

利用正交设计优化向日葵 ISSR-PCR 反应体系

梁春波

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 向日葵产业的发展对调整黑龙江省种植业结构、利用中低产田、增加农民收入具有十分重要的作用, 为了推广 ISSR 分子标记技术在向日葵分子育种上的应用, 利用正交设计对向日葵 ISSR-PCR 反应体系中的 5 个因素(模板 DNA、dNTP 浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、*Taq* 酶用量)在 4 个水平上进行优化, 确立了适合向日葵 ISSR-PCR 反应的 20 μ L 体系: 50 ng 模板 DNA、2.0 μ mol·L⁻¹ dNTP、37.5 μ mol·L⁻¹ Mg^{2+} 、8 μ mol·L⁻¹ 引物、8 U DNA *Taq* 酶。

关键词: 向日葵; 正交设计; ISSR-PCR; 反应体系; 优化

中图分类号: S565.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2014)10-0016-04

向日葵是全球重要的油料作物之一, 是世界第四大植物油来源。黑龙江省是我国向日葵的主要产区之一, 种植面积一直稳居全国第 2 位^[1]。向日葵产业的发展对调整黑龙江省种植业结构、利用中低产田、增加农民收入都具有十分重要的作用^[2]。黑龙江省向日葵地方种质资源比较复杂, 包括地方品种、农家栽培种、国外杂交种及其后代分离群体等, 存在着亲缘关系混乱、遗传不明确及同种异名等问题, 给资源的搜集整理和杂交

亲本的选育带来了很大的困难。因此, 充分了解现有向日葵种质资源非常必要, 是进一步利用和改良向日葵种质、创新育种材料的最有效途径。分子标记技术具有效率高、结果可靠、可标准化操作等特点, 是进行种质资源遗传多样性分析的有效手段。RAPD、AFLP、SSR 均被报道应用于向日葵种质资源的分析和品种纯度鉴定方面的研究^[3-5]。

ISSR 是 Zietkiewicz 等^[6]于 1994 年创建的以 PCR 技术为基础的分子标记, 具有 DNA 用量少、多态性水平高、重复性好和操作性强等主要特点。而且利用 ISSR 标记建立的作物品种指纹图谱能够有效区分作物的变种和杂种, 适用于品种亲缘关系分析、种子真伪性和纯度鉴定等方面, 在水稻、大豆和甘薯等作物上均有报道^[7-9], 在向日

收稿日期: 2014-05-22

基金项目: 国家向日葵现代产业技术体系资助项目(GARS-16); 黑龙江省农业科技创新工程资助项目(2012ZD10)

作者简介: 梁春波(1981-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士, 助理研究员, 从事向日葵遗传育种研究。E-mail: liangchunbo2013@163.com。

Screening Test of New Potato Strains

ZHAO Hai-hong

(Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pests of Jiamusi/Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: In order to breed new potato varieties with high quality and high yield that suitable for Heilongjiang province, the trial comparatively studied from strains plant, potato tuber character, main disease and yield were conducted. The results showed that, the yield of Dongnong 09-33069, Longke 200701-7 and Da 200401-19 were significantly higher than control in the early group, the yield of Dongnong 03-1 was no significant difference with control, but increased 0.34%. In the late group, the yield of Xinkeshu 1 and Da 200010-2 increased 24.94% and 9.32% than control, the yield of Ke 200401-73 and Dongnong DD412 were lower than control. In high starch group, the yield of Ke 200809-90 was significantly higher than control, Hu H99-9 increased 6.43% than control in production.

Key words: potato; strains; yield

葵中还未发现报道。研究采用正交试验设计的方法建立向日葵 ISSR-PCR 的反应体系,并对各因素进行优化,以期建立一套适宜向日葵的 ISSR 技术体系,为 ISSR 分子标记在向日葵遗传多样性分析、分子标记育种等方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为黑龙江省农业科学院经济作物研究所自育的向日葵品种龙食葵 3 号,体系验证同时采用油用向日葵恢复系 R5。试验在黑龙江省农业科学院经济作物研究所实验室完成。材料均于 6 叶期取上部展开叶片,用自封袋封存后贮存于超低温(−80℃)冰箱备用。

研究所用植物提取试剂盒购自全式金生物技术有限公司, *Taq* 酶购自 Thermo 公司, dNTPs 购自 TOYOBO 生物科技有限公司。

随机引物 ISSR-815 [5′-CTCTCTCTCTCTCTCTCTG-3′], ISSR-822 [5′-TCTCTCTCTCTCTCTCA-

3′], ISSR-866 [5′-CTCCTCCTCCTCCTCCTC-3′] 由金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 向日葵基因组 DNA 的提取 向日葵基因组 DNA 的提取采用全式金生物技术有限公司的植物基因组提取试剂盒完成。提取的 DNA 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和浓度,并用双蒸水稀释到 50 ng·μL^{−1}, 备用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系优化的正交设计 试验采用正交设计 L₁₆(4⁵) 进行,设计模板 DNA、dNTPs、Mg²⁺、引物, *Taq* 酶 5 因素 4 水平,各反应成分的因素-水平及正交试验见表 1。

设 16 个处理,每个处理 3 次重复,一个引物 27 个反应,3 个引物共 81 个反应。反应体系为 20 μL。PCR 反应程序:94℃ 变性 4 min;94℃ 变性 45 s,50℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 90 s,40 次循环;72℃ 延伸 7 min,最后 4℃ 保存。对 PCR 反应产物进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,根据条带数目依次给 16 个反应打分(见表 1)。

表 1 PCR 正交试验设计和评分结果
Table 1 Orthoronal design for PCR and score

编号 No.	模板 DNA/ng Template DNA	dNTP/ mmol·L ^{−1}	Mg ²⁺ / mmol·L ^{−1}	引物 /mmol·L ^{−1} Primers	<i>Taq</i> 酶/U <i>Taq</i> polymerase	平均得分 Mean score
1	25	1.5	37.5	2	4	0.67
2	25	2.0	50.0	4	6	1.66
3	25	2.5	62.5	6	8	4.00
4	25	3.0	75.0	8	10	3.66
5	50	1.5	50.0	6	10	3.66
6	50	2.0	37.5	8	8	4.33
7	50	2.5	75.0	2	6	2.33
8	50	3.0	62.5	4	4	0.00
9	75	1.5	62.5	8	6	3.33
10	75	2.0	75.0	6	4	0.33
11	75	2.5	37.5	4	10	3.66
12	75	3.0	50.0	2	8	2.00
13	100	1.5	75.0	4	8	3.33
14	100	2.0	62.5	2	10	1.00
15	100	2.5	50.0	8	4	2.00
16	100	3.0	37.5	6	6	0.00

1.2.3 ISSR-PCR 优化反应体系的验证 采用已优化的 ISSR-PCR 反应体系(模板 DNA 50 ng、dNTPs 2.0 mmol·L^{−1}、Mg²⁺ 37.5 mmol·L^{−1}、引

物 8 mmol·L^{−1}, *Taq* 酶 8 U),以 8 对引物对龙食葵 3 号和 R5 的 DNA 进行扩增来验证该体系的效果。

2 结果与分析

2.1 扩增产物电泳结果

按照正交设计的 16 个反应进行 PCR 试验,3 次重复结果无明显差异,电泳的检测结果见图 1,根据谱带及杂带的多少分别统计得分。从结果来看,各处理之间存在较大差异,不同引物之间也有

不同,处理 3、4、5、6、9、13、15 的扩增条带较多,其中处理 6 的条带最多且最为清晰。处理 1、2、7、10、11、12、14 仅能在个别引物中有扩增产物,处理 8、16 在所选 3 个引物中均没有检测到扩增产物。因此,选择处理 6 进行后续的验证。

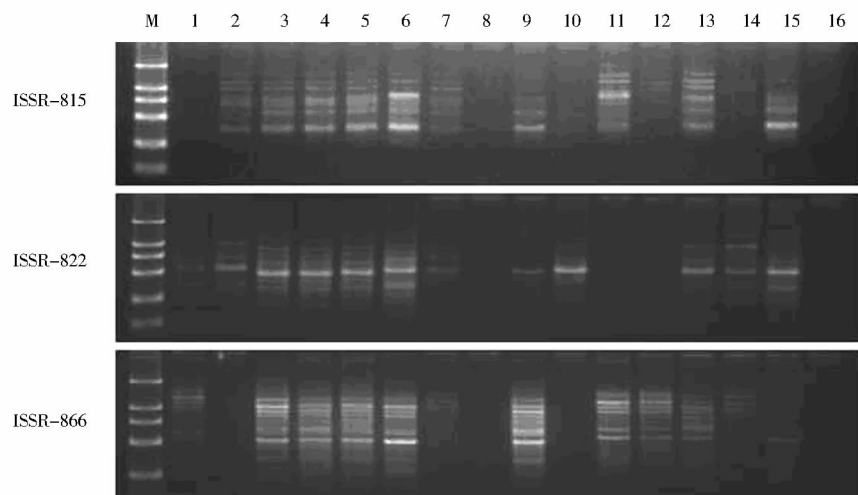


图 1 ISSR-PCR 扩增产物检测结果

M:DNA 标准分子量 III;1~16:各反应产物,编号同表 1

Fig. 1 Electrophoresis of ISSR-PCR products

M:DNA marker III;1~16: Number of reaction products, as the same case as Table 1.

2.2 各因素的不同水平对 ISSR-PCR 的影响

从表 2 看出 *Taq* 酶、引物及 dNTPs 的浓度对 PCR 的影响要明显高于模版 DNA 和 Mg^{2+} 浓度。扩增条带数基本随着引物和 *Taq* 酶浓度的

提高而增加,而在其它 3 项中则无明显规律可循,最后选定的处理 6 基本融合了各因素的最佳水平。

表 2 扩增片段数总和及极差分析

Table 2 Sum of the amplified bands range analysis

项目 Item	模板 DNA/ng Template DNA	dNTP/ mmol·L ⁻¹	Mg ²⁺ / mmol·L ⁻¹	引物/mmol·L ⁻¹ Primers	<i>Taq</i> 酶/U <i>Taq</i> polymerase
K1	23	33	26	18	9
K2	31	22	28	26	23
K3	27	36	25	24	41
K4	19	17	29	40	36
R	4	19	4	22	32

注:Ki 表示每个因素在同一水平下的试验值之和($i=1,2,3,4$);R 表示极差。

Note:Ki represent the sum of value at the same level of each factor($i=1,2,3,4$);R represent the range.

2.3 ISSR-PCR 反应体系的验证

由图 2 可以看出,利用该研究优化的 ISSR-PCR 反应体系扩增 8 个 ISSR 引物,2%琼脂糖电

泳检测结果表明能够扩增出比较清晰的条带,多态性也比较丰富,可以进一步应用于向日葵 ISSR 分子标记的鉴定。

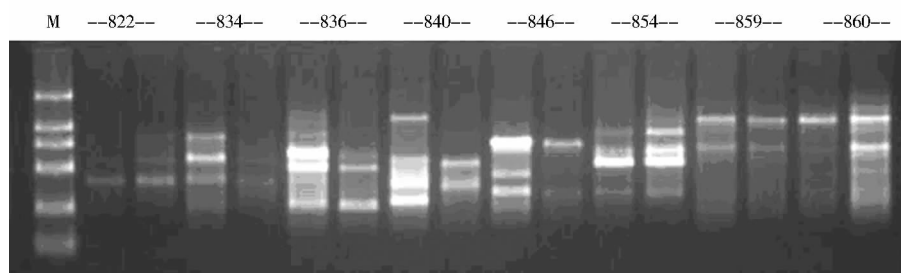


图 2 ISSR-PCR 优化体系的验证结果

M:DNA 标准分子量 III;822-860:ISSR 引物名称

Fig. 2 The result of ISSR-PCR reaction system optimization

M:DNA marker III;822-860:ISSR primers

3 结论与讨论

建立适合某种作物的 ISSR-PCR 反应体系能够为 ISSR 分子标记的应用奠定基础,不同作物的 ISSR-PCR 反应体系也有一定差异^[10-12]。ISSR 为显性标记式遗传,具有多态性好、稳定性高和可重复性强等特点,不受样品形态、基因表达与否及环境因子等条件限制^[8]。但 ISSR 谱带对于试验条件和程序比较敏感,因此,保证 ISSR 扩增的稳定性是非常关键的。该研究通过正交试验的方法对反应体系进行了优化,在对不同品种的基因组 DNA 进行扩增时,采用一致的体系和程序,并进行了 3 次重复验证,以确保 ISSR 谱带的稳定性。利用正交设计方法获得的向日葵 ISSR-PCR 的反应体系在正交设计表中得分最高,利用该体系对其它 8 对 ISSR 引物进行 PCR 扩增,检测结果表明条带清晰、多态性较为丰富。此体系的建立和优化为进一步开展向日葵种质资源的遗传多样性分析及分子标记辅助育种奠定了基础。

参考文献:

- [1] 梁春波,黄绪堂,王文军,等.油用向日葵资源农艺性状与单株粒重的灰色关联分析[J].作物杂志,2013(6):50-52.
- [2] 黄绪堂,王文军,张明,等.黑龙江省向日葵产业存在的问题和发展建议[J].黑龙江农业科学,2010(9):4-6.

- [3] Lawson W R, Henry R J, Kochman J K, et al. Genetic diversity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1994, 45: 1319-1327.
- [4] Hongtrakul V, Huestis G M, Knapp S J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines[J]. Theor. Appl. Genetics, 1997, 95: 400-407.
- [5] 高飞,张英,林展,等. DNA 分子标记检测技术鉴定向日葵品种纯度的研究[J]. 种子, 2008, 27(9): 46-51, 56.
- [6] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [7] 陈兆贵,邓汉超,赵淑平. 47 份水稻品种资源的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 498-502.
- [8] 何海燕,沙伟,张艳馥. 黑龙江省大豆种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 37-40.
- [9] 宋吉轩,雷尊国,丁海兵,等. 贵州甘薯地方种质资源 ISSR 遗传多样性分析[J]. 种子, 2011, 30(3): 76-80.
- [10] 赵雷,张继兰. 云南松 ISSR-PCR 反应体系建立及优化[J]. 北方园艺, 2012(12): 130-133.
- [11] 张立杰,李韬,魏秀清,等. 正交设计优化莲雾 ISSR-PCR 反应体系[J]. 福建农业学报, 2012, 27(4): 343-349.
- [12] 张培培,梁晨. 番茄叶霉病菌 ISSR-PCR 体系的建立[J]. 菌物研究, 2010, 8(2): 107-114.

Optimization of ISSR-PCR System for Sunflower Based on Orthogonal Design

LIANG Chun-bo

(Industral Crops Insititute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The development of sunflower industry plays an important role to adjust the structure of planting industry, use the middle and low yield fields and increase income of farmers. In order to promote sunflower molecular marker and molecular breeding, the orthogonal design was used to optimize ISSR-PCR amplification system at four levels of five factors in sunflower(template DNA, dNTPs, Mg^{2+} , primer and *Taq* DNA polymerase). The most suitable ISSR-PCR reaction system for sunflower was total 20 μ L containing 50 ng template DNA, 2.0 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 37.5 mmol \cdot L⁻¹ Mg^{2+} , 8 mmol \cdot L⁻¹ primer and 8 U *Taq* polymerase.

Key words: sunflower; orthogonal design; ISSR-PCR; reaction system; optimization