张存旭(1961-),男,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事林木遗传育种科学等研究工作。

基金项目:林业公益性行业专项资助项目(21004011);西北农林科技大学唐仲英育种基金资助项目。

收稿日期:2014-01-16

1.0 $\mu\text{mol/L}$ 6 个梯度,依次与图 4 编号相对应,M 为 DL 2 000 Marker;dNTPs 设置 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mmol/L 7 个梯度,依次与图 5 编号相对应,M 为 DL 2 000 Marker;循环次数设置 25、30、32、35、37、39、41 次 7 个梯度,依次与图 6 编号相对应,M 为 100 bp Marker。采用梯度 PCR 模式,以 UBC-857 为例,确定其最佳退火温度,根据引物 T_m 值设定温度范围 51~59℃,PCR 仪自动产生 8 个温度梯度:51.0、51.5、52.5、53.9、55.8、57.4、58.4、59.0℃,依次与图 7 编号相对应,M 为 DL 2 000 Marker。

1.3 数据分析

用 DL 2 000 Marker(TaKaRa)做对照,以凝胶相同迁移位置上稳定出现的谱带为统计对象,有带的赋值为“1”,无带的赋值为“0”,在 Excel 表格中形成“0、1”矩阵,利用 POPGENE 1.32 软件计算一些重要的遗传多样性参数如多态位点百分率(P)、Shannon 信息指数(I)和 Nei 指数(h)。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 含量优化

由图 1 可知,当 DNA 用量为 10、20 ng 时,扩增出的条带黯淡,当用量为 30~70 ng 时,扩增出数量、清晰度大致相同的条带,说明栓皮栎 ISSR 反应对模板 DNA 用量不敏感,从节约材料考虑,模板最适用量为 30 ng。

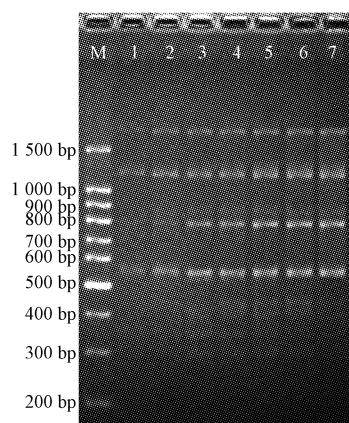


图 1 模板 DNA 用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 1 Effect of template DNA content on ISSR product

2.2 Taq DNA 聚合酶用量优化

由图 2 可知,当酶用量过低时(0.05 U),无条带产生,当酶用量为 1.00 U 时,扩增谱带黯淡,增至 1.50、1.75 U 时,扩增谱带清晰、明亮且扩增效果无明显差别,而当酶用量过高为 2.00、2.50 U 时,出现弥散带,背景加深,模糊不清,考虑到经济因素,选较低用量 1.50 U。

2.3 Mg^{2+} 浓度优化

由图 3 可知, Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L 时,无扩增产物, Mg^{2+} 浓度为 1.5、2.0 mmol/L 时,虽有扩增,但扩

增效率低,产生条带数量少,当 Mg^{2+} 浓度过高增至 3.0 mmol/L 时,扩增特异性减弱,背景加深,条带模糊弥散,而当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时,条带明亮清晰,效果最佳。

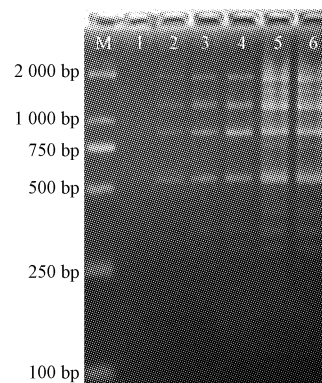


图 2 Taq DNA 聚合酶用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 2 Effect of Taq DNA polymerase content on ISSR product

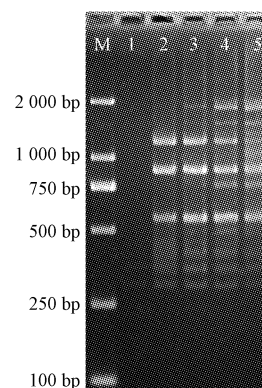


图 3 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 3 Effect of Mg^{2+} concentration on ISSR product

2.4 引物浓度优化

由图 4 可知,引物浓度在 0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ 之间时,扩增不完全,谱带数量少,当引物浓度增至 0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,非特异性条带增加,而当引物浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时,谱带最清晰,扩增效率最高。

2.5 dNTPs 浓度优化

由图 5 可知,dNTP 浓度过低时,完全不能扩增出条带,当浓度为 0.25 mmol/L 时,无法扩增出全部条带,条带数目较少,模糊不清,当 dNTP 浓度过高为 0.35、0.40 mmol/L 时,扩增条带数并未增加,反而明显减少,趋于弱化,而当浓度为 0.30 mmol/L 时,条带最多最亮。

2.6 循环次数优化

由图 6 可知,25~41 次循环均有扩增产物,但 25~32 次循环时,扩增谱带较弱且多态性低,而 35~41 次循环时,扩增条带清晰可辨,强弱合适且扩增效果大致相

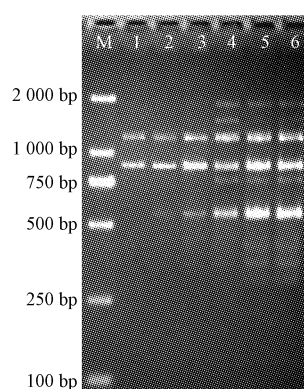


图4 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 4 Effect of primer concentration on ISSR product

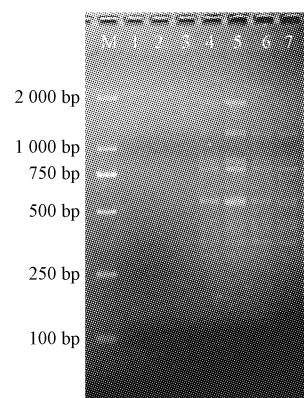


图5 dNTPs 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 5 Effect of dNTPs concentration on ISSR product

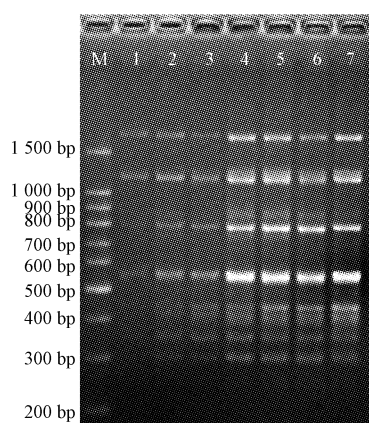


图6 循环次数对 ISSR 扩增的影响

Fig. 6 Effect of cycle number on ISSR product

同,表明在 35 次循环处已达到饱和状态,为节约时间、减少非特异性扩增的机会,故选择 35 次循环。

2.7 退火温度优化

由图 7 可知,退火温度对栓皮栎 ISSR 扩增效果有明显影响,当退火温度为 51.0、51.5℃时,出现非特异性条带且主带不够明亮,当退火温度为 53.9~58.4℃时,

部分扩增条带消失,当退火温度过高为 59.0℃时,甚至无条带,而当退火温度为 52.5℃时,谱带最清晰,多态性最好。

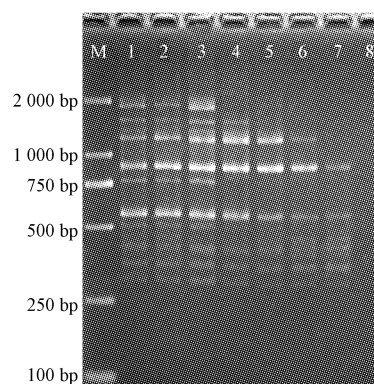


图7 退火温度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 7 Effect of annealing temperature on ISSR product

2.8 栓皮栎天然群体遗传多样性初步研究

根据已建立的栓皮栎 ISSR 反应体系和扩增程序,用 6 个不同的栓皮栎 DNA 模板经初筛、复筛从 100 条 ISSR 引物(北京奥科鼎盛生物科技公司合成)中筛选出 12 条多态性高、稳定性好的引物,同时采用 2.7 的优化方法,优化这 12 条引物的退火温度,结果发现引物不同,其最佳退火温度不同,筛选出的引物及各自最适退火温度见表 1。

表1 筛选出的有效引物及其最佳退火温度

Table 1 Screening of effective primers and their optimum annealing temperatures

引物 Primers	序列 Sequence	退火温度 Annealing temperature/℃	引物 Primers	序列 Sequence	退火温度 Annealing temperature/℃
UBC-807	(AG)8T	52.5	UBC-840	(GA)8YT	52.5
UBC-808	(AG)8C	53.9	UBC-841	(GA)8YC	52.5
UBC-811	(GA)8C	53.9	UBC-857	(AC)8YG	52.5
UBC-812	(GA)8A	51.5	UBC-862	(AGC) ₆	59.0
UBC-826	(AC)8C	53.9	UBC-880	(GGAGA) ₃	53.9
UBC-834	(AG)8YT	52.5	UBC-881	(GGGGT) ₃	55.8

用这 12 条引物对分布在陕西省周至县楼观台的栓皮栎天然群体共 22 个个体的 DNA 进行 ISSR 扩增,共扩增出 166 个 DNA 片段,分子量为 150~2 000 bp,其中多态位点为 142 个,12 条引物的扩增条带数在 7~18 条之间,平均 13 条,扩增条带数最少的引物是 UBC862,仅 7 条,扩增条带数最多的引物是 UBC880 和 UBC881,达到 18 条,引物不同,扩增效果不同,产生多态带比例最低的引物是 UBC808,多态带比率为 63.63%,产生多态带比例最高的引物是 UBC862,多态带比率为 100%,经 POPGENE 1.32 软件分析,多态位点百分率为 85.54%,Nei 指数为 0.2928,Shannon 信息指数为 0.4381,表明栓皮栎的遗传多样性处于较高水平。

3 结论与讨论

通过单因素试验设计建立了栓皮栎 ISSR 的最佳反应体系和扩增程序,最佳反应体系:PCR 反应体系总体积为 25 μL ,其中 10 \times Buffer 2.5 μL ,30 ng 模板 DNA,1.5 U *Taq* 酶,2.5 mmol/L Mg^{2+} ,0.6 $\mu\text{mol/L}$ 引物,0.3 mmol/L dNTPs;最佳扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,51.5~59.0 $^{\circ}\text{C}$ (退火温度随引物不同而设定)退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。以此条件利用筛选出的 12 条有效引物对陕西省栓皮栎天然群体 DNA 模板进行 ISSR 扩增,共得到 166 个位点,其中 142 个为多态位点,多态位点百分率为 85.54%,*Nei* 指数为 0.2928,Shannon 信息指数为 0.4381,表明栓皮栎天然居群的遗传多样性处于较高水平,这可能与其自然分布广、异交率高、风媒授粉、结实性高、生命周期长并处于演替末期等特性^[1] 有关,总体而言,栎属植物是遗传多样性相对较高的树种。

ISSR-PCR 扩增效率涉及诸多因素,是多个因子综合作用的结果,ISSR 扩增对模板 DNA 浓度的要求并不严格,但模板浓度过低,分子碰撞机率低,没有扩增产物或不稳定,模板浓度过高,会增加反应体系中抑制反应的成分^[7],出现非特异性扩增即非目标条带,因此在有效范围内应选择低浓度的模板;*Taq* 酶在 PCR 反应中起着关键作用,酶用量过少,会导致 PCR 扩增量的不足甚至不能扩增^[8],酶用量过多,不仅增加成本,还会引起非特异性扩增,条带弥散,使得背景加深,造成假阳性^[9],对于大多数 ISSR 体系优化研究结果表明 *Taq* 酶的用量为 0.5~2.0 U,这与该研究结果 1.5 U 一致; Mg^{2+} 是 *Taq* 酶的激活剂,通过调节 *Taq* 酶的活性影响 ISSR 扩增, Mg^{2+} 浓度过低,对 *Taq* 酶的活化不够,会降低扩增效率,甚至扩增不出条带,反之,高浓度的 Mg^{2+} 可以提高 *Taq* 酶的活性,但所催化的非特异性扩增产物会增多,降低扩增的忠实性^[10];引物浓度对 PCR 的带型产生明显影响,浓度过低,不能进行有效扩增,扩增不完全,浓度过高会增加引物二聚体形成的几率,引起碱基错配,导致条带弥散、不清晰^[6];dNTPs 作为 ISSR-PCR 反应的原料,参与新链 DNA 的合成,其浓度的变化对扩增条带的数量和强弱影响较大^[8],dNTPs 浓度过低,则产率降低,偶然性大,产物单链化且不稳定,甚至无扩增产物^[10],而高浓度的 dNTPs 易产生聚合酶错误掺入,同时螯合游离的 Mg^{2+} ,导致 Mg^{2+} 浓度降低^[11],因而 dNTPs 浓度过高时,扩增条带反而明显减少,这与该研究结果

一致。ISSR 扩增程序中,循环次数与退火温度是关键因素,循环次数决定扩增产量,循环次数太少,扩增谱带弱,多态性低^[12],次数过多,达到反应平台后,循环不会使产物明显增加,反而会出现非特异性条带或涂带现象^[10],因而在有效范围内应选择较少的循环次数;退火温度对 ISSR 扩增效果有较大影响,不同的引物和试验材料,其最佳退火温度不同,通常较低的退火温度会产生一定的错误扩增,产物特异性差,电泳条带较弱、不稳定,而退火温度过高时,条带数量明显减少,甚至可能导致无扩增产物^[12]。

目前,ISSR 反应体系的建立大多采用正交设计、单因素设计或二者相结合,也偶见均匀设计和单因素两循环试验设计,单因素设计可以比较系统、精细、直观地研究 ISSR 反应体系中各主要因子的影响,应用最广泛,该研究通过单因素试验设计对栓皮栎 ISSR 反应条件进行系统优化,建立了栓皮栎 ISSR 的最佳反应体系和扩增程序,试验过程中,引物的筛选及栓皮栎天然群体遗传多样性的初步研究等各环节的效果检测表明所建立的反应体系稳定、可靠,适合栓皮栎 ISSR 分析。

参考文献

- [1] 李军民,丁小飞,陈红林,等. 长阳栓皮栎天然群体遗传多样性的等位酶分析[J]. 湖北林业科技,2012,173(1):3-4.
- [2] 周建云,林军,何景峰,等. 栓皮栎研究进展与未来展望[J]. 西北林学院学报,2010,25(3):43-49.
- [3] 任耀忠. 栓皮栎 4 个不同类型遗传测定及评价[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2009.
- [4] 朱岩芳,祝水金,李永平,等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用[J]. 种子,2010,29(2):55-59.
- [5] 张永夏,刘晓,黎科,等. 珍稀植物杨叶肖槿 ISSR 体系建立及检测[J]. 西北植物学报,2012,32(4):829-834.
- [6] Martin J P, Sanchez-Yelamo M D. Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers[J]. Theoretical and Applied Genetics,2000,101(8):1234-1241.
- [7] 郑道君,谢良商,曾建华,等. 海南龙血树 ISSR-PCR 反应体系建立与有效引物筛选[J]. 热带亚热带植物学报,2011,19(2):177-183.
- [8] 黎丽倩,李妮亚,刘强,等. 假臭草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 西北林学院学报,2013,28(2):83-89.
- [9] 任耀忠,张文辉,刘莉丽,等. 栓皮栎 RAPD 反应条件优化研究[J]. 西北林学院学报,2009,24(2):55-59.
- [10] 王东娜,牟长城,冯富娟,胡桃楸. ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 实验室研究与探索,2010,29(11):18-22.
- [11] 杨红花,秦宏伟,王素云. 杏 ISSR 反应体系的建立[J]. 中国农学通报,2010,26(21):218-222.
- [12] 李房英,黄彦晶,吴少华,等. 三角梅 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 生物技术通报,2010(7):143-145.

Establishment of ISSR Reaction System in *Quercus variabilis*

LI Na,ZHANG Cun-xu,CUI Xiao-yan,JIANG Hong-gang,GUO Le,LIU Wei

(College of Forestry,Northwest Agricultural and Forestry University,Yangling,Shaanxi 712100)

不同 *hp* 基因类型番茄中番茄红素与主要品质性状的差异及相关分析

李文枫, 李景富, 许向阳

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以3种含高色素 *hp* 基因类型的7个突变体番茄为试材,采用随机区组设计,研究了不同 *hp* 番茄果实中番茄红素含量差异及与其它主要品质指标的相关性,以期番茄果实中番茄红素性状的改良提供优良的基因供体和理论依据。结果表明:不同 *hp* 突变体番茄果实中番茄红素含量存在显著和极显著差异,总体趋势表现为 $hp2 > hp1 > hp3 >$ 对照(非 *hp* 基因突变体),其番茄红素含量平均值依次为 153.3、123.8、110.3、103.0 mg/kg;相关分析表明,不同 *hp* 基因突变体番茄果实中番茄红素含量与可溶性蛋白质含量、维生素 C 含量、可溶性总糖含量和糖酸比的相关性均未达到显著水平,但具有一定的正向相关性,即糖酸比 $>$ 维生素 C 含量 $>$ 可溶性蛋白质含量 $=$ 可溶性总糖含量。

关键词:番茄;番茄红素;高色素(*hp*)基因;相关分析

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0097-05

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)是世界上重要的蔬菜作物之一,消费者和商家对番茄的商品性要求越来越高,尤其在大型超市中消费者和商家更青睐色泽红润、口感鲜美且货架期长的番茄。番茄果实为番茄红素提取的主要原材料,番茄红素是一种脂溶性天然色素,可使番茄成熟果实表现为红色果实。番茄红素在防癌

抗癌^[1-3]、预防心血管疾病^[4]、提高免疫功能^[5]和延缓衰老^[6]等方面具有重要的生理功能,目前番茄红素已成为国际上功能性食品成分研究中的热点之一,而我国对其相关研究还处于起步阶段。

在含高色素 *hp* 基因的番茄中含有丰富的番茄红素。高色素(high pigment)基因简称 *hp* 基因,包含 *hp1*、*hp2*、*hp3*、*hp2ⁱ*等。近年来多数研究者已经证实,*hp* 基因具有转红果实中总类胡萝卜素含量提高的作用,幅度在 20%~40%^[7-9],进而促进果实中番茄红素(lycopene)含量增加。其中 *hp1* 和 *hp2* 分别被定位在第 2 和第 1 染色体上^[10-11],并已对 *hp1* 和 *hp2* 基因进行了相关的分子标记辅助选择的育种研究^[12-13]。*hp3* 基因为通过 EMS 法突变玉米黄质环氧化酶基因(*Zep*)而获得^[9],该突变

第一作者简介:李文枫(1982-),女,博士,研究方向为番茄种质资源及分子生物技术。E-mail:lwfangel@163.com.

责任作者:李景富(1943-),男,教授,博士生导师,研究方向为番茄种质资源的研究和利用。E-mail:Lijf_2005@126.com.

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD02B02)。

收稿日期:2014-03-11

Abstract: ISSR reaction conditions of *Quercus variabilis* were optimized systematically via single-factor experiment by using the tender leaves of *Quercus variabilis* as test materials, resulting in establishment of optimal ISSR reaction system and thermal cycling conditions of *Quercus variabilis*. The results showed that the optimal ISSR reaction system included a total volume 25 μ L containing 2.5 μ L 10 \times Buffer, 30 ng template DNA, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.6 μ mol/L primer, 0.3 mmol/L dNTPs. Thermal cycling conditions were as follows: denaturation 1 min at 94 $^{\circ}C$; 35 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}C$, 60 s at 51.5~59.0 $^{\circ}C$, 2 min at 72 $^{\circ}C$; and a final extension of 5 min at 72 $^{\circ}C$ at the end of the amplification. Based on the optimized reaction system, 12 primers with superior stability and polymorphism were selected from 100 ISSR primers. 166 bands were amplified in 22 individuals of the natural population in Shaanxi Province, among which 142 were polymorphic loci, the percentage of which was 85.54%, Nei's index 0.2928 and Shannon's information index was 0.4381, indicating the relatively higher genetic diversity within population of *Quercus variabilis*.

Key words: *Quercus variabilis*; ISSR; system optimization; genetic diversity