

山杏 SSR-PCR 反应体系优化

张皓凯¹, 董胜君¹, 刘明国¹, 仲维平², 卢彩云¹, 金玲¹

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 南京林业大学 林学院, 江苏 南京 210037)

摘要:以4种山杏群体为试材,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计,研究了适合4种山杏群体的SSR-PCR反应体系。结果表明:总反应体系为20 μL ,其中DNA模板量20 ng,引物浓度0.15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,*Taq*聚合酶量1.0 U,dNTPs 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用引物Y45对43个山杏无性系的DNA进行扩增,扩增产物在100~200 bp,多态性良好,稳定度高,可以用于山杏SSR分子标记研究。

关键词:山杏;SSR-PCR;反应体系;优化

中图分类号:S 662.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)03-0115-06

山杏(*Armeniaca sibirica* (L.) Lam.)为野生的蔷薇科杏属植物的统称,为亚洲特有的生态经济型树种,历史悠久,分布较广,大部分处于野生和半野生状态^[1]。同时由于具有自交不亲和的特性,种间杂

交现象普遍。一方面使得山杏种质资源异常丰富,但另一方面也为种质资源的识别、鉴定造成了困难。传统形态学分类不能得到准确的结果^[2]。SSR分子标记是指串联重复DNA序列,一般多为1~5个碱基组成,其广泛分布于基因组的不同位置,长度一般较短^[3]。SSR分子标记技术具有重复性好、共显性遗传、信息量丰富等优点^[4]。而且,国内已有将小麦、海岛棉、仁用杏等作为研究对象,采用SSR分子标记技术,对其遗传多样性进行了研究^[5-7]。针对山杏种质资源的特点,现以西伯利亚杏(*Armeniaca sibirica* (L.) Lam.)、东北杏(*Armeniaca mandshurica* Maxim.)、野杏(*Armeniaca vulgaris* Lam. var. *ansu* (Maxim.) Yü et Lu)和普通杏(*Armeniaca vulgaris* Lam.)为试验材

第一作者简介:张皓凯(1992-),男,辽宁盘锦人,硕士研究生,研究方向为山杏种质资源与多样性。E-mail:zhanghaokail@126.com

责任作者:董胜君(1974-),男,辽宁瓦房店人,硕士,副教授,现主要从事林木种苗和经济林等研究工作。E-mail:dsj928@163.com

基金项目:中央财政林业科技示范推广资助项目(辽A(2015)01)。

收稿日期:2016-09-27

Tissue Culture and Plantlet Regeneration Technology of *Chimonanthus praecox* cv. *Luteus*

ZHAO Zhenli¹, CAO Yanchun², LIU Rongning³

(1. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002; 2. Department of Environmental Art Engineering, Henan Polytechnic College, Zhengzhou, Henan 450046; 3. College of Agricultural Engineering, Henan Vocational College of Agriculture, Zhongmu, Henan 451450)

Abstract: Young stem segments and leaves of *Chimonanthus praecox* cv. *Luteus* were used as materials. A study was conducted on the technology of tissue culture and *in vitro* plantlet regeneration to provide references for the quick propagation and factory production of *Chimonanthus praecox* cv. *Luteus*. The results showed that stem segment was the appropriate explant, and its appropriate media for callus induction, shoot induction and rooting induction were $\text{MS}+0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}+2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$, $\text{MS}+0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}+2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ and $1/2\text{MS}+0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$, respectively.

Keywords: *Chimonanthus praecox* cv. *Luteus*; tissue culture; medium; plantlet regeneration

料,采用正交实验设计方法,对 SSR-PCR 反应体系进行优化,以期为山杏种质资源的分子鉴定和育种工作提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验材料来源于辽宁省朝阳市喀左县南公营子镇的山杏种质资源圃,位于东经 119°67',北纬 41°36',平均海拔 347 m。年均气温 8.7℃,年有效积温($\geq 10^\circ\text{C}$)为 3 520℃,最高气温 43.3℃,最低气温 -28℃,全年无霜期 144 d,年均降水量约 491.5 mm,年蒸发量约 2 000 mm。资源圃为缓坡地形(坡度 5°~10°),土壤为褐土,棕壤,风沙土,土层厚度 50~

100 cm,pH 7.0~7.2,土壤肥力中等。

试验地树种为山杏优良无性系,包括来自不同种源的初选丰产、抗冻、耐旱、晚花无性系及其它形态变异类型等无性系,于 2004—2013 年收集无性系。试验地周围乔木树种有油松、刺槐、蒙古栎等,灌木树种有紫穗槐、荆条等,草本植物有隐子草、羊胡子苔草等。

1.2 试验材料

用于 SSR-PCR 体系优化的杏品种为“西伯利亚杏 350 号”“辽杏 2 号”“野杏 212 号”无性系和普通杏品种“凯特”,用于验证 SSR-PCR 反应体系稳定性的品种为 43 个西伯利亚杏无性系(表 1)。

表 1 供试山杏无性系

Table 1 Wild apricot clones for test materials

无性系编号 Clone number	种质来源 Germplasm origin	特征描述 Signalment	无性系编号 Clone number	种质来源 Germplasm origin	特征描述 Signalment
1 号	辽宁喀左县	丰产	421 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	抗冻
3 号	辽宁喀左县	甜仁、双仁	442 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	曲枝
8 号	辽宁喀左县	丰产	455 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	粉色花药
18 号	辽宁喀左县	丰产	463 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	甜肉
53 号	辽宁北票市	丰产	501 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
55 号	辽宁北票市	丰产	502 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
81 号	辽宁北票市	抗冻	503 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
87 号	辽宁北票市	丰产	504 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
322 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	丰产	505 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
324 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	丰产	506 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
332 号	内蒙古扎兰屯洼堤乡	丰产	507 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
334 号	内蒙古扎兰屯洼堤乡	丰产	508 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
341 号	内蒙古扎兰屯洼堤乡	丰产	509 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
345 号	内蒙古扎兰屯洼堤乡	丰产	510 号	俄罗斯外贝加尔边疆区卡尔 NM 斯卡亚镇	极耐旱
366 号	内蒙古扎兰屯洼堤乡	丰产	511 号	俄罗斯外贝加尔边疆区布里亚特阿根斯克民族区	抗寒抗旱丰产
367 号	内蒙古扎兰屯洼堤乡	丰产	513 号	俄罗斯外贝加尔边疆区布里亚特阿根斯克民族区	抗寒抗旱丰产
401 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	晚花	516 号	俄罗斯外贝加尔边疆区布里亚特阿根斯克民族区	抗寒抗旱丰产
404 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	晚花	517 号	俄罗斯外贝加尔边疆区布里亚特阿根斯克民族区	抗寒抗旱丰产
405 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	晚花	518 号	俄罗斯外贝加尔边疆区布里亚特阿根斯克民族区	抗寒抗旱丰产
406 号	内蒙古扎兰屯大河湾镇	晚花	BF 号	辽宁北票市	粉花
408 号	内蒙古扎兰屯洼堤乡	晚花	BX 号	辽宁北票市	香花
409 号	内蒙古扎兰屯洼堤乡	晚花			

1.3 试验方法

1.3.1 取样 于 2014 年 6 月初取样,选取样木阳面 1 年生嫩枝上的嫩叶。取下嫩叶后用锡纸包好,编号后放入液氮罐中储存,带回实验室,重新编号放入 -80℃ 冰箱保存,送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行提取 DNA 以及测序工作,其中 DNA 提取采取 CTAB 法和试剂盒法。

1.3.2 DNA 的提取与检测 采用购自 TIANGEN 公司的 DNasecure Plant Kit 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。从嫩叶中提取山杏 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳试验,置于凝胶成像仪中

拍照,DNA 浓度使用沈阳农业大学园艺学院超微量分光光度计 Nanodrop2000 检测,最后放入 -20℃ 冰箱保存备用。

1.3.3 SSR-PCR 体系的正交实验设计 以“辽杏 2 号”“野杏 212 号”“西伯利亚杏 350 号”无性系和普通杏品种“凯特”为材料进行 SSR-PCR 反应体系的优化。Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶和模板 DNA 含量是影响 SSR-PCR 扩增体系的主要因素,针对以上 5 个影响因素设置 4 个浓度水平梯度进行 SSR-PCR 体系优化(表 2),选用 L₁₆(4⁵)正交实验,共 16 个试验处理^[8-9],每个处理 3 次重复。

表 2 PCR 反应的因素及水平

Table 2 Factors and levels of PCR reaction					
水平	模板	Mg ²⁺ 浓度	dNTPs 浓度	引物浓度	Taq 酶
Level	template	Mg ²⁺ concentration	dNTPs concentration	Primer concentration	Taq polymerase
	/ng	/(mmol · L ⁻¹)	/(mmol · L ⁻¹)	/(μmol · L ⁻¹)	/U
1	10	1.5	0.15	0.15	0.5
2	20	2.0	0.20	0.20	1.0
3	30	2.5	0.25	0.25	1.5
4	40	3.0	0.30	0.30	2.0

1.3.4 PCR 扩增与检测 根据测序的结果以及蔡胜文等^[10]在仁用杏远源杂交 SSR-PCR 扩增反应程序,确定该试验的 PCR 扩增程序:热盖温度 105 ℃,94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,94 ℃ 变性 30 s;55 ℃ 退火 30 s;72 ℃ 延伸 30 s,共 34 个循环,72 ℃ 后延伸 5 min,4 ℃ 保存。选用引物 X41,采用上述程序和

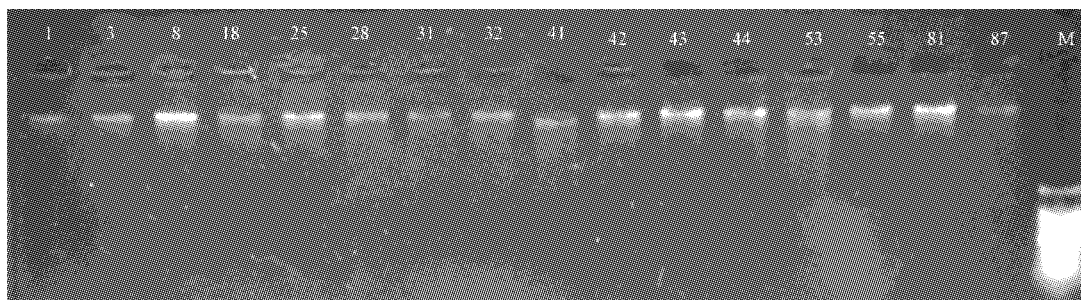
16 个正交实验设计的 SSR-PCR 体系对“东北杏 2 号”“野杏 212 号”“西伯利亚杏 350 号”无性系和普通杏品种“凯特”进行 PCR 扩增,对扩增产物进行 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试验,经过固定、染色、漂洗、显影后置于凝胶检测系统中拍照记录。

1.3.5 反应体系稳定性检测 使用引物 Y45 对 43 个山杏无性系 DNA 进行 PCR 扩增,检测优化体系的稳定性。

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取与检测

由图 1 可知,电泳谱带清晰、分布单一,几乎没有拖尾现象,说明 DNA 提取质量较高,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 介于 1.70~2.00,完全满足 SSR 标记的要求。可用于下一步的 SSR-PCR 扩增反应。



注:M 为 DNA Marker,各编号为无性系号。

Note:M, DNA Marker, the numbers are clones number.

图 1 山杏 DNA 提取结果

Fig. 1 DNA extraction result of wild apricot

2.2 山杏 SSR 反应体系优化

从图 2~5 可以看出,16 个 SSR-PCR 扩增体系存在明显差异。其中以“西伯利亚杏 350 号”为试材的第 4 组合,普通杏“凯特”为试材的第 1、2、13 组合,

“野杏 212 号”为试材的第 1、9 组合,“辽杏 2 号”为试材的第 3、5、11、13 组合扩增出的条带少。4 份试材的扩增片段长度大多集中在 100~250 bp。

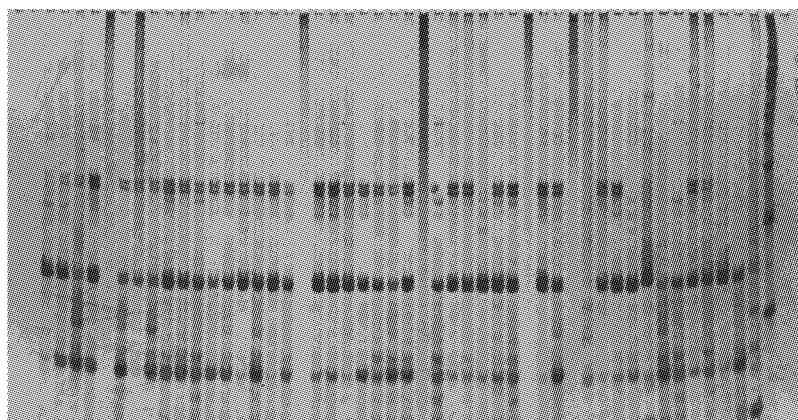


图 2 西伯利亚杏 SSR 反应体系扩增结果

Fig. 2 Amplification results for Siberian apricot by SSR reaction system

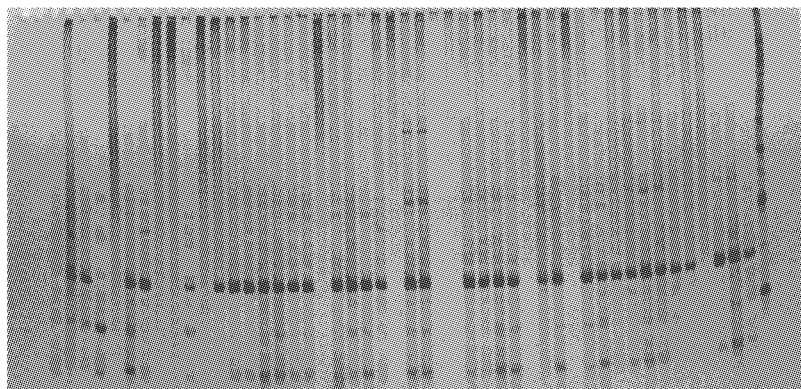


图3 普通杏 SSR 反应体系正交实验扩增结果

Fig. 3 Amplification results for common apricot by SSR reaction system

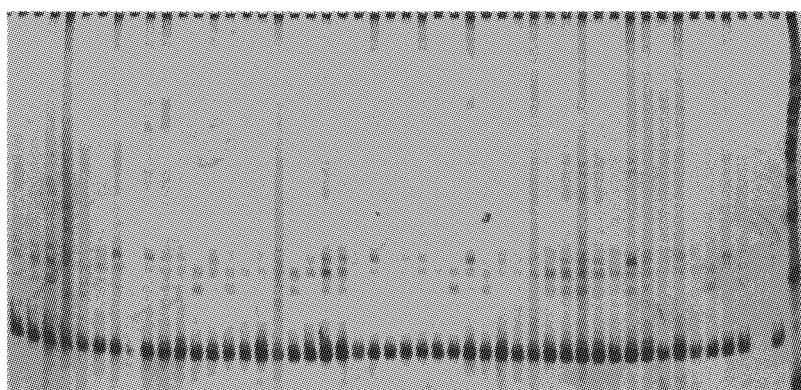


图4 野杏反应体系正交实验扩增结果

Fig. 4 Amplification results for wild apricot by SSR reaction system

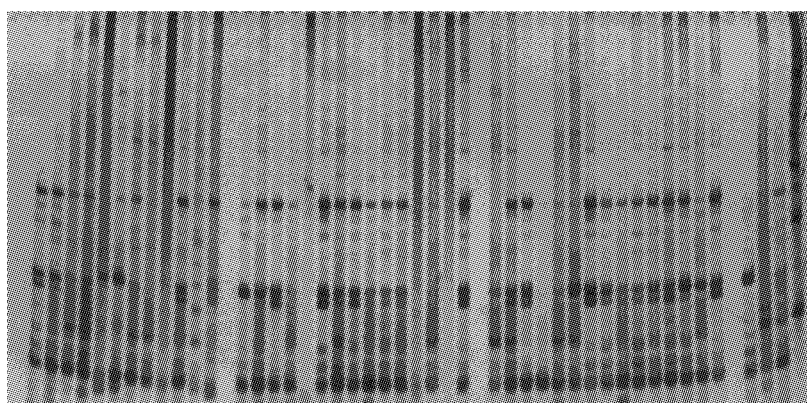


图5 东北杏反应体系正交实验扩增结果

Fig. 5 Amplification results for northeast apricot by SSR reaction system

由表3可知,西伯利亚杏、普通杏(“凯特”杏)和东北杏的 SSR 反应条件最佳组合均为7号,即总体积 20 μL ,其中 DNA 模板 20 ng, Mg^{2+} 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$, dNTPs 0.3 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$,引物 0.15 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* 酶 1 U;野杏 SSR 反应条件最佳组合为3号,即总体积 20 μL ,其中 DNA 模板 10 ng, Mg^{2+} 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$,

dNTPs 0.25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$,引物 0.25 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* 酶 1.5 U;4种植物材料各组合平均得分以7号组合最高,为15.50。

根据正交实验的聚丙烯酰胺凝胶电泳图(图2~5),综合参考扩增产物主带丰富度、重复性、特异性、背景清晰度进行打分评判,并对打分数据进行统计分析。

产物效果好的,即产物主带多、亮度强、特异性好、背景清晰的计最高分 16 分;最差记为最低分 1 分^[11]。西

伯利亚杏、普通杏(“凯特”杏)、野杏、东北杏 SSR 反应体系正交实验 16 个组合的扩增效果评价见表 3。

表 3

4 种杏属植物 SSR 正交实验打分结果

Table 3

Scores of orthogonal experiment for wild apricot

组合 Group	DNA 模板用量 DNA template	Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration	dNTPs 浓度 dNTPs concentration	引物浓度 Primer concentration	Taq 酶用量 Taq polymerase	得分 Score				平均得分 Average
	/ng	/(mmol · L ⁻¹)	/(mmol · L ⁻¹)	/(μmol · L ⁻¹)	/U	X	P	Y	L	
1	10	1.5	0.15	0.15	0.5	1	2	1	11	3.75
2	10	2.0	0.20	0.20	1.0	2	4	7	13	6.50
3	10	2.5	0.25	0.25	1.5	4	5	16	3	7.00
4	10	3.0	0.30	0.30	2.0	3	11	12	2	7.00
5	20	1.5	0.20	0.25	2.0	11	14	13	1	9.75
6	20	2.0	0.15	0.30	1.5	14	8	4	14	10.00
7	20	2.5	0.30	0.15	1.0	16	16	14	16	15.50
8	20	3.0	0.25	0.20	0.5	15	15	8	15	13.25
9	30	1.5	0.25	0.30	1.0	10	9	6	4	7.25
10	30	2.0	0.30	0.25	0.5	9	10	15	12	11.50
11	30	2.5	0.15	0.20	2.0	13	7	5	6	7.75
12	30	3.0	0.20	0.15	1.5	12	13	11	10	11.50
13	40	1.5	0.30	0.20	1.5	5	1	9	9	6.00
14	40	2.0	0.25	0.15	2.0	8	6	10	5	7.25
15	40	2.5	0.20	0.30	0.5	6	3	3	8	5.00
16	40	3.0	0.15	0.25	1.0	7	12	2	7	7.00

注: X, P, Y, L 分别指西伯利亚杏、普通杏、野杏、辽杏。

Note: X, P, Y, L respectively refer to the Siberian apricot, apricot, wild apricot, northeast apricot.

2.3 4 种杏属植物 SSR 反应体系正交实验直观分析

对于反应因素产生影响的因素由极差 R 值决定,极差越大,该因素对于反应的影响越显著。影响因素在不同水平对反应体系的影响情况由每一因素不同水平下的平均值 k 决定, k 值越大,该因素在该水平的反应结果越好。由表 4 可知,4 种杏属植物 SSR-PCR 反应的影响因素根据其影响程度从大到小依次为 DNA 模板、Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq 酶。

7 号组合扩增效果与理论值非常接近,只是在 Mg²⁺ 浓度方面存在较小差异,综合考虑试验成本,如 Taq 酶用量等,最终选择体系 7 作为 SSR-PCR 反应体系。

山杏 SSR-PCR 最佳反应体系:反应总体积 20 μL, DNA 模板量 20 ng、引物浓度 0.15 μmol · L⁻¹、Mg²⁺ 2.0 mmol · L⁻¹、Taq 聚合酶量 1.0 U、dNTPs 0.25 mmol · L⁻¹,其余用双蒸水补齐。

表 4 正交实验直观分析

Table 4 Analysis of orthogonal experiment

结果 Result	影响因素 Influence factor				
	DNA 模板 /ng	Mg ²⁺ /(mmol · L ⁻¹)	dNTPs /(mmol · L ⁻¹)	引物 /(μmol · L ⁻¹)	Taq 聚合酶 /U
k1	6.062	6.68	7.12	9.50	8.37
k2	12.120	8.81	8.18	8.37	9.06
k3	9.500	8.81	8.68	8.81	8.62
k4	6.310	9.68	10.00	7.31	7.93
R	6.060	3.00	2.80	2.18	1.12

2.4 最佳体系稳定性检测

使用上述正交实验选出的最佳反应体系,选取一对引物(Y45)对 43 个山杏无性系 DNA 进行扩增,由图 6 可知,每份 DNA 样品扩增得到的条带丰富、背景清晰,说明该体系稳定,可以应用在山杏 SSR 标记研究。

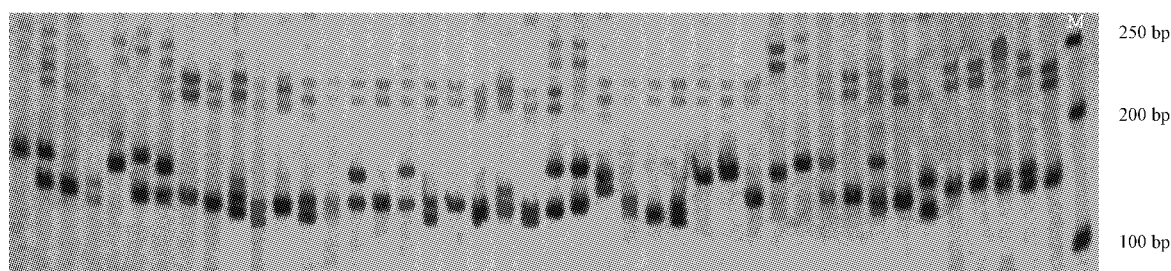


图 6 43 个山杏无性系的 SSR-PCR 检测

Fig. 6 SSR-PCR for 43 wild apricot clones

3 结论与讨论

该研究选用普通杏、辽杏、西伯利亚杏和野杏共4个种来确定山杏 SSR-PCR 的最优反应体系。通过 Mg^{2+} 用量、dNTPs 用量、引物用量、*Taq* DNA 聚合酶用量和模板 DNA 用量等5个因素4个浓度水平的正交实验,进行 SSR-PCR 反应体系的优化,确定山杏 SSR-PCR 最佳反应体系(反应体系总体积 20 μ L)为 DNA 模板量 20 ng、引物浓度 0.15 μ mol \cdot L $^{-1}$ 、 Mg^{2+} 2.0 mmol \cdot L $^{-1}$ 、*Taq* 聚合酶量 1.0 U、dNTPs 0.25 mmol \cdot L $^{-1}$ 。

SSR 分子标记有着共显性高,重复性好的特点,但也因为多因素使得 SSR 反应体系受到影响。例如,模板浓度过低会导致结果不稳定及条带模糊;浓度过高时引物与 dNTPs 过早耗尽,结果也不稳定。引物浓度偏高会引起碱基错配和非特异性产物的产生,形成引物二聚体^[12]。因而反应体系的优化至关重要。多因素正交实验可以在不损失信息的情况下,得到最优体系。但是对试验结果打分有主观性,有待进一步改进。

参考文献

[1] 王利兵. 三种山杏资源调查与其分布规律[J]. 林业资源管理,

2011(5):65-70.

[2] 李爽,董胜君,吴月亮,等. 西伯利亚杏 SRAP-PCR 反应体系的优化研究[J]. 辽宁林业科技,2014(4):9-11.

[3] 孙丽丹. 梅花遗传连锁图谱构建和表型性状 QTLs 分析[D]. 北京:北京林业大学,2013.

[4] FISHER P J, GARDNER R C, RICHARDSON T E. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR[J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24(21):4369-4371.

[5] 陈光,杜雄明,卢东柏. 利用 SSR 分子标记进行海岛棉遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(2):135-139.

[6] 梁红艳. SSR 分子标记对 24 个春小麦育成品种的聚类分析[J]. 中国农学通报,2013(7):50-54.

[7] 冯富娟,赵丹,孙晓艳,等. 红松 SSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 经济林研究,2010(1):35-40.

[8] 袁志发,周静芊. 试验设计与分析[M]. 北京:高等教育出版社,2000:467.

[9] 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(5):111-115.

[10] 蔡胜文,孙浩元,杨丽,等. 仁用杏远缘杂交后代 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 中国农学通报,2008(7):50-54.

[11] 何正文,刘运生,陈立华. 正交设计直观分析优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.

[12] 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(5):111-115.

Optimization of SSR-PCR Reaction System for *Armeniaca sibirica* (L.) Lam.

ZHANG Haokai¹, DONG Shengjun¹, LIU Mingguo¹, ZHONG Weiping², LU Caiyun¹, JIN Ling¹

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract: Four *Armeniaca sibirica* (L.) Lam groups were used as test materials, by orthogonal test $L_{16}(4^5)$, the optimal SSR-PCR reaction system for *Armeniaca sibirica* (L.) Lam. was established. The results showed that the optimal systems of SSR (20 μ L) was DNA templates 20 ng, primer 0.15 μ mol \cdot L $^{-1}$, Mg^{2+} 2.0 mmol \cdot L $^{-1}$, *Taq* polymerase 1.0 U, dNTPs 0.25 mmol \cdot L $^{-1}$. After DNA amplification of 43 *Armeniaca sibirica* (L.) Lam. by using primer Y45, the products were 100—200 bp with good polymorphism and high stability, which could be used for *Armeniaca sibirica* (L.) Lam. SSR molecular marker development.

Keywords: *Armeniaca sibirica* (L.) Lam.; SSR-PCR; reaction system; optimization