

亚麻耐盐碱 ISSR 标记引物筛选的研究

赵东升

(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:为选育耐盐碱亚麻品种,探讨亚麻耐盐碱分子辅助育种手段,以亚麻耐盐碱材料 7 000 ha⁻¹ 和不耐盐碱材料原 05-10 为材料,对 100 条 ISSR 引物进行了筛选。结果表明:筛选出 25 条在两个品种间有特异性的引物,为进一步 ISSR 标记应用于亚麻群体分析奠定基础。

关键词:亚麻;耐盐碱;特异性引物

中图分类号:S563.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)08-0012-02

亚麻是重要的天然纤维作物,是麻纺织业的重要原料,由于其独特的优良品质而日益受到人们的青睐。而目前国内亚麻纺织原料供应紧张,缺口严重,已经成为限制我国亚麻业发展的重要因素。黑龙江省西部盐碱地区年亚麻种植面积占全省的 30%。由于栽培技术及适宜本地栽培的优良品种的缺乏,使这一地区成为亚麻产质量较差的地区。进行亚麻耐盐碱品种育种的研究,对提高这一地区亚麻产量及质量有重要意义,对亚麻产业的合理发展也有很大的促进作用。

ISSR(Inter-simple sequence repeat)标记技术是在 SSR 基础上发展起来的一项新的标记技术,由于其引物设计比 SSR 简单,具有操作简单、稳定性高以及扩增产物特异性强等优点,在作物分子育种中被广泛研究。

该研究应用亚麻耐盐碱品种和不耐盐碱品种对 100 条 ISSR 引物进行筛选,以期对亚麻耐盐碱分子辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所采用的耐盐碱亚麻品种 7 000 ha⁻¹ 及不耐盐碱亚麻品种原 05-10 均由黑龙江省农业科学院经济作物研究所提供^[1]。试验所用 ISSR 引物共 100 条,由上海生物工程公司合成^[2-3]。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与浓度检测 取亚麻幼苗上部新长出的无病叶片,采用北京天根公司生产的 Plant Genomic DNA Kit 试剂盒提取基因组

DNA,0.8%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定 DNA 质量及浓度,稀释至 20 ng·μL⁻¹, -20℃保存。

1.2.2 ISSR 反应体系的建立 ISSR 反应总体系(20 μL),包括:3.5 U *Taq* DNA 聚合酶、10× buffer 2.5 μL、1 mM Mg²⁺、250 μM dNTPs、0.5 μM random primer、100 ng 模板 DNA。最后采用的 ISSR 优化反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min、52℃复性 1 min、72℃延伸 2 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min^[4-6]。

2 结果与分析

利用筛选出的亲本对 100 对 ISSR 进行引物的筛选,扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶(加入溴化乙锭 0.5 μg·ml⁻¹)进行电泳。电泳结束后在紫外灯下用凝胶扫描成像系统扫描记录(见图 1),筛选出特异性引物 25 对,其中,筛选出来的引物 U807,U827,U856 多态性较好,条带清晰丰富,可用于进一步进行 QTL 分析等的研究。

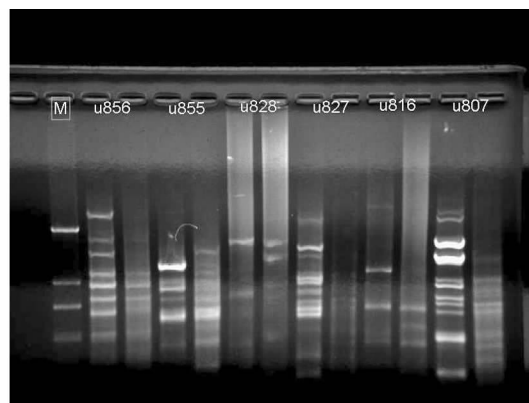


图 1 部分对亲本有特异性的引物

Fig.1 Specific primers to parents

收稿日期:2013-03-29

作者简介:赵东升(1976-),男,黑龙江省克山县人,硕士,助理研究员,从事亚麻栽培和育种研究。E-mail: zhaodongs2002@163.com.

通过此方法共筛选出特异性引物 25 对,筛选出的特异性引物序列见表 1。

表 1 筛选出的特异性引物序列
Table 1 The sequence of specific primers

| | | | |
|------|-------------------------|------|-----------------------------|
| U807 | AGA GAG AGA GAG AGA GT | U837 | TAT ATA TAT ATA TAT ART |
| U810 | GAG AGA GAG AGA GAG AT | U840 | GAG AGA GAG AGA GAG AYT |
| U811 | GAG AGA GAG AGA GAG AC | U855 | ACA CAC ACA CAC ACA CYT |
| U815 | CTC TCT CTC TCT CTC TG | U856 | ACA CAC ACA CAC ACA CYA |
| U816 | CAC ACA CAC ACA CAC AT | U857 | ACA CAC ACA CAC ACA CYG |
| U817 | CAC ACA CAC ACA CAC AA | U859 | TGT GTG TGT GTG TGT GRC |
| U825 | ACA CAC ACA CAC ACA CT | U860 | TGT GTG TGT GTG TGT GRA |
| U826 | ACA CAC ACA CAC ACA CC | U876 | GAT AGA TAG ACA GAC A |
| U827 | ACA CAC ACA CAC ACA CG | U888 | BDB CAC ACA CAC ACA CA |
| U828 | TGT GTG TGT GTG TGT GA | U889 | DBD ACA CAC ACA CAC AC |
| U830 | TGT GTG TGT GTG TGT GG | U890 | VHV GTG TGT GTG TGT GT |
| U831 | ATA TAT ATA TAT ATA TYA | U894 | TGG TAG CTC TTG ATC ANN NNN |
| U834 | AGA GAG AGA GAG AGA GYT | | |

注(Note):N=(A,G,C,T),R=(A,G),Y=(C,T),B=(C,G,T)(i. e. not A),D=(A,G,T)(i. e. not C),H=(A,C,T)(i. e. not G),V=(A,C,G)(i. e. not T),K=(G,T)(Keto in large groove),M=(A,C)(aMino in large groove),S=(G,C)(Strong [3 H-bonds]),W=(A,T)(Weak[2 H-bonds])

3 结论

ISSR 标记技术具有简便、稳定和 DNA 多态性高等优点,目前在许作物育种中得以广泛的研究利用,但在纤维亚麻分子育种中应用还较少。该试验在优化了 ISSR 反应体系的基础上,筛选出了 25 个对 2 个材料具有特异性的引物,为亚麻耐盐碱分子标记辅助育种提供理论依据。

参考文献:

[1] 赵东升. 亚麻耐盐碱品种筛选的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2011(7):11-12.

[2] 杨华,宋绪忠,尹光天,等. 黄藤 ISSR 反应体系的条件优化[J]. 福建林学院学报,2006(2):19-22.

[3] 罗估,伍贤进,彭帅,等. 翻白草总 DNA 的提取与 ISSR-PCR 体系的建立与优化[J]. 安徽农业科学,2008,(3):21-25.

[4] 宋晓兵,彭埃天,刘景梅,等. ISSR 分子标记及其在中国南方果树上的应用[J]. 广东农业科学,2009,(7):17-19.

[5] 易琼,殷海滨,龚丽琼,等. 8 个云南主要栽培梨品种亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 安徽农业科学,2009(2):28-30.

[6] 赵东升,吴建忠,黄文功,等. 亚麻耐盐碱 ISSR 分子标记反应体系的建立[J]. 中国麻业科学 2012(2):201-204.

Reaction of ISSR Molecular Marker Primers Screening
for Saline-alkali Tolerant Flax

ZHAO Dong-sheng

(Institute of Industrial Crops of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to breed saline-alkali tolerant flax varieties for saline-alkali tolerant molecular assisted breeding means of flax. Taking two saline-alkali tolerant flax varieties 7 000 ha-1 and 05-10 as materials,100 pairs of ISSR primers were screened. The results showed that 25 pairs of primers had specific between two varieties and that would be a foundation for analyzing groups of flax.

Key words: flax; saline-alkali tolerant; specific primers