

唐莹莹, 杨祥燕, 蔡元保, 等. 澳洲坚果 SSR-PCR 反应体系优化及其应用 [J]. 福建农业学报, 2018, 33 (2): 154—158.

TANG Y-Y, YANG X-Y, CAI Y-B, et al. Optimization and Application of SSR-PCR Reaction System for Macadamia [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33 (2): 154—158.

澳洲坚果 SSR-PCR 反应体系优化及其应用

唐莹莹¹, 杨祥燕¹, 蔡元保^{1*}, 李穆¹, 曾黎明¹, 郑文武¹, 邱文武², 李季东¹, 叶维雁¹

(1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 广西 南宁 530001;

2. 广西壮族自治区农业科学院园艺研究所, 广西 南宁 530007)

摘要: 以澳洲坚果 DNA 为模板, 通过单因素设计方法对影响 SSR-PCR 反应体系的 5 个主要因素进行了优化。结果表明, 澳洲坚果 SSR-PCR 反应体系的最适条件为: 20 μL 的反应体系中, 包含 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 模板 DNA, 1.0 U *Taq* 聚合酶, 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物和 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs。采用该反应体系对不同引物和 15 份澳洲坚果种质进行验证, 扩增条带的可靠性和稳定性良好, 且分辨率较高。因此, 该 SSR-PCR 反应体系可用于澳洲坚果种质源鉴定及遗传多样性分析研究。

关键词: 澳洲坚果; SSR-PCR; 体系优化; 单因素设计

中图分类号: S 184

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2018) 02—154—05

Optimization and Application of SSR-PCR Reaction System for Macadamia

TANG Ying-ying¹, YANG Xiang-yan¹, CAI Yuan-bao^{1*}, LI Mu¹, ZENG Li-ming¹, ZHENG Wen-wu¹,
QIU Wen-wu², LI Ji-dong¹, YE Wei-yan¹

(1. *Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning, Guangxi 530001, China*; 2. *Horticultural Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China*)

Abstract: Five major factors of the SSR-PCR reaction system were optimized for genomic DNA of macadamia (*Macadamia* spp.) by a single factor design. The volume of optimum reaction system was 20 μL that consisted of 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ template DNA, 1.0 U *Taq* polymerase, 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ primer and 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs. On 15 germplasms of macadamia using different SSR primers, the system proved to be reliable and stable in the amplification bands with high resolution. Consequently, it seemed adequate for the identification and genetic diversity analysis of macadamia germplasms.

Key words: macadamia; SSR-PCR; system optimization; single factor design

澳洲坚果 *Macadamia* spp. 是山龙眼科 Proteaceae 澳洲坚果属 *Macadamia* 常绿乔木, 原产于澳大利亚昆士兰与新南威尔的亚热带雨林, 是中国南方发展起来的新兴果树, 在云南、广西、广东、贵州、福建等地均有种植。澳洲坚果营养价值和经济价值高, 风味独特, 享有“干果皇后”的美誉。目前, 有关澳洲坚果种质资源的研究主要集中

在形态学特征描述和遗传多样性分析^[1], 在分子水平上通过同工酶技术^[2,3]和分子标记技术, 如 RAPD^[4]、AFLP^[5]、ISSR^[6] 和 SCoT^[7] 等初步对澳洲坚果进行种质鉴定和遗传多样性研究, 但对其种质资源的遗传背景缺乏深入研究。

SSR (simple sequence repeats) 即简单序列重复, 又称微卫星 DNA (microsatellite DNA), 是

收稿日期: 2017—11—20 初稿; 2018—01—20 修改稿

作者简介: 唐莹莹 (1986—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 植物病理学研究 (E-mail: tying1986@126.com)

并列第一作者: 杨祥燕 (1984—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 果树生理与分子生物学

* 通讯作者: 蔡元保 (1981—), 男, 硕士, 高级农艺师, 研究方向: 植物生理与分子生物学研究 (E-mail: caiyuanbao205@163.com)

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2016GXNSFBA380005); 广西创新驱动发展专项 (桂科 AA17204058-4、桂科 AA17204058-8);

广西直属公益性科研院所基本科研业务费专项 (桂热研 201803、桂热研 201710); 广西农业科学院科技发展基金资助项目 (桂农科 2017JM15); 南宁市科学研究与技术开发计划项目 (20172154-1)

由少数几个核苷酸(一般为1~6个)为单位多次串联重复的DNA序列,具有操作简便、多态性强、遗传信息量大、共显性遗传等特点。目前,SSR标记技术在芒果^[8]、桃^[9]、板栗^[10]等果树种质资源的遗传多样性分析及种质鉴定等方面具有广泛的应用。但是,基于转录组开发的澳洲坚果SSR标记在其种质资源的遗传多样性研究中国内还未见报道。基于前期的研究基础^[7,11~12],本研究利用单因素试验设计方法,对影响澳洲坚果SSR-PCR反应体系的主要因素进行优化,建立最适澳洲坚果SSR-PCR的反应体系,为SSR标记在澳洲坚果种质资源鉴定、遗传多样性分析和指纹图谱构

建等方面提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料澳洲坚果 *Macadamia* spp. 种质均取自广西亚热带作物研究所澳洲坚果种质资源圃,15份供试材料包括光壳种 *Macadamia integrifolia*、粗壳种 *Macadamia tetraphylla* 及两者的杂交种(表1)。其中A16品种用于反应体系优化,其余材料用于优化后反应体系的稳定性和可靠性检测。所有供试材料均从健康植株采集的幼叶,液氮速冻后于-70℃保存备用。

表1 供试澳洲坚果种质的编号、名称、类型及原产地
Table 1 Codes, names, types and origins of tested macadamia germplasms

编号	种质名称	种质类型	原产地
1	HVA4(A4)	杂交种 Hybrid	澳大利亚昆士兰州
2	HVA16(A16)	杂交种 Hybrid	澳大利亚昆士兰州
3	Renown(D4)	杂交种 Hybrid	澳大利亚昆士兰州
4	HY	杂交种 Hybrid	澳大利亚昆士兰州
5	Hinde(H2)	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	澳大利亚昆士兰州
6	Own Choice(O. C.)	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	澳大利亚昆士兰州
7	T2	粗壳种(<i>Macadamia tetraphylla</i>)	澳大利亚昆士兰州
8	DND	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	澳大利亚昆士兰州
9	D. Bown	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	澳大利亚昆士兰州
10	NG-18	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	不详
11	Ronik	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	澳大利亚昆士兰州
12	HAES109	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	美国夏威夷
13	HAES114	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	美国夏威夷
14	HAES246(Keauhou)	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	美国夏威夷
15	HAES294(Purvis)	光壳种(<i>Macadamia integrifolia</i>)	美国夏威夷

1.2 DNA 提取与检测

参照蔡元保等^[7]的方法提取澳洲坚果基因组DNA,用含有核酸染料的1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度。用Biophotometre型核酸蛋白仪检测其纯度,稀释至50 mg·L⁻¹,置于-20℃保存备用。

1.3 SSR-PCR 反应体系的单因素优化设计

SSR基本反应体系组成为:30 mg·L⁻¹模板DNA,1.0 U *Taq*聚合酶,2.0 mmol·L⁻¹ Mg²⁺,0.6 μmol·L⁻¹引物,0.3 mmol·L⁻¹dNTPs和2 μL 10×PCR buffer,最后用无菌超纯水补足至20 μL。

选取澳洲坚果A16品种为DNA模板,(1)以引物MS78(正向引物:5'-ATT GAG TGC AGC

CCA GAC TT-3';反向引物:5'-GTA GCC AGT CCC GTT TAG CA-3');(2)引物MS183(正向引物:5'-AAG GGA GCT CCA ACT TCA CA-3';反向引物:5'-CAC CCC TGC ACT TCC TAC AT-3')分别对影响反应的5个主要因素(模板DNA、*Taq*聚合酶、Mg²⁺、引物、dNTPs)进行单因素优化分析,每个因素分别设置5个浓度梯度。以SSR基本反应体系组成为基础,在保持其他因素一致不变的条件下,变化单一因素的浓度,筛选出最适浓度。其中,模板DNA浓度依次为:10、20、30、40、50 mg·L⁻¹;*Taq*聚合酶浓度依次为:0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 U;Mg²⁺浓度依次为:1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol·L⁻¹;

L^{-1} ; 引物浓度依次为: 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$; dNTPs 浓度依次为: 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\text{mmol} \cdot L^{-1}$ 。

1.4 PCR 扩增与检测

PCR 扩增程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 52℃复性 45 s, 72℃延伸 90 s, 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。PCR 产物在含有核酸染料的 1.8% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 电泳缓冲液为 0.5×TBE。电泳结束后, 于凝胶成像系统上检测并拍照。

1.5 SSR-PCR 最优反应体系验证

根据以上试验结果确定的 SSR-PCR 最佳反应体系, 选用引物 MS78 和引物 MS183 分别对 15 份供试材料进行 PCR 扩增, 检验该反应体系的稳定性和可靠性。

2 结果与分析

2.1 澳洲坚果基因组 DNA 的浓度及质量检测

琼脂糖凝胶电泳检测结果显示 (图 1), 15 份澳洲坚果供试材料的基因组 DNA 条带清晰, 无拖尾现象, 浓度较高。核酸蛋白仪检测 DNA 质量结果表明, 在 260、280 nm 波长下的 OD 值, 所有供

试材料基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8~2.0, 纯度较高, 可以直接用于 PCR 扩增。

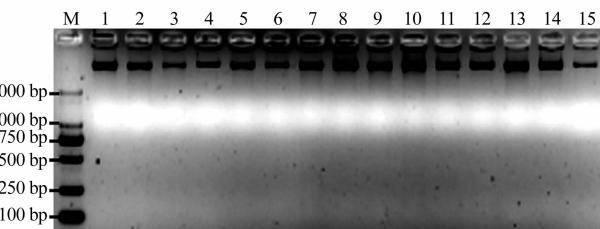


图 1 15 份澳洲坚果基因组 DNA 的电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA on 15 samples

注: M 为 DNA marker, DL 2 000; 1~15 材料编号同表 1。

2.2 SSR-PCR 反应体系的单因素优化试验

2.2.1 模板 DNA 浓度对 SSR-PCR 的影响 模板 DNA 浓度对 SSR-PCR 影响的结果显示 (图 2-A 和图 2-B 中泳道 1~5), 当浓度为 $10 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, 扩增的条带很少; 当浓度为 $20 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, 条带有所增加; 当浓度增加至 $30 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, 扩增的条带数更多, 颜色更深; 而浓度为 40 、 $50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, 扩增的条带颜色虽然加深, 但扩增的条带数与浓度为 $30 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时一样多。因此, 选择 $30 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 作为模板 DNA 的最适宜浓度。

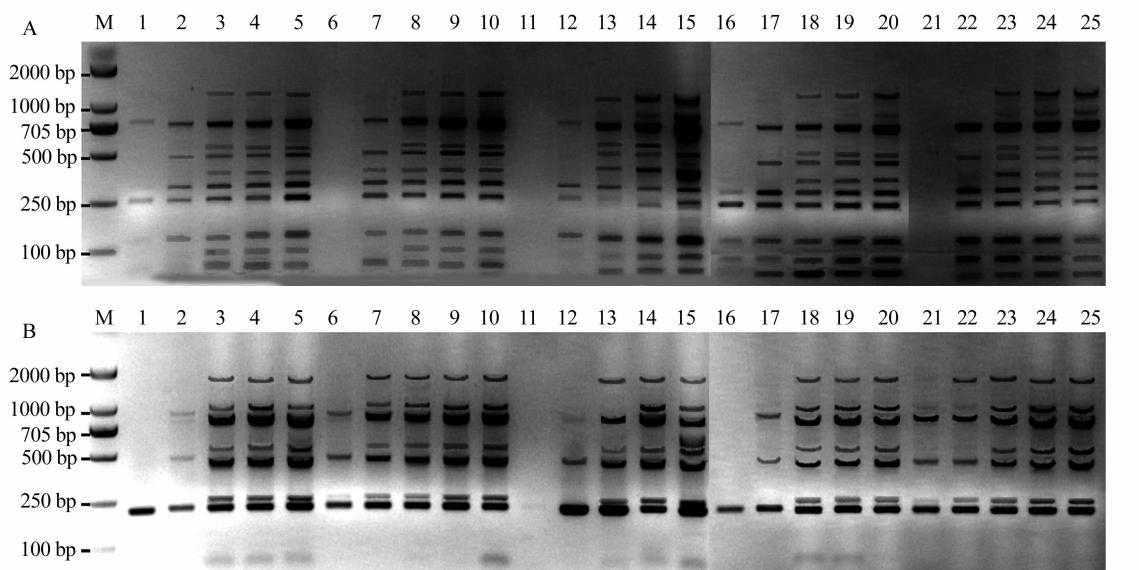


图 2 模板 DNA、*Taq* 聚合酶、 Mg^{2+} 、引物 (A: MS78; B: MS183) 和 dNTPs 浓度对 SSR-PCR 反应的影响

Fig. 2 Effects of 5 major factors in SSR-PCR reaction system (A: primer MS78; B: primer MS183)

注: M 为 DNA marker, DL 2 000; 1~5 为 10 、 20 、 30 、 40 、 $50 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 模板 DNA; 6~10 为 0.25 、 0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 U *Taq* 聚合酶; 11~15 为 1.0 、 1.5 、 2.0 、 2.5 、 $3.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ Mg^{2+} ; 16~20 为 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 $1.0 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 引物; 21~25 为 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ dNTPs。

2.2.2 *Taq* 聚合酶浓度对 SSR-PCR 的影响

Taq 聚合酶浓度对 SSR-PCR 影响的结果显示 (图

2-A 和图 2-B 中泳道 6~10), 当浓度为 0.25 U 时, 没有扩增出条带或者条带很少; 当浓度为 0.5 U

时, 扩增的条带有所增加; 当浓度为 1.0 U 时, 扩增的条带数达到最多; 而当浓度再升高至 1.5、2.0 U 时, 扩增出的条带数不再增加, 颜色虽然不断加深, 但浓度越高, 拖尾现象越严重。因此, 选择 1.0 U 作为 *Taq* 聚合酶的最适浓度。

2.2.3 Mg^{2+} 浓度对 SSR-PCR 的影响 Mg^{2+} 浓度对 SSR-PCR 影响的结果显示(图 2-A 和图 2-B 中泳道 11~15), 当浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 都没有扩增出条带; 当浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增的条带数少, 且带型模糊, 颜色较浅; 当浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增的条带数均有增加; 当浓度为 2.5 、 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增的条带数最多, 但浓度越高, 越有拖尾现象。因此, 选择 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为反应体系的最适 Mg^{2+} 浓度。

2.2.4 引物浓度对 SSR-PCR 的影响 引物浓度对 SSR-PCR 影响的结果显示(图 2-A 和图 2-B 中泳道 16~20), 当浓度为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增出条带数很少; 当浓度为 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增的条带数不断增加; 当浓度为 0.6 、 0.8 、 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增出的条带数基本不再增减, 条

带也清晰可见。从经济角度考虑, 选择 $0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为引物的最适浓度。

2.2.5 dNTPs 浓度对 SSR-PCR 的影响 dNTPs 浓度对 SSR-PCR 影响的结果显示(图 2-A 和图 2-B 中泳道 21~25), 当浓度为 0.1 、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增的条带数随着 dNTPs 浓度的增加而增加; 当浓度为 0.3 、 0.4 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增的条带数增加基本不变。因此, 选择 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 dNTPs 的最适浓度。

2.3 澳洲坚果 SSR-PCR 最优反应体系验证

综合以上结果可见, 在总体积 $20 \mu\text{L}$ 的澳洲坚果 SSR-PCR 反应体系中, 包含 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 模板 DNA, 1.0 U *Taq* 聚合酶, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , $0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物和 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs。选用引物 MS78 和 MS183 分别对供试的 15 个澳洲坚果种质进行 PCR 扩增。结果表明(图 3), 15 个澳洲坚果种质均可以扩增出清晰、重复性好、多态性高的条带, 说明该反应体系具有较好的稳定性和重复性及较高的分辨率, 适用于澳洲坚果 SSR-PCR 分析。

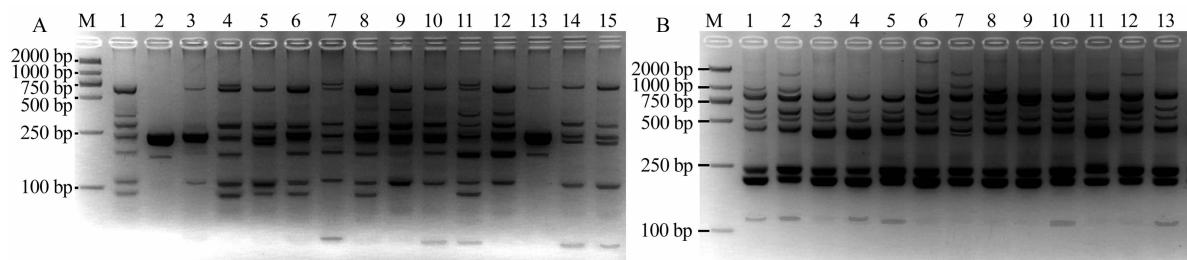


图 3 引物 MS78 (A) 和引物 MS183 (B) 对 15 份澳洲坚果种质的 SSR-PCR 扩增

Fig. 3 SSR-PCR amplifications of 15 macadamia germplasms using primer MS78 (A) and primer MS183 (B)

注: M 为 DNA marker, DL 2000; 1~15 材料编号同表 1。

3 讨论与结论

SSR 标记具有重复性和稳定性强以及共显性等优点, 已在多种植物中广泛应用^[13], 但仅从 SSR-PCR 体系优化方面来看, 不同的材料 PCR 反应体系差别较大。SSR 标记是基于 PCR 扩增基础之上的, 而 PCR 扩增反应涉及诸多因素, 如反应条件(模板 DNA、*Taq* 聚合酶、 Mg^{2+} 、引物和 dNTPs 浓度等 5 个主要影响因素)、扩增程序等, 且每个因素对扩增效率都会产生影响。因此, 有必要对澳洲坚果 SSR-PCR 反应体系进行优化。

本研究通过单因素试验对影响澳洲坚果 SSR-PCR 反应体系的 5 个主要因素进行了优化, 建立了

澳洲坚果最适的 SSR-PCR 反应体系: $20 \mu\text{L}$ 的反应体系中, 包含 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 模板 DNA, 1.0 U *Taq* 聚合酶, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , $0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物和 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs。试验结果表明, 不同浓度的 5 个因素, 扩增结果在条带的明亮度、清晰度和数量上均有差别, 其中受 Mg^{2+} 的影响比较明显。随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 扩增结果的条带数和清晰度有所增加, 但是随着浓度的进一步增加, 虽然条带数也在增加, 可是拖尾现象越严重。而其他因素在浓度较低时, 扩增不出条带或者扩增的条带数较少; 当浓度达到一定范围, 扩增的条带数基本不变, 仅是扩增条带颜色深浅的变化。在冬瓜^[14] 和红椿^[15] 等植物的 SSR-PCR 反应体系研究表明,

Mg^{2+} 浓度是影响 SSR-PCR 反应体系最大的因素, 与本研究结论相同。但是, 在油菜^[16]和蚕豆^[17]等植物的 SSR-PCR 反应体系研究表明, Mg^{2+} 和 dNTPs 浓度对 SSR-PCR 反应体系的影响不大, 这可能是由于不同模板 DNA 造成的结果。

本研究利用优化好的反应体系, 在不同引物和不同澳洲坚果材料中进行验证, 均能扩增出清晰、重复性好、多态性高的谱带, 表明经过优化确立的 SSR-PCR 反应体系稳定可靠, 可适用于澳洲坚果 SSR 分析, 也可为后续基于 PCR 扩增反应的澳洲坚果相关试验提供一定理论和技术基础。

参考文献:

- [1] 贺熙勇, 倪书邦, 陈国云, 等. 澳洲坚果种质资源形态性状的遗传多样性分析[J]. 中国农学通报, 2010, 26(3): 206—215.
- [2] VITHANAGE V, WINKS C W. Isozymes as genetic markers for *Macadamia* [J]. Sci Hort, 1992, 49 (1/2): 103—115.
- [3] ARADHYA M K, YEE L K, ZEE F T, et al. Genetic variability in macadamia [J]. Genet Resour Crop Ev, 1998, 45 (1): 19—32.
- [4] VITHANAGE V, HARDNER C, ANDERSON K L, et al. Progress made with molecular markers for genetic improvement of macadamia [J]. Acta Hort, 1998, 461 (8): 199—208.
- [5] STEIGER D L, MOORE P H, ZEE F, et al. Genetic relationships of macadamia cultivars and species revealed by AFLP markers [J]. Euphytica, 2003, 132 (3): 269—277.
- [6] 郭凌飞, 邹明宏, 杜丽清, 等. 利用 ISSR 分析澳洲坚果的亲缘关系 [J]. 园艺学报, 2011, 38 (9): 1741—1746.
- [7] 蔡元保, 杨祥燕, 陈显国, 等. 澳洲坚果 SCoT 反应体系的建立及应用 [J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21 (3): 253—258.
- [8] 罗纯, 武红霞, 姚全胜, 等. 芒果转录组中 SSR 位点信息分析与引物筛选 [J]. 热带作物学报, 2015, 36 (7): 1261—1266.
- [9] 周平, 郭瑞, 张小丹, 等. SSR 分析 50 份桃种质资源遗传多样性 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (1): 47—50.
- [10] 江锡兵, 汤丹, 龚榜初, 等. 基于 SSR 标记的板栗地方品种遗传多样性与关联分析 [J]. 园艺学报, 2015, 42 (12): 2478—2488.
- [11] 蔡元保, 杨祥燕, 陈豪军, 等. SRAP 结合 SCoT 标记分析番木瓜种质的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15 (2): 292—298.
- [12] 杨祥燕, 蔡元保, 郭凌飞, 等. 番木瓜 SCoT 反应体系建立及引物筛选 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(6): 578—584.
- [13] 罗冉, 吴委林, 张吻, 等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1): 137—143.
- [14] 潘珍珍, 吴才君, 刘文睿, 等. 冬瓜 SSR-PCR 体系优化及引物筛选 [J]. 分子植物育种, 2015, 13 (4): 898—902.
- [15] 漆欣, 鲁好君, 赵帅, 等. 红椿 SSR-PCR 体系建立和多态性引物筛选 [J]. 林业科学研究, 2016, 29 (4): 565—570.
- [16] 冯旭东, 徐玲玲, 张凯凯, 等. 甘蓝型油菜 SSR-PCR 体系优化 [J]. 山地农业生物学报, 2015, 34 (6): 30—36.
- [17] 沙伟超, 侯万伟, 刘玉皎, 等. 蚕豆 SSR-PCR 体系建立及优化 [J]. 青海大学学报, 2017, 35 (2): 13—18, 27.

(责任编辑: 黄爱萍)