

青海地方核桃 ISSR-PCR 反应体系建立及优化

刘宝尧^{1,2}, 刘小利², 魏海斌², 顾文毅²

(1. 青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016; 2. 青海省林业科学研究所, 青海高原林木遗传育种实验室, 青海 西宁 810016)

摘 要:以青海地方核桃嫩叶为试材, 采用正交设计对 ISSR-PCR 反应体系中主要影响因子进行了优化, 以建立反应的最佳条件。结果表明: 青海地方核桃 20 μL ISSR-PCR 最佳反应体系为 0.45 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP、0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物、1.75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 、0.75 U *Taq* 酶和 80 ng DNA。

关键词:青海; 地方核桃; ISSR-PCR

中图分类号:S 664.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)23-0091-06

核桃(*Juglans regia* L.) 属胡桃科胡桃属多年生落叶乔木, 又称胡桃, 雌雄同株异花, 雌雄异熟, 与扁桃、腰果、榛子并称为世界四大干果^[1], 种仁含丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物及矿质元素等多种人体所需物质, 是一种综合开发利用价值很高的干果及木本油料树种^[2], 在实现国家粮油安全和新能源战略中居重要地位^[3]。同时, 核桃树在荒山绿化、水土保持及营造特种用材林方面也属优质树种。青海省是高原核桃产区之一, 具有悠久的核桃栽培历史, 由于核桃遗传变异程度高, 加之青海高原得天独厚的地理条件优势, 经过历年世代经营, 创造出了较为丰富的核桃品种资源^[4], 使得分布在青海省的资源成为了我国, 乃至世界核桃的高原种质资源基因库, 可为开展核桃种质资源创新提供重要的育种材料^[5]。

ISSR(inter-simple sequence repeat)分子标记技术于 1994 年由加拿大蒙特利尔大学 ZIETKIEWICZ 等^[6]创建的一种显性标记, 是从微卫星技术基础上发展而来, 它不需要预先获知研究对象的序列信息, 具有稳定可靠、重复性好、多态性丰富且操作方便等特点, 被广泛应用于多种植物种质资源的收集与鉴定、遗传多样性与亲缘关系及基因定位等方面^[7-11], 目前, 已在青檀^[12]、油茶^[13]、红楠^[14]、芒果^[15]等多种植物材料中成功应用。

由于 ISSR 标记是一种基于 PCR 的分子技术, 反应体系受到多种影响因素的干扰, 为了保证反应结果重复性好、可靠性高, 需在试验前对反应体系进行优化。ISSR-PCR 反应体系优化的方法主要有单因子试验和正交设计, 目前, 有关核桃资源 ISSR-PCR 最佳反应体系的优化已有大量报道, 但针对青海地方核桃 ISSR-PCR 最佳反应体系建立与优化的研究相对较少, 现采用正交设计方法确定反应体系的最佳组合, 建立青海地方核桃 ISSR-PCR 最佳反应体系, 以期为后续青海地方核桃遗传多样性研究奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验样本选自青海省民和县、贵德县、乐都区、尖扎县、化隆县与循化县共 6 个核桃分布区, 摘取适量健康干净的嫩叶放置于塑料自封袋中用硅胶干燥保存, 带回实验室后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

植物基因组 DNA 提取试剂盒、*Taq* 酶、100 bp Marker(天根生化有限公司), DL 2 000 Marker(TaKaRa 公司), ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia)公开的序列, 由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 仪(Mastercycler nexus gradient Eppendorf), 凝胶成像系统(WD-9413C), 电泳仪(DYY-12 北京市六一仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与检测 核桃基因组 DNA 采用天根试剂盒提取。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行完整性检测, 并检测浓度及 OD 值, 用 ddH_2O 将 DNA 统一稀释到 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的优化 采用 $\text{L}_{16}(4^5)$ 正交实验设计, 对 PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTP、引物、

第一作者简介:刘宝尧(1991-), 男, 青海平安人, 硕士, 研究方向为植物资源保护与利用。E-mail:liubayao681@126.com

责任作者:刘小利(1968-), 女, 陕西渭南人, 本科, 研究员, 现主要从事经济林等研究工作。E-mail:xiaoli2408@sohu.com

基金项目:青海省自然科学基金资助项目(2013-Z-903); 青海省科技促进新农村资助项目(2013-N-509); 青海省农业科技成果转化和推广计划资助项目(2012-N-509)。

收稿日期:2016-08-19

*Taq*酶、模板 DNA 进行 5 因素 4 水平优化(表 1)。20 μL 体系按照表 1 进行配置,每处理均加入 2 μL 10 \times *Taq* buffer(Mg^{2+} free),其余用 ddH₂O 补足,每处理 2 次重复。引物为 UBC835,引物序列:5'-AG AG AG AG AG AG AG AG AG YC-3'。PCR 扩增反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 55 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应

结束后,取 8 μL PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶中 3~5 V $\cdot\text{cm}^{-1}$ 恒压电泳,最后用凝胶成像系统观察并拍照。通过观察分析,参照何正文等^[16]的方法对 16 个处理结果从高到低依次打分,扩增结果条带数量丰富、亮度高、背景低的组合记为 16 分,反之,最差为 1 分。分数越高,表示敏感性、特异性越好,所对应的反应条件扩增效果越好。

表 1 ISSR-PCR 反应的因素水平 $L_9(4^5)$ 正交实验设计

Table 1 $L_9(4^5)$ orthogonal design for the factor levels of ISSR-PCR reaction

编号 No.	因素 Factor					结果 Result	
	dNTP 浓度 dNTP concentration/(mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)	引物浓度 Primer concentration/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} concentration/(mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> 酶浓度 <i>Taq</i> polymerase concentration/U	DNA /ng	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2
1	0.15	0.5	1.00	0.50	40	7	7
2	0.15	0.8	1.25	0.75	60	6	5
3	0.15	1.2	1.50	1.00	80	3	3
4	0.15	1.5	1.75	1.25	100	4	4
5	0.25	0.5	1.25	1.00	100	13	12
6	0.25	0.8	1.00	1.25	80	12	11
7	0.25	1.2	1.75	0.50	60	8	8
8	0.25	1.5	1.50	0.75	40	9	10
9	0.35	0.5	1.50	1.25	60	15	14
10	0.35	0.8	1.75	1.00	40	14	15
11	0.35	1.2	1.00	0.75	100	11	13
12	0.35	1.5	1.25	0.50	80	10	9
13	0.45	0.5	1.75	0.75	80	16	16
14	0.45	0.8	1.50	0.50	100	2	6
15	0.45	1.2	1.25	1.25	40	5	1
16	0.45	1.5	1.00	1.00	60	1	2

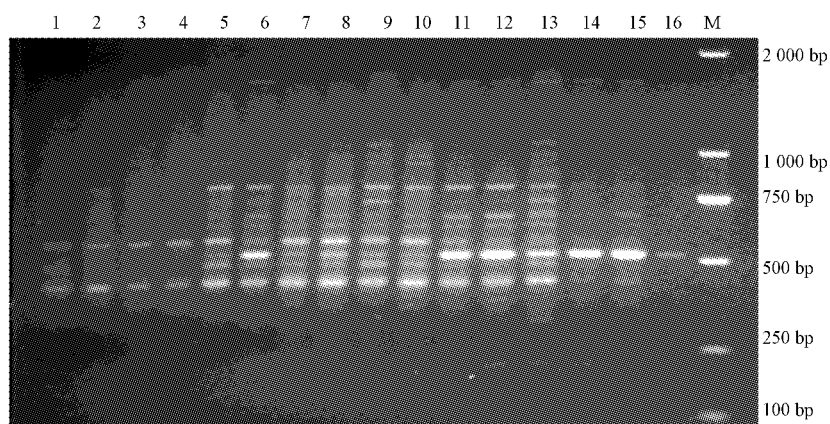
1.2.3 ISSR-PCR 体系稳定性验证 用正交实验设计所得的最优反应体系对青海地方核桃不同个体进行 ISSR-PCR 扩增,检测扩增体系的稳定可靠性。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 正交实验

根据 $L_9(4^5)$ 正交设计的 ISSR-PCR 电泳结果如图 1

所示。16 个处理评分结果如表 1 所示。由图 1 可知,组合 9、10 和 13 的条带数量丰富、清晰、背景较低,扩增结果最佳,这些组合的 dNTP 和 Mg^{2+} 浓度较高。组合 5、6、7、8、11、12 的扩增效果次之,都有较清晰的条带,而剩余组合产生条带数量均少。结合图 1 和表 1 评分结果可得,16 个处理中 13 号处理结果最好,16 号处理结果最不理想。



注:编号 1~16 代表表 1 中处理组合,M-DL 2 000 Marker。

Note:1~16 represent the treatments in Table 1,M-DL 2 000 Marker.

图 1 ISSR-PCR 正交实验结果

Fig. 1 Electrophoresis products of ISSR-PCR orthogonal design

根据评分结果计算出每一因素在同一水平下 2 个重复的试验值之和 T , 相应数据的平均值 X 、极差 R (表 2)。 X 值表示影响因素各水平对反应体系的影响程度, 其值越大, 表明反应效果越好, 则该值所对应的水平即为该因素的最佳浓度。由表 2 可知, 反应体系中影响扩增反应的 5 个因素最佳水平: dNTP 以 T3 ($0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 较好, 引物以 T1 ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 较好, Taq 酶以 T2 (0.75 U) 较好, Mg^{2+} 浓度以 T4 ($1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 较好, DNA 以 T3 (80 ng) 较好。所得结果并未出现在正交设计表中, 但除了 dNTP 之外, 其它因素的浓度均与 13 号处理相符, 因此, 可确定最佳反应组合为 13 号。

R 值的大小表示该因子对试验结果影响的程度, 其值越大, 影响越显著, 相反, 影响越小。通过表 2 可知, 5 个因素对 ISSR-PCR 反应影响强弱的顺序依次为 dNTP、引物、 Taq 酶、 Mg^{2+} 浓度和模板 DNA。

表 2 正交实验设计直观分析

Table 2 Intuitive analysis of orthogonal design

结果 Result	dNTP	引物 Primer	镁离子 Mg^{2+}	Taq	DNA
T1	39.000	100.000	64.000	57.000	68.000
T2	83.000	71.000	61.000	86.000	59.000
T3	101.000	52.000	62.000	63.000	80.000
T4	49.000	49.000	85.000	66.000	65.000
X1	4.875	12.500	8.000	7.125	8.500
X2	10.375	8.875	7.625	10.750	7.375
X3	12.625	6.500	7.750	7.875	10.000
X4	6.125	6.125	10.625	8.250	8.125
R	7.750	6.375	3.000	3.625	2.625

2.2 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 体系的影响

PCR 反应过程中, dNTP 作为原料之一, 其浓度对反应的结果至关重要。浓度过高会导致反应链延伸时, 核苷酸错误掺入, 浓度过低会影响扩增片段的生成效率, 导致产出效率低下^[17]。从图 2 的曲线趋势可以看出, 当 dNTP 浓度为 $0.15 \sim 0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 评分会随着其浓度的增大而上升, 当浓度大于 $0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 评分结果呈逐渐下降趋势, 当 dNTP

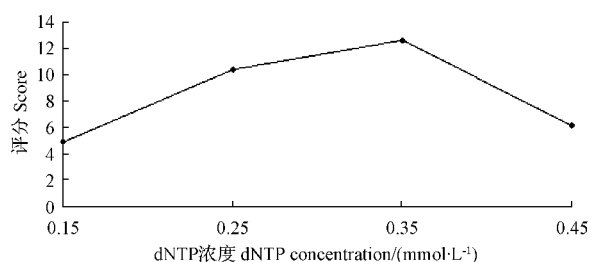


图 2 dNTP 对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 2 Effect of dNTP concentration on ISSR-PCR amplification

浓度为 $0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 评分效果最好。因此, 反应体系中 dNTP 浓度为 $0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 引物浓度对 ISSR-PCR 体系的影响

引物是 PCR 扩增产生特异性反应的关键, 引物与模板 DNA 间的互补结合程度, 决定着 PCR 扩增产物的特异性, 当引物的浓度过高时, 扩增条带模糊, 非特异性条带增多, 导致错配率增加, 也会提高引物二聚体形成的概率; 当引物的浓度过低时, 引物与模板间的结合位点减少, 从而导致扩增产量低下。由图 3 可知, 当引物浓度在 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增效果最好, 当引物浓度大于 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 评分会随着引物浓度的升高而下降, 扩增效果均不理想, 因此, 引物浓度为 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 PCR 扩增产生特异性的效果最佳。

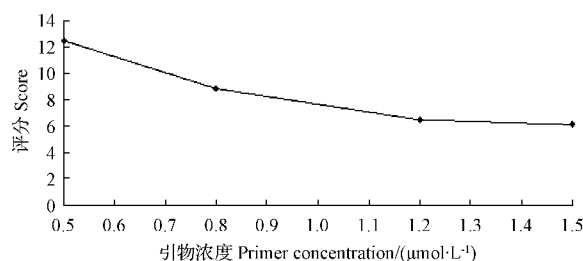


图 3 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 3 Effect of primer concentration on ISSR-PCR amplification

2.4 Taq 酶浓度对 ISSR-PCR 体系的影响

扩增反应体系中, 扩增反应的又一关键因素是 Taq 酶, Taq 酶的浓度, 决定扩增反应是否能够成功。 Taq 酶的浓度过高, 容易产生非特异性扩增产物, 加大工作量, 也会增加试验成本, 浓度过低会导致扩增条带过少, 甚至无产物生成。图 4 的评分趋势显示, 4 个 Taq 酶浓度水平中, 0.75 U 试验结果最好, 其余 3 个浓度扩增效果均不理想, 因此, 扩增反应体系中 Taq 酶的浓度为 0.75 U 时有最佳效果。

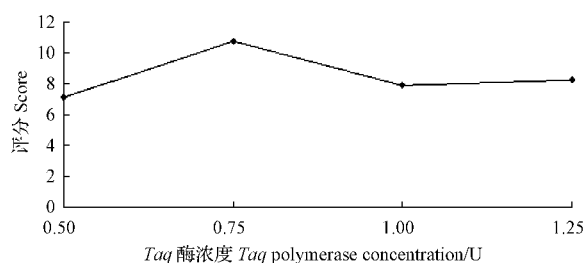


图 4 Taq 酶浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 4 Effect of Taq polymerase concentration on ISSR-PCR amplification

2.5 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 体系的影响

Mg^{2+} 的浓度在扩增反应体系中, 不仅会影响 Taq 酶的活性和产物的特异性, 还能影响引物的退火、模板的

解链温度及引物二聚体的形成等^[18-20]。其中,适当浓度的 Mg^{2+} 有助于激活 *Taq* 酶的活性,浓度过高则反之^[21]。由图 5 可知,随着浓度的增大,扩增效果也随之升高,当浓度分别为 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,反应效果差异不大,评分基本持平。试验结果表明,当浓度为 $1.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,在所设浓度范围中评分最高。

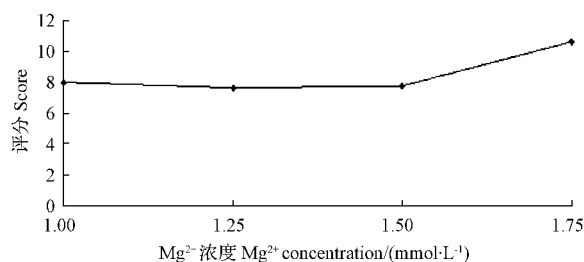


图 5 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 5 Effect of Mg^{2+} concentration on ISSR-PCR amplification

2.6 DNA 浓度对 ISSR-PCR 体系的影响

模板 DNA 也是影响 PCR 扩增反应的因素之一,其用量适宜范围较为广泛。当模板用量越大时,产物条带随之越亮。由图 6 可知,当 DNA 用量在 $40 \sim 100 \text{ ng}$ 时,

PCR 扩增效果变化差别不太大,均能得到良好结果,因此,该试验确定 DNA 用量为 80 ng 。

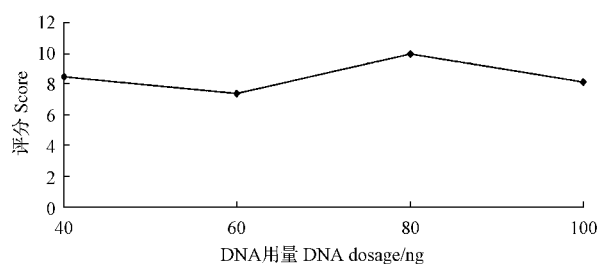
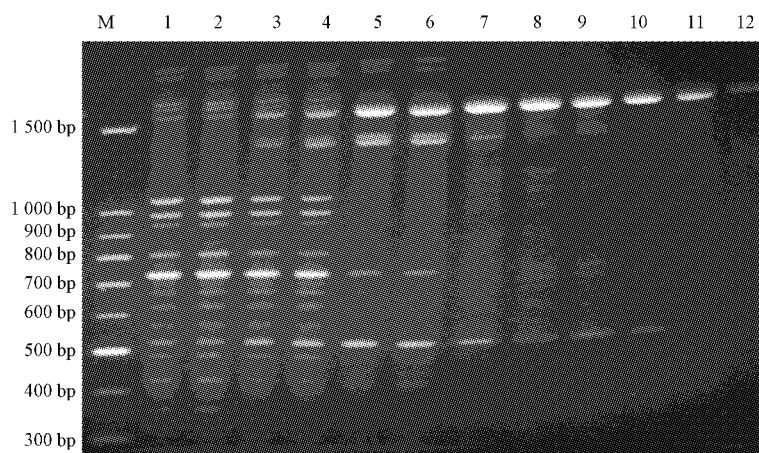


图 6 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 6 Effect of template DNA dosage on ISSR-PCR amplification

2.7 退火温度对 ISSR-PCR 扩增的影响

ISSR-PCR 退火温度可根据引物相对应的 T_m 值在其附近探索,该试验以引物 UBC835 为例,温度扩增为 $50.0 \sim 60.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以确定其最佳退火温度。由图 7 可知,当温度较低时,扩增特异性较差且背景较深。在 4 号泳道即 $51.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时背景较低,条带清晰,扩增效果最佳。但超过 $51.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,随着温度的上升,条带数量明显减少,扩增谱带丢失严重,结果变差。因此,确定引物 UBC835 的最佳退火温度为 $51.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。



注:1~12 对应退火温度为 $50.0, 50.3, 50.9, 51.8, 53.1, 54.4, 55.6, 56.9, 58.2, 59.1, 59.7, 60.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$; M-100 bp Marker.

Note: 1-12 represent the annealing temperature $50.0 \text{ }^{\circ}\text{C}, 50.3 \text{ }^{\circ}\text{C}, 50.9 \text{ }^{\circ}\text{C}, 51.8 \text{ }^{\circ}\text{C}, 53.1 \text{ }^{\circ}\text{C}, 54.4 \text{ }^{\circ}\text{C}, 55.6 \text{ }^{\circ}\text{C}, 56.9 \text{ }^{\circ}\text{C}, 58.2 \text{ }^{\circ}\text{C}, 59.1 \text{ }^{\circ}\text{C}, 59.7 \text{ }^{\circ}\text{C}, 60.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. M-100 bp Marker.

图 7 不同退火温度的扩增结果

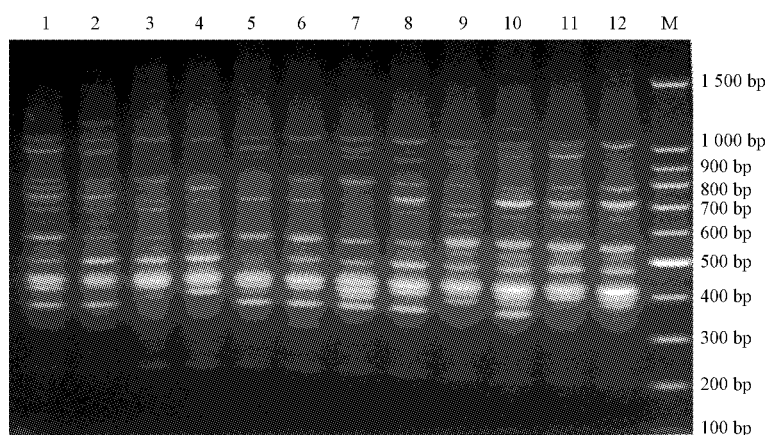
Fig. 7 Amplification result at different annealing temperatures

2.8 ISSR-PCR 反应体系的验证结果

根据正交实验设计确定的体系,选择不同的核桃样本对已优化的 ISSR-PCR 最佳反应体系进行稳定性检测。从图 8 可以看出,12 个不同样本均能扩增出清晰、多态性高的谱带,无明显弥散和拖尾现象。表明优化确定的 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠,可以用于核桃的遗传多样性等相关研究。

3 结论与讨论

影响 ISSR-PCR 扩增反应的因素很多,每一因素均可影响 PCR 扩增反应的效果甚至成败,且在不同植物材料之间各因素的最佳反应浓度相差甚远,因此为获得最佳 ISSR-PCR 扩增体系,需在试验前对反应体系中的各影响因子进行探索优化,以保证试验结果的稳定、准确和可靠。该试验所得分析结果并未出现在正交设计表



注:1~12 对应核桃样本为 MHHTL66、MHHTL69、XHHTL07、XHHTL22、JZGTL02、JZHTL29、HLHTL10、HLHTL11、LDHTL02、LDHTL19、GDHTL01、GDHTL09、M-100 bp Marker。

Note:1-12 represent the walnut samples, MHHTL66, MHHTL69, XHHTL07, XHHTL22, JZGTL02, JZHTL29, HLHTL10, HLHTL11, LDHTL02, LDHTL19, GDHTL01, GDHTL09, M-100 bp Marker.

图 8 不同核桃样本 ISSR 扩增结果

Fig. 8 ISSR amplification results for different walnut samples

中,但与电泳图中 13 号处理相近,因此,使用正交设计进行反应体系优化,可根据电泳图结果直接确定,而不经直观分析,即可得到理想的反应体系。ISSR-PCR 体系除了反应中各因素浓度之外,还与试验中 PCR 仪、核酸染料、试剂商家等因素有关,因此,结合实际情况,尽量使用相同商家同一批次的产品,在相同环境中进行试验操作以保证结果一致性。

该试验通过正交设计实验,得出 5 个因素对 ISSR-PCR 反应影响强弱的顺序依次为 dNTP、引物、*Taq* 酶、 Mg^{2+} 浓度和模板 DNA。DNA 用量对 ISSR-PCR 的反应影响差别不大,在各浓度下都有良好的扩增结果。但其它因素对试验结果均有着明显的影响。确定的青海地方核桃 ISSR-PCR 适宜的扩增条件为 20 μ L 反应体系包含 0.45 mmol \cdot L⁻¹ dNTP、0.5 μ mol \cdot L⁻¹ 引物、1.75 mmol \cdot L⁻¹ Mg^{2+} 、0.75 U *Taq* 酶和 80 ng DNA。确定引物 UBC835 的最佳退火温度为 51.8 $^{\circ}$ C。该 ISSR-PCR 反应体系的建立将为青海地方核桃单株在分子水平上研究其遗传多样性奠定良好的理论和技术基础。

参考文献

[1] 郝荣庭,张毅萍.中国果树志·核桃卷[M].北京:中国林业出版社,1996.
[2] 肖良俊,毛云玲,吴涛,等.云南紫仁核桃必需氨基酸含量及营养评价[J].食品科学,2015,36(4):106-109.
[3] 梁珊珊,吕芳德,蒋瑶,等.核桃待选优株坚果品质主成分分析及综合评判[J].经济林研究,2015,33(3):7-13.
[4] 郭映智.青海的果树[M].西宁:青海人民出版社,1991:99-110.
[5] 魏海斌,朱春云,刘小利,等.青海地方核桃单株遗传关系的 ISSR 分析[J].青海大学学报(自然科学版),2015,33(3):36-40.
[6] ZIETKIEWICE E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification

[J]. Genome, 1994(20):176-183.
[7] 刘淑芹,吴凤芝,刘守伟.园艺作物的 ISSR 分子标记研究及应用[J].东北农业大学学报,2012,43(4):145-150.
[8] KOJIMA T, NAGAOKA T, NODA K, et al. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat relation to that of RFLP markers[J]. Theor Appl Gene, 1998(1):37-45.
[9] 赵谦,杜虹,庄东红. ISSR 分子标记及其在植物研究中的应用[J].分子植物育种,2007,5(增刊):123-129.
[10] 黄桂香,郭丽英,张树伟,等.中越金桔种质资源的 ISSR 分析[J].果树学报,2011,28(4):563-567.
[11] 周亚星,周伟. ISSR 分子标记技术在作物遗传育种中的应用[J].内蒙古民族大学学报,2011,26(6):682-684.
[12] 李晓红,张慧,王德元,等.我国特有植物青檀遗传结构的 ISSR 分析[J].生态学报,2013,33(16):4892-4901.
[13] 于小玉,喻方圆,刘建斌,等. ISSR 在油茶品种鉴别和遗传多样性分析中的应用[J].南京林业大学学报(自然科学版),2013,37(1):61-66.
[14] 姜荣波,姜景民,刘军,等.红楠 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J].林业科学研究,2011,24(2):194-199.
[15] 张宇,唐志鹏,高兴,等.不同颜色类群芒果的 ISSR 分析[J].经济林研究,2014,32(3):72-75.
[16] 何正文,刘运生,陈正华,等.正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J].湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.
[17] 余艳,陈海山,葛学军.简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J].热带亚热带植物学报,2003,11(1):15-19.
[18] 高丽霞.麻栗坡兜兰 ISSR 引物筛选及反应体系的优化[J].安徽农业科学,2014,42(20):6553-6555.
[19] 胡延萍,谢小龙,王莉,等.唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件的优化[J].广西植物,2010,30(1):112-116.
[20] 陈霞,张雨,陆斌,等.云南三台核桃 ISSR 体系优化[J].北方园艺,2010(4):20-22.
[21] 王涛,贾晓东,李永荣,等.薄壳山核桃 ISSR-PCR 反应体系的优化[J].江苏农业科学,2011,39(5):34-37.

DOI:10.11937/bfyy.201623023

不同产地人参种质资源 RAPD 和 SSR 分析

侯志芳¹, 孟露露², 许世泉¹, 王英平¹, 雷秀娟¹, 郑培和¹

(1. 中国农业科学院 特产研究所, 吉林 长春 130112; 2. 吉林省现代中药及生物制药基地建设办公室, 吉林 长春 130112)

摘 要:以 15 个产地人参种质资源为试材, 采用 RAPD 和 SSR 分子标记技术对其遗传多样性进行分析。结果表明: 2 种分子标记均能揭示不同地区人参种质间的遗传多样性。共筛选出 11 条 RAPD 随机引物, 平均每条引物可扩增出 3~17 条 DNA 片段, 共扩增出 104 条清晰条带, 多态性条带 100 条, 多态性百分率为 96.15%, 揭示供试材料间遗传相似系数(GS)为 0.505 3~0.989 5, 平均值为 0.760 4。筛选出 5 对 SSR 引物, 平均每对引物可扩增出 1~8 条 DNA 片段, 共扩增出 38 条清晰条带, 多态性条带 35 条, 多态性百分率为 92.11%, 揭示供试材料间遗传相似系数(GS)为 0.400 0~0.960 0, 平均值为 0.742 1。RAPD 和 SSR 标记的聚类分析在分类上稍有差异, 但总体趋势一致, RAPD、SSR 及 RAPD+SSR 均将样品聚为三大类, 均能揭示它们之间的亲缘关系, 为人参种质资源的收集与利用奠定了基础。

关键词:人参; RAPD; SSR; 遗传多样性

中图分类号:S 567.5⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)23-0096-06

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)属五加科多年生宿根草本, 是闻名遐迩的“东北三宝”之一, 也是我国名贵中药材之一, 有“百草之王”的美称。我国人参产区多集中在东北三省, 其中吉林省为主要产区, 其产量占全国的 85%, 占世界产量的 70%, 居世界之首^[1]。然而近年来, 栽培人参品质下降、品种混乱, 人参种质资源破坏严重, 亟需构建人参种质基因库, 收集和整理人参宝贵的种质资源^[2]。课题组认为不同产地人参资源在遗传

多样性及亲缘关系上存在一定的相关性, 这对人参品种的选育和人参种质资源合理开发和保护都有重要意义。

人参生长周期长、繁殖速度慢, 很难用常规育种的方法来研究人参种质资源。分子标记技术由于其简便、快捷、稳定、不受环境限制等优点, 自问世以来一直备受学者青睐。1990 年, WILLIAMS 等^[3]和 WELSH 等^[4]报道了一种较为简便的检测 DNA 多态性的技术, 即随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)。目前, 该技术已经成功应用在人参种质遗传多样性上, 1997 年冯斗等^[5]应用 RAPD 方法对不同的人参品种进行了鉴定, 首次获得了人参的 DNA 特异性扩增片段; 2005 年任跃英等^[6]采用 RAPD 法对黄果及红果人参、西洋参的种源关系进行分析; 2013 年 SCHLAG 等^[7]使用 RAPD 标记研究了西洋参品种间的遗传多样性。简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 也称

第一作者简介:侯志芳(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源评价。E-mail:18243081801@163.com.

责任作者:郑培和(1973-), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 现主要从事药用植物资源评价等研究工作。E-mail:zhengpeihe@caas.cn.

基金项目:国家国际科技合作专项资助项目(2015DFA31290)。

收稿日期:2016-08-04

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for Walnut in Qinghai

LIU Baoyao^{1,2}, LIU Xiaoli², WEI Haibin², GU Wenyi²

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 2. Qinghai Forestry Research Institute/Qinghai Plateau Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: The orthogonal design was used to optimize the main factors of ISSR-PCR amplification system for walnut in Qinghai. The results showed that in 20 μ L reaction system, the optimal PCR mixture contained 0.45 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.5 μ mol \cdot L⁻¹ primer, 1.75 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 0.75 U Taq polymerase and 80 ng DNA.

Keywords: Qinghai; local walnut; ISSR-PCR