

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2018.05.004

珍稀濒危植物五小叶槭 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化

郝云庆¹, 罗晓波^{2,3*}, 王晓玲⁴

(1. 成都信息工程大学资源环境学院, 四川 成都 610225; 2. 四川省自然资源科学研究院, 四川 成都 610041;
3. 峨眉山生物资源实验站, 四川 峨眉山 614201; 4. 凉山州劳动职业技术学校, 四川 西昌 615000)

摘要:五小叶槭为珍稀濒危植物,在研究被子植物的系统发育和古地理、古气候等方面具有重要的科学价值。本研究采用 2XTaqMaster Mix,综合考虑 Taq 酶、Mg²⁺ 和 dNTPs,对影响五小叶槭 ISSR-PCR 反应的 3 个因素(DNA 模板、引物和 Master Mix)进行 3 水平正交试验,从而优化出五小叶槭 ISSR-PCR 反应最佳体系。结果表明,引物用量对反应结果影响最大,其次为 DNA 模板,2XTaqMaster Mix 对反应结果影响最小。最佳反应体系(25 μL)为:DNA 模板(50 ng · μL⁻¹)1 μL,引物 2 μL,2XTaqMaster Mix 13.5 μL。

关键词:五小叶槭;ISSR-PCR 反应体系优化;引物筛选;正交设计

中图分类号:S792.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5508(2018)05-0017-05

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Acer pentaphyllum*

HAO Yun-qing¹ LUO Xiao-bo^{2,3*} WANG Xiao-lin⁴

(1. College of Resources and Environment, Chengdu University of Information Technology, Chengdu 610225, Sichuan, China;
2. Sichuan Academy of Natural Resource Sciences, Chengdu 610024, Sichuan, China;
3. Emei Mountain Resource Experimental Station, Mount Emei 614201, China;
4. Liangshan Vocational and Technical School, Xichang 615000, Sichuan, China)

Abstract: *Acer pentaphyllum* is a kind of rare and endangered plants and it has important scientific value in studying angiosperm's phylogeny, paleogeography and paleoclimate. In this study, 2XTaq Master Mix was adopted and the effect of Taq polymerase, dNTPs and Mg²⁺ were considered aiming to establish and optimize the best ISSR-PCR reaction system for *Acer pentaphyllum*. The results showed that the most remarkable factor was primers, followed by DNA template, and 2X Master Mix had the least effect on the reaction result. The optimum reaction system (25 μL) was 1 μL of DNA template (50 ng · μL⁻¹), 2 μL of primer and 13.5 μL of 2XTaq Master Mix.

Key words: *Acer pentaphyllum*, Optimization of ISSR-PCR system, Primers screening, Orthogonal design

五小叶槭(*Acer pentaphyllum*),是中国四川特有物种,属于槭树科,槭属落叶乔木。根据 IUCN 濒危

收稿日期:2018-04-10

基金项目:四川省科技厅科技支撑计划“五小叶槭种质资源抢救性收集、保存、繁育研究(2014NZ0109)”;成都信息工程大学科研基金资助(KYTZ201746)。

作者简介:郝云庆(1976-),男,副教授,主要从事环境保护监测与生物多样性保护等研究工作。e-mail:Haoyunqing@cuit.edu.cn

*通讯作者:罗晓波(1971-),男,研究员,主要从事野生动植物保护、园林植物与观赏园艺、资源植物开发与利用等方面研究。e-mail:aaaaluoxiaobo@163.com

等级标准(IUCN 1994),该种已属于极危物种^[1~2]。目前为至,仅在四川省雅江县米龙乡^[2],九龙县三岩龙乡和呷尔镇洛莫村^[3],康定县普沙绒乡,以及木里县卡拉乡5处发现有分布。近年来,随着分子生物学技术的发展,建立在PCR基础上的各种分子标记技术在珍稀濒危动植物保护中得到越来越广泛的应用^[4~6]。分子标记可在分子水平上直接反应物种遗传多样性^[7~9]。RFLP、RAPD、SSR、CAPS和ISSR等是目前常用的分子标记^[10~12]。

简单序列重复区间扩增多态性(Inter Simple Sequence Repeat,ISSR)是Zietkiewicz等创立的一种新型的分子标记技术^[12]。它综合了其他分子标记技术的优点,比RFLP、RAPD和SSR反映更丰富的多态性;ISSR分子标记为显性标记,稳定性较好,无需知道物种SSR背景,一套ISSR引物可以在多个物种中共用,保证PCR扩增反应的重复性^[13~16]。因而,ISSR分子标记技术已经被广泛用于物种鉴定及分类、亲缘关系鉴定和遗传多样性分析当中^[17],从而为探讨珍稀濒危动植物种群的进化机制,预测小种群未来发展趋势起着至关重要的作用。

确定PCR反应最佳的反应体系是ISSR分子标记成功与否的关键^[18],能为下一步研究打下良好基础。目前,大部分反应体系通常分别研究Taq酶、Mg、dNTPs、引物和DNA模板共5个因素对反应的影响,通常处理多,工作量比较大,分析繁杂。本文中采用目前市面上的PCR反应预装混合液Master Mix,对Taq酶、dNTPs和Mg²⁺这3个因素综合考虑,这样既可以减少试验因素,又能获得较好的试验结果^[10]。五小叶槭ISSR-PCR反应体系的优化目前尚属研究空白,本研究旨在从DNA模板、引物和Master Mix共3个因素优化五小叶槭ISSR-PCR反应体系,为进一步对五小叶槭种群遗传多样性分析和保护遗传学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

分别在雅江县米龙乡,九龙县三岩龙乡和呷尔镇洛莫村,康定县普沙绒乡,以及木里县卡拉乡5处五小叶槭居群采集叶片组织样品(各样本间距离>20m),不同植株随机选择3~5片无病虫害新鲜幼嫩叶片,硅胶快速干燥保存备用。提取五小叶槭基因组DNA试剂盒,以及用于ISSR-PCR反应的2x Master PCR Mix,DL2000 Marker和ISSR引物均购置

于北京擎科新业生物技术有限公司(www.tsingke.net)。所选用的ISSR引物根据加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第9套ISSR引物序列进行初步筛选,选择UBC807(AGA GAG AGA GAG AGA GT)正交实验引物固定引物,UBC809(AGA GAG AGA GAG AGA GG)作为最佳反应条件验证引物。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取和检测

采集的五小叶槭叶片选用北京擎科新业生物技术有限公司植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA的提取,操作步骤按照试剂盒说明书进行。配制0.8%的琼脂糖凝胶进行五小叶槭基因组DNA完整性和浓度的检测。将DNA模板浓度统一稀释至50ng/ μ L,将稀释好的DNA保存于-20℃备用。

1.2.2 ISSR-PCR各反应因素的确定

试验采用2X Master PCR Mix,里面包含有dNTPs,Mg²⁺以及Taq酶,减少了反应影响因素,可以较好的控制实验,对试验进行综合评价。对影响ISSR-PCR反应的3个因素(DNA模板,引物和Mix),按照L₉(3³)三因素三水平进行正交实验(见表1)。

表1 五小叶槭ISSR-PCR反应体系各因素水平

Tab.1 The levels and factors of ISSR-PCR reaction system

因素 Factors	水平 Levels		
	I	II	III
DNA模板/ μ L DNA Template	1	2	3
引物/ μ L Primers	1	2	3
Master Mix/ μ L	11.5	12.5	13.5

1.2.3 ISSR-PCR扩增测序及扩增产物检测

PCR反应采用25 μ L扩增体系,各反应如表2所示,用ddH₂O补足25 μ L。PCR扩增程序为:94

表2 PCR反应因素水平的L₉(3³)正交设计方案

Tab.2 L₉(3³) orthogonal design for different factors and levels of PCR reaction

编号 No.	DNA模板(μ L) DNA Template	引物(μ L) Primers	Master Mix (μ L)
1	1	1	11.5
2	1	2	12.5
3	1	3	13.5
4	2	3	11.5
5	2	1	12.5
6	2	2	13.5
7	3	2	11.5
8	3	3	12.5
9	3	1	13.5

℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 52 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min 30 s, 35 个循环, 72 ℃总延伸 5 min, 8 ℃保存。取 10 μL PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果检测

本次实验一次性同时提取 6 份不同个体五小叶槭叶片 DNA。电泳结果显示, 提取 DNA 效果较好, 点样孔干净, 无蛋白污染, 条带清晰单一, 浓度较高, 无明显降解, 比较完整(见图 1)。

2.2 ISSR-PCR 扩增产物检测及评分

按照表正交设计的 9 个处理进行 PCR 扩增, 为了减少试验误差, 每个处理设置 3 个重复。从琼脂

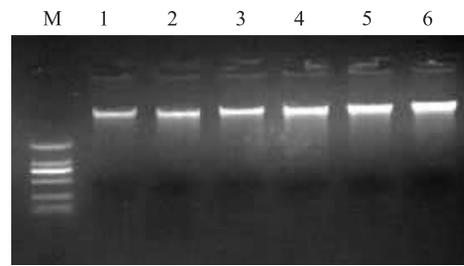


图 1 DNA 提取电泳图

M 为 DL2000 Marker, 1~6 为份不同个体五小叶槭叶片 DNA

Fig. 1 The extraction of template DNA

糖凝胶电泳结果看出 9 个反应均出现扩增条带(见图 2)。根据电泳结果, 将 9 个处理从高到低依次打分(见表 3)。条带清晰度高、数量丰富、背景干扰低的最优产物记为 9 分, 而最差产物记为 1 分, 3 个重复分别独立统计。

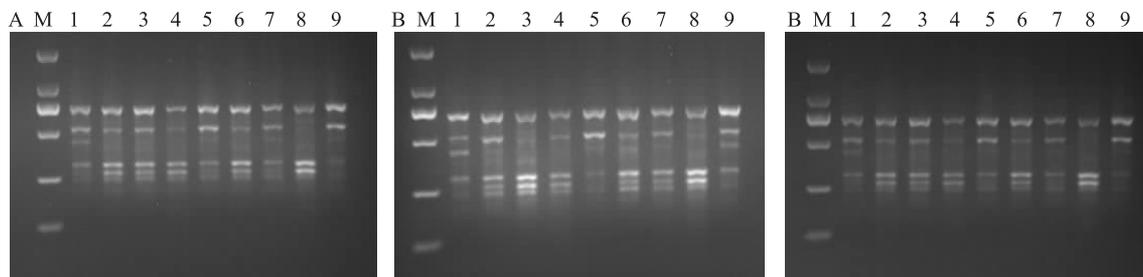


图 2 ISSR-PCR 反应扩增产物电泳结果图

A, B, C 为 3 个重复结果, 1~9 为表 2 中对应的 9 个处理, M 为 DL2000 Marker

Fig. 2 ISSR-PCR reaction effect of agarose gel electrophoresis. A, B, C mean three repeats

表 3 正交设计中 9 个处理综合评分结果

Tab. 3 Scores of 9 treatments in orthogonal

重复 Repeat	评分 Score								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	1	8	9	6	1	8	7	1	1
II	1	8	7	6	1	8	7	1	1
III	1	8	9	6	1	7	7	1	1

2.3 各因素之间对五小叶槭 ISSR-PCR 反应影响差异分析

上述各处理评分结果利用 DPS 7.05 统计软件进行方差分析(见表 4)。从 F 值可以看出, 引物浓度对五小叶槭 ISSR-PCR 反应影响最大, 其次为模板 DNA 浓度。各因素水平变化对 ISSR-PCR 反应影响顺序为: 引物 > DNA 模板 > Master Mix。并且各因素水平间的差异均达到极显著水平, 因而可以更进一步对各因素内进行多重比较分析。

表 4 五小叶槭 ISSR-PCR 反应各因素间方差分析

Tab. 4 Analysis of variance among factors

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
DNA 模板	36.2222	2	18.1111	97.8	0.0001
引物	197.5556	2	98.7778	533.4	0.0001
Master Mix	24.6667	2	12.3333	66.6	0.0001
误差	3.3333	18	0.1852		

2.4 因素内各水平对五小叶槭 ISSR-PCR 扩增结果的影响

为了获得各水平最优的反应条件, 对各因素内进行多重比较分析。由 F 值可知, 引物浓度为 3 个优化因素中对 PCR 反应影响最大的。在 25 μL 反应体系中, 引物浓度为 0.4 μmol · L⁻¹、0.8 μmol · L⁻¹、1.2 μmol · L⁻¹ 3 个水平间差异达到极显著水平, 在引物浓度为 0.8 μmol · L⁻¹ 水平时表现最好。因此, 确定引物浓度为 0.8 μmol · L⁻¹ 作为最佳反应引物浓度。

DNA 模板浓度在影响五小叶槭 ISSR-PCR 反应的因素中处于第 2 位。在 25 μL 反应体系中, DNA 模板为 50 ng、100 ng、150 ng 这 3 个水平间差异达到极显著, 且随着模板量增加, 反应平均得分降低。由此, 选择 50 ng 的 DNA 模板用量作为最佳水平。

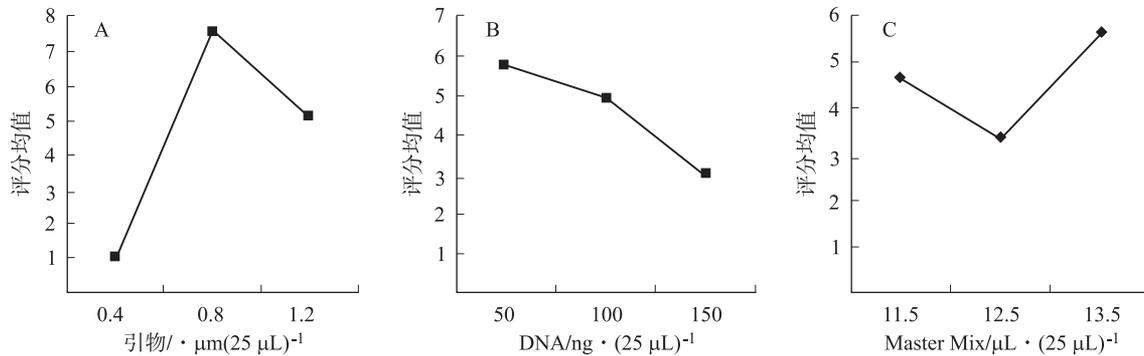


图3 因素内各水平间与评分均值关系

Fig. 3 The relationship between the levels of the factors and the mean score

2.5 对最佳反应体系的验证

用 ISSR 引物 UBC809 对 6 份不同个体的五小叶槭进行反应最佳体系验证, 琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增条带清晰, 重复性好。上述最佳反应体系可进行下一步五小叶槭群体遗传多样性研究(见图 4)。

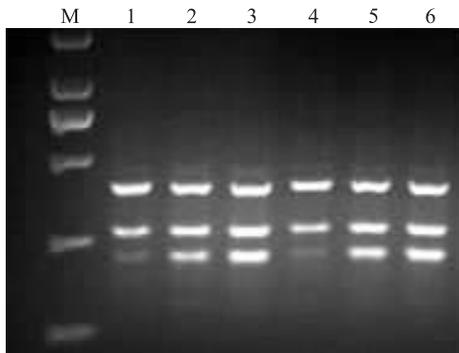


图4 ISSR-PCR 最佳反应体系验证结果

M 为 DL2000 Marker, 1~6 为引物 UBC809 扩增 6 份不同五小叶槭 DNA 模板电泳结果

Fig. 4 The verification results of the optimized ISSR-PCR system

3 结论与讨论

ISSR 分子标记技术是基于 PCR 反应基础上的分子标记技术, 目前通常以 DNA 模板、引物浓度、 Mg^{2+} 、dNTPs 以及 taq 酶为主要因素研究其对 PCR 反应的影响, 并确定最佳适合研究材料的反应体

系[19~20]。虽然根据方差分析, Master Mix 用量对 PCR 反应结果影响最小, 但是根据 25 μL 反应体系中, Master Mix 用量为 13.5 μL 时得分最高。因而, 选用 13.5 μL 作为 Master Mix 的最佳用量(见图 3)。

系[19~20]。利用 2X Master Mix 将 Mg^{2+} 、dNTPs 以及 taq 酶这 3 个因素进行综合考虑, 进行 ISSR-PCR 试验还未见有人报道。本试验采用 2X Master Mix, 减少试验误差, 提高效率, 增强稳定性。采用正交设计的方法, 对影响 PCR 反应的 DNA 模板、引物和 Master Mix 共 3 个因素进行优化, 通过 DPS 统计软件分析结果表明各因素水平变化对 ISSR-PCR 反应影响顺序为: 引物 > DNA 模板 > Master Mix, 并最终确立五小叶槭 ISSR-PCR 最佳反应体系 (25 μL) 为 1 μL DNA 模板 (50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、2 μL 引物 (10 μM) 和 13.5 μL Master Mix。同时通过最佳体系验证试验, 结果稳定, 条带清晰。这就为应用 ISSR 分子标记技术进行五小叶槭的遗传多样性研究奠定技术基础。

结果表明, 五小叶槭种群间基因分化系数 G_{st} 为 0.3722, 远远高于 Hamrick 和 Godt (1989) 统计的长寿命木本植物 G_{st} 平均值 (0.073), 这说明五小叶槭种群起源较为古老, 种间分化已达到了较高的水平。

五小叶槭属于雅砻江中游干旱河谷地区的特有种, 对于干旱河谷环境的适生性普遍优于其它物种, 因此, 这样的特化也使它的分布仅局限于这一狭窄的区域。可见, 五小叶槭的致危因素并不是来自于其它物种间竞争的压力。在实地调查中也发现, 五小叶槭种群不会形成单一优势种的群落结构, 而是与多种物种呈共优的局面; 所以, 五小叶槭群落的

保育也不必追求单一优势种的群落结构。调查发现,五小叶槭的结实能力较强,种子散落后也能完成自然萌发,只是因旱季水分亏缺当年实生苗很难越冬存活。这是其自身生物学特性所致,与其它物种的竞争没有直接相关。

参考文献:

- [1] Roh M S, Mcnamara W A, Picton D, et al. Assessment of genetic variation in *Acer pentaphyllum* based on amplified fragment length polymorphisms[J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2015, 83: 725 ~ 731.
- [2] 孙治宇,李明富,李八斤,等. 四川雅江县珍稀濒危植物五小叶槭[J]. 四川林业科技, 2010: 86 ~ 87.
- [3] 张斌,牟清彬. 九龙五小叶槭现状及抢救性保护对策[J]. 四川林勘设计, 2014, 3: 51 ~ 53.
- [4] Barth S, Meichinger AE, Lubberstedt Th. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Molecular Ecology, 2002, 11: 494 ~ 505.
- [5] Esselman E J, Jianqiang L, Crawford D J, et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Mol Ecol, 1999, 8(3): 443 ~ 451.
- [6] Galvanm Z, Bornet B, Balatti PA, et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Euphytica, 2003, 132: 297 ~ 301.
- [7] Michael W. 2006. Use of DNA markers to study bird migration. Journal of Ornithology, 147: 234 ~ 244.
- [8] Prevost A, Wilkinson MJ. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 107 ~ 112.
- [9] Sacco A, Di Matteo A, Lombardi N, et al. Quantitative trait loci pyramiding for fruit quality traits in tomato [J]. Molecular breeding, 2013, 31(1): 217 ~ 222.
- [10] Arcade A, Anselin F, Rampart P F, et al. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. Theor. Appl. Genet, 2000, 100(2): 299 ~ 307.
- [11] Robinson A J, Love C G, Batley J, et al. Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer [J]. Bioinformatics, 2004, 20(9): 1475 ~ 476.
- [12] Zietkiewicz E, Rafalski A, and Labuda D. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, Genomics, 1994, 20(2): 176 ~ 183.
- [13] 曾艳玲,谭晓风,曾晓峰. 采用正交设计方法优化梨 ISSR-PCR 反应体系[J]. 湖北农业科学, 2008: 1235 ~ 1238.
- [14] 张卿哲,孟金贵,张应华,等. 用正交设计法优化辣椒 ISSR-PCR 反应体系[J]. 西南农业学报, 2011: 1034 ~ 1038.
- [15] 李瑞,陈少瑜,宁德鲁,等. 油橄榄 ISSR-PCR 反应体系优化与引物筛选[J]. 安徽农业科学, 2012: 5797 ~ 5799.
- [16] 俞靓,井赵斌,魏琳,等. 本氏针茅 ISSR-PCR 反应体系的建立及引物筛选[J]. 中国草地学报, 2012: 77 ~ 83.
- [17] 朴红梅,李万良,穆楠,等. ISSR 标记的研究与应用[J]. 吉林农业科学, 2007: 28 ~ 30.
- [18] 郑道君,谢良商,曾建华,等. 海南龙血树 ISSR-PCR 反应体系建立与有效引物筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2011: 177 ~ 183.
- [19] 原晓龙,周军,陶磅,等. 草莓 ISSR-PCR 体系的建立和优化[J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 2106 ~ 2110.
- [20] 张蕾,严萍,韩正洲,等. 两面针 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(1): 70 ~ 74.