

苦楝 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选

王芳¹, 廖柏勇¹, 李培^{1,2}, 刘明骞¹, 李俊成¹,
吴琳瑛¹, 林玮¹, 陈晓阳^{1*}

(1. 华南农业大学林学与风景园林学院/广东省森林植物种质创新与利用重点实验室/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东广州 510642; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: [目的] 借鉴以往楝属文献报道的 SSR 引物, 筛选高度多态性、稳定性高、重复性好的苦楝 SSR 引物, 为苦楝遗传图谱构建、QTL 定位和分子标记辅助选择育种等研究领域应用奠定基础。 [方法] 本研究采用单因素法和正交试验设计进行 SSR-PCR 反应体系优化, 并利用该体系以 8 个不同种源的苦楝基因组 DNA 为模板, 从 135 对候选 SSR 引物中进行引物筛选。 [结果] 苦楝 SSR-PCR 最优反应体系为: 1.0 μL 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA, 1.2 μL 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, 1.0 μL 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.8 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 0.15 μL 5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶, 1.5 μL 10 \times Buffer, 补 ddH_2O 至 15 μL ; 最终筛选出 15 对具有高度多态性、稳定性高、重复性好的 SSR 引物。 [结论] 本研究成功优化了苦楝 SSR-PCR 反应体系, 并成功筛选出 15 对适用于苦楝的 SSR 引物。

关键词: 苦楝; SSR-PCR; 体系优化; 引物筛选

中图分类号: S792.33

文献标识码: A

Optimization of SSR-PCR Reaction System and Primer Screening of *Melia azedarach*

WANG Fang¹, LIAO Bo-yong¹, LI Pei^{1,2}, LIU Ming-qian¹, LI Jun-cheng¹, WU Lin-ying¹, LIN Wei¹, CHEN Xiao-yang¹

(1. College of Forestry and landscape Architecture, South China Agricultural University/Provincial Key Laboratory of Forest Plant Germplasm Innovation and Utilization/State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangzhou 510642, Guangdong, China; 2. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] Based on previous achievement on *Melia* SSR primer to select highly polymorphic, high stability and repeatability *Melia azedarach* primers, and to lay a foundation for constructing *M. azedarach* genetic map, QTL mapping and molecular marker - assisted selection and breeding. [Method] The SSR - PCR system was optimized through the single factor experiment and orthogonal test, and by using the genomic DNAs of *M. azedarach* from 8 provenances as templates, the SSR primers suitable for *M. azedarach* were screened from 135 pairs of primers. [Result] The optimal SSR - PCR system is as follows: 1.0 μL 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ genomic DNA, 1.2 μL 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of each primer, 1.0 μL 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.8 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 0.15 μL 5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq polymerase, 1.5 μL 10 \times Buffer (Mg^{2+} free), and replenishing ddH_2O to 15 μL . And, 15 pairs of SSR primers with high polymorphism, high stability, and good repeatability, were finally screened out. [Conclusion] The SSR-PCR system of *M. azedarach* was successfully optimized, and 15 pairs of SSR primers applicable to neem were selected.

Keywords: *Melia azedarach*; SSR - PCR; system optimization; primer screening

收稿日期: 2015-03-20

基金项目: 广东省林业科技创新项目(2011KJCX002)

作者简介: 王芳(1992—), 女(汉族), 在读硕士生, 主要从事植物遗传学研究, 电话: 15088076450 E-mail: 15088076450@163.com.

* 通讯作者: 陈晓阳, 男, 博士, 教授, E-mail: xychen@scau.edu.cn

苦楝 (*Melia azedarach* Linn.) 是楝科、楝属落叶乔木, 生长速度快、材质软硬适中、心材红褐色, 且纹理美观、有香气、耐腐、抗虫蛀、干缩小、干燥性好, 是理想的家具用材^[1]; 苦楝生长对土壤要求不严, 在酸性土、中性土与石灰岩地区均能生长, 耐干旱、瘠薄, 是优良的农林间作和盐碱土植被恢复树种^[2]; 其根、皮、花、果均可入药, 亦能驱虫, 具有安全高效、无毒无污染、残效期短等优点, 且施用浓度低、对人畜无害, 是一种理想的广谱生物农药原料, 从其各营养器官提取物中发现多种药用成分, 作用多样^[3-6]; 花呈淡紫色, 形成密集圆锥花序, 鲜艳夺目, 极具观赏性^[7-8]。苦楝分布广泛, 已开展种源试验, 研究了种苗性状的地理变异^[9-14], 但利用分子标记研究苦楝遗传多样性还不够深入。

有学者采用简单重复序列区间 (ISSR) 分析、随机扩增多态性 DNA 标记 (RAPD) 分析以及扩增片段长度多态性 (AFLP) 分析等方法对苦楝进行遗传多样性分析研究^[15-17], 但国内外尚未有将简单重复序列 (SSR) 分子标记技术应用于苦楝辅助育种的研究报道。SSR 分子标记也称微卫星分子标记, 标记多态性极其丰富, 且呈共显性遗传, 符合孟德尔遗传模式, 可鉴别杂合子和纯合子, SSR 序列广泛存在, 覆盖整个基因组, 同时 DNA 样品用量少, 引物在同种和近缘物种间通用性好、特异性强, 重复性好、可信度高^[18-21], 因而在动植物遗传多样性分析、遗传图谱的构建、数量遗传基因座 (QTL) 定位和分子标记辅助选择育种等研究中广泛应用。本研究旨在通过建立稳定的 SSR-PCR 反应体系和条件, 借鉴以往楝属文献报道的 SSR 引物, 筛选高度多态性、稳定性高、重复性好的苦楝 SSR 引物, 为苦楝遗传图谱构建、QTL 定位和分子标记辅助选择育种等研究领域应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 SSR 引物 本研究所用 135 对微卫星候选引物来自楝科微卫星分子标记相关文献^[22-36], 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 其详细信息参见表 1。

1.1.2 实验试剂 10 × TBE 电泳缓冲液、1 × TBE 溶液、无水乙醇、冰乙酸、琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、溴酚蓝、10 × Buffer (Mg²⁺ Free)、dNTPs、Mg²⁺、Taq 酶、ddH₂O、DL15000 DNA Marker、DL2000

DNA Marker、100 bp Ladder Marker 等, 以上试验材料均购自 TAKARA BIO 公司。

表 1 引物信息及其来源

编号	名称	来源	引用文献
1	HM041033	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
2	HM041034	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
3	HM041035	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
4	HM041038	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
5	HM041039	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
6	HM041046	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
7	HM041040	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
8	HM041041	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
9	HM041042	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
10	HM041043	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
11	HM041044	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
12	HM041045	<i>Swietenia macrophylla</i>	[22]
13	---	<i>Carapa guianensis</i>	[23]
14	---	<i>Carapa guianensis</i>	[23]
15	---	<i>Carapa guianensis</i>	[23]
16	---	<i>Carapa guianensis</i>	[23]
17	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
18	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
19	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
20	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
21	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
22	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
23	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
24	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
25	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
26	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
27	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
28	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
29	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
30	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
31	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
32	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
33	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
34	---	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[24]
35	---	<i>Swietenia macrophylla</i>	[25]
36	AJ000405	<i>Swietenia macrophylla</i>	[25]
37	AJ000407	<i>Swietenia macrophylla</i>	[25]
38	AJ000410	<i>Swietenia macrophylla</i>	[25]
39	AJ000389	<i>Swietenia macrophylla</i>	[25]
40	AF428115	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
41	HQ200180	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
42	HQ200181	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
43	HQ200182	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
44	HQ200183	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
45	HQ200184	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
46	HQ200185	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
47	HQ200186	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
48	HQ200187	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
49	HQ200188	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
50	HQ200189	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]
51	HQ200190	<i>Khaya senegalensis</i>	[26]

续表 1

编号	名称	来源	引用文献
52	GQ254820	<i>Cabralea canjerana</i>	[27]
53	GQ254827	<i>Cabralea canjerana</i>	[27]
54	GQ254833	<i>Cabralea canjerana</i>	[27]
55	GQ254834	<i>Cabralea canjerana</i>	[27]
56	GQ254838	<i>Cabralea canjerana</i>	[27]
57	GQ254841	<i>Cabralea canjerana</i>	[27]
58	GQ254845	<i>Cabralea canjerana</i>	[27]
59	GQ254847	<i>Cabralea canjerana</i>	[27]
60	AJ000404	<i>Swietenia humilis</i>	[28]
61	- - -	<i>Swietenia humilis</i>	[28]
62	AJ000406	<i>Swietenia humilis</i>	[28]
63	AJ000408	<i>Swietenia humilis</i>	[28]
64	AJ000409	<i>Swietenia humilis</i>	[28]
65	DQ778303	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[29]
66	DQ453903	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[29]
67	DQ453904	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[29]
68	- - -	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[29]
69	- - -	<i>Toona ciliata</i> var. <i>pubescens</i>	[29]
70	FM161907	<i>Azadirachta indica</i>	[30]
71	FM161908	<i>Azadirachta indica</i>	[30]
72	FM161909	<i>Azadirachta indica</i>	[30]
73	FM161911	<i>Azadirachta indica</i>	[30]
74	FM161912	<i>Azadirachta indica</i>	[30]
75	FM161913	<i>Azadirachta indica</i>	[30]
76	FM161914	<i>Azadirachta indica</i>	[30]
77	EF413962	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
78	EF413963	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
79	EF413964	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
80	EF413965	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
81	EF413966	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
82	EF413967	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
83	EF413968	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
84	EF413969	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
85	EF413970	<i>Cedrela odorata</i>	[31]
86	JF423305	<i>African mahogany</i>	[32]
87	JF423306	<i>African mahogany</i>	[32]
88	JF423307	<i>African mahogany</i>	[32]
89	JF423308	<i>African mahogany</i>	[32]
90	JF423309	<i>African mahogany</i>	[32]
91	JF423310	<i>African mahogany</i>	[32]
92	JF423311	<i>African mahogany</i>	[32]
93	JF423312	<i>African mahogany</i>	[32]
94	JF423313	<i>African mahogany</i>	[32]
95	JF423314	<i>African mahogany</i>	[32]
96	JF423315	<i>African mahogany</i>	[32]
97	AJ000402	<i>Swietenia humilis</i>	[33]
98	AJ000411	<i>Swietenia humilis</i>	[33]
99	AJ000403	<i>Swietenia humilis</i>	[33]
100	FM161910	<i>Azadirachta indica</i>	[30]
101	AF428116	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]
102	AF428117	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]
103	AF428118	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]
104	AF428119	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]
105	AF428120	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]

续表 1

编号	名称	来源	引用文献
106	AF428121	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]
107	AF428122	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]
108	AF428123	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]
109	AF428124	<i>Swietenia macrophylla</i>	[34]
110	AB674472	<i>Melia volkensii</i>	[35]
111	AB674473	<i>Melia volkensii</i>	[35]
112	AB674474	<i>Melia volkensii</i>	[35]
113	AB674475	<i>Melia volkensii</i>	[35]
114	AB674476	<i>Melia volkensii</i>	[35]
115	AB674477	<i>Melia volkensii</i>	[35]
116	AB674478	<i>Melia volkensii</i>	[35]
117	AB674479	<i>Melia volkensii</i>	[35]
118	AB674480	<i>Melia volkensii</i>	[35]
119	AB674481	<i>Melia volkensii</i>	[35]
120	AB674482	<i>Melia volkensii</i>	[35]
121	AB674483	<i>Melia volkensii</i>	[35]
122	AB674484	<i>Melia volkensii</i>	[35]
123	AB674485	<i>Melia volkensii</i>	[35]
124	AB674486	<i>Melia volkensii</i>	[35]
125	BV725398	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
126	BV725397	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
127	BV725399	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
128	BV725400	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
129	BV725401	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
130	BV725392	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
131	BV725393	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
132	BV725394	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
133	BV725395	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
134	BV725396	<i>Guarea guidonia</i>	[36]
135	BV725402	<i>Guarea guidonia</i>	[36]

- - - : 无名称

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取及检测 本研究从海南、云南、甘肃、广东、广西、福建、四川和贵州 8 个不同苦楝种源中分别选取一株无病害的植株,采集足够的新鲜叶片,提取其苦楝基因组 DNA 作为引物筛选的 DNA 材料。提取的 DNA 经质量检测后,用 TE 溶液将浓度稀释到 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,分装成 $100 \mu\text{L} \cdot \text{管}^{-1}$, -20°C 保存备用。

DNA 提取采用 OMEGA BIO-TEK 公司的 D2485-04 型植物基因组提取试剂盒;以 DL15000 DNA Marker 作对照,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外凝胶成像系统检测基因组 DNA 的提取质量,电泳电压 100 V,电流 200 mA,时间 45 min;然后用 Nano-Drop 1000 Spectrophotometer 全自动核酸蛋白快速检测仪检测 DNA 纯度和浓度。

1.2.2 PCR 扩增及反应体系优化

1.2.2.1 单因素试验 分别对 SSR-PCR 扩增反应

体系中的模板 DNA、引物、dNTPs、 Mg^{2+} 和 Taq 酶的使用浓度进行单因素试验,具体实验设计参见表 2。如表 2 所示,以海南、广东、广西和云南 4 个种源的 DNA 为模板,用 99 号引物参与单因素实验,每 15 μL 反应体系中除加入该单因素的相应水平外,其它 4 个因素的水平均以该因素的中间值进行初始实验,10 \times Buffer 缓冲液加入 1.5 μL , 剩余体积用

ddH₂O 补足。

PCR 扩增反应在东胜创新生物科技有限公司 EDC-810 PCR 仪中进行,扩增程序设计如下:(1)94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;(2)94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;(3)72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。以 DL2000 DNA Marker 作对照,采用 2% 琼脂糖凝胶电泳和紫外凝胶成像系统检测 PCR 扩增产物。

表 2 SSR-PCR 体系单因素法试验设计

水平	因素				
	模板 DNA/(ng · μL^{-1})	引物/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	dNTPs/(mmol · L^{-1})	Mg^{2+} /(mmol · L^{-1})	Taq 酶/(U · μL^{-1})
1	0.33	2.00	0.13	0.67	0.017
2	1.33	3.33	0.40	1.00	0.033
3	2.33	6.00	0.67	1.33	0.050
4	3.33	8.00	0.93	1.67	0.067

1.2.2.2 SSR-PCR 扩增体系正交实验 SSR-PCR 扩增体系正交实验见表 3,PCR 扩增所用其他试剂与扩增产物检测同单因素实验一致。为提高实验准确性,正交实验进行一次重复检验。

PCR 反应采用以下程序设计:(1)94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;(2)94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1

min,25 个循环;(3)94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火温度设置梯度,第 1 至第 12 竖排由 52 $^{\circ}\text{C}$ 逐渐升至 62 $^{\circ}\text{C}$,退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,20 个循环;(4)72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。通过分析比较电泳条带亮度、清晰度等确定 PCR 反应体系中各试剂最适用量及最适退火温度。

表 3 SSR-PCR 体系 L¹⁶(4⁵) 正交试验设计

试验编号	因素				
	模板 DNA/(ng · μL^{-1})	引物/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	dNTPs/(mmol · L^{-1})	Mg^{2+} /(mmol · L^{-1})	Taq 酶/(U · μL^{-1})
1	0.33	2.00	0.13	0.67	0.017
2	0.33	3.33	0.40	1.00	0.033
3	0.33	6.00	0.67	1.33	0.050
4	0.33	8.00	0.93	1.67	0.067
5	1.33	2.00	0.40	1.33	0.067
6	1.33	3.33	0.13	1.67	0.050
7	1.33	6.00	0.93	0.67	0.033
8	1.33	8.00	0.67	1.00	0.017
9	2.33	2.00	0.67	1.67	0.033
10	2.33	3.33	0.93	1.33	0.017
11	2.33	6.00	0.13	1.00	0.067
12	2.33	8.00	0.40	0.67	0.050
13	3.33	2.00	0.93	1.00	0.050
14	3.33	3.33	0.67	0.67	0.067
15	3.33	6.00	0.40	1.67	0.017
16	3.33	8.00	0.13	1.33	0.033

1.2.3 SSR 引物的筛选

1.2.3.1 初筛 利用优化的 PCR 反应体系和条件,以海南、广东、广西和云南 4 个不同种源的苦楝基因组 DNA 为模板,对 135 对候选引物进行初筛,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳和紫外凝胶成像系统检测 PCR 扩增产物,筛选出能有效扩增 SSR 序列的引物。

1.2.3.2 复筛 以海南、云南、甘肃、广东、广西、福建、四川和贵州 8 个不同种源的苦楝基因组 DNA 为模板,对初筛所得的引物进行复筛,对扩增产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶(2.4 g 尿素、1.14 g 丙烯酰胺、0.06 g 甲叉丙烯酰胺、20 mL 1 \times TBE 溶液、300 μL 20% 过硫酸铵、40 μL TEMED)电泳,以 100 bp Ladder Marker 作对照,前 15 min 电压 80 V,电流 275

mA,后 1 h 15 min 电压 120 V,电流 275 mA;然后用银染法显示扩增条带,将凝胶依次浸入固定液(47.5 mL 无水乙醇、2.5 mL 冰乙酸、450 mL 蒸馏水) 10 min、染色液(0.5 g AgNO_3 、500 mL 蒸馏水) 10 min、显色液(5 g NaOH、0.1 g 四硼酸钠、1.5 mL 甲醛、500 mL 蒸馏水) 10 min;最后分析扩增条带的多态性。经反复筛选与比较分析,获得适用于苦楝的多态性高、重复性好、稳定性好的引物。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取效果

采用试剂盒提取的 8 个苦楝基因组 DNA 如图 1 所示,琼脂糖凝胶电泳检测,条带比较清晰,没有杂带,拖尾现象不明显。经全自动核酸蛋白快速检测仪检测,提取的 DNA 的纯度和浓度都很高,适用于 PCR 体系。

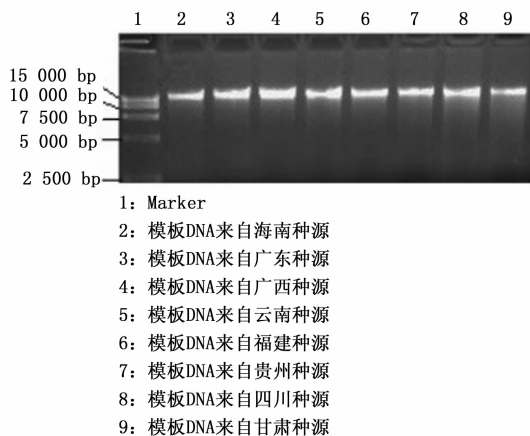
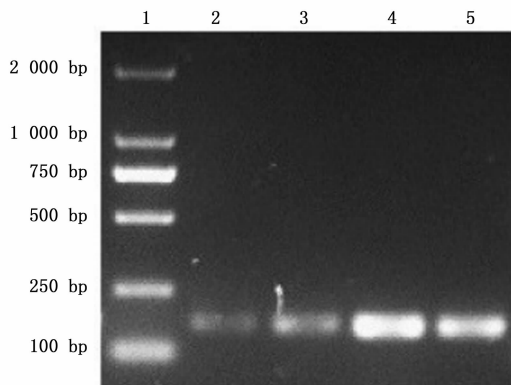


图 1 8 个种源苦楝基因组 DNA 电泳检测结果

2.2 SSR-PCR 反应体系的优化

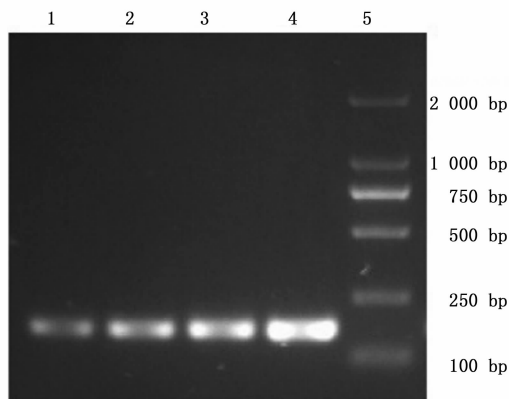
2.2.1 体系单因素实验结果 通过单因素实验,SSR-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测(图 2 ~ 图 6),分析可知:当模板 DNA 浓度为 $2.33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 2),引物浓度为 $8.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 3),dNTPs 浓度为 $0.67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4),Taq 酶浓度为 $0.067 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 6)时扩增效果最好;而 Mg^{2+} 浓度达到 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时(图 5)扩增效果较好,且进一步增加 Mg^{2+} 浓度并未明显改善扩增效果。

2.2.2 正交设计实验结果 SSR-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 7。由图 7 可知,两个重复的电泳结果基本一致。即:第 3、4、8、12、15 个处理的条带最亮、最清晰,第 2、6、10、16 个处理的条带亮度和清晰度均相对较低,第 1、5、7、9、11、13、14 个处理的条带亮度很低或根本无条带。对比发现,引物、



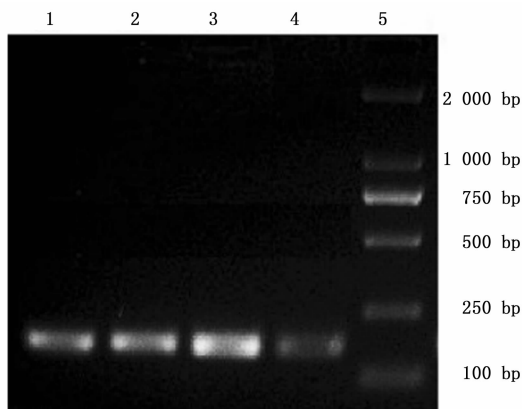
1: Marker
2: 模板DNA浓度为 $0.33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
3: 模板DNA浓度为 $1.33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
4: 模板DNA浓度为 $2.33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
5: 模板DNA浓度为 $3.33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

图 2 单因素实验结果 - 模板 DNA 浓度电泳图



1: 引物浓度为 $2.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
2: 引物浓度为 $3.33 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
3: 引物浓度为 $6.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
4: 引物浓度为 $8.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
5: Marker

图 3 单因素实验结果 - 引物浓度电泳图



1: dNTPs浓度为 $0.13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
2: dNTPs浓度为 $0.40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
3: dNTPs浓度为 $0.67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
4: dNTPs浓度为 $0.93 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
5: Marker

图 4 单因素实验结果 - dNTPs 浓度电泳图

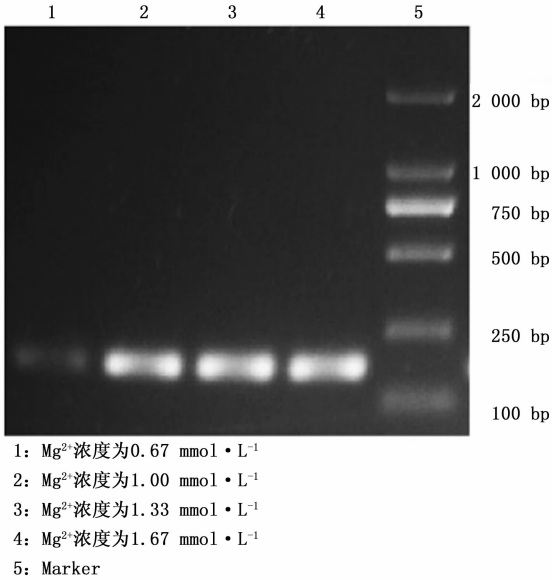
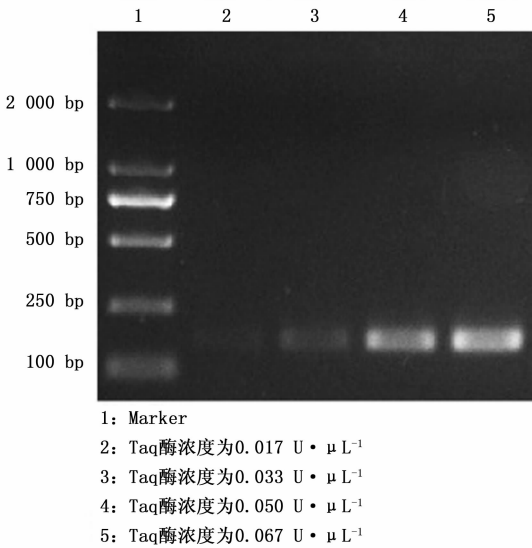
图5 单因素实验结果- Mg^{2+} 浓度电泳图

图6 单因素实验结果-Taq酶浓度电泳图

Mg^{2+} 和 Taq 酶浓度的变化对 PCR 扩增效果的影响十分显著,而模板 DNA 和 dNTPs 浓度的变化对扩增

效果的影响不显著。此外,PCR 过程中退火温度设置递增梯度,但是对扩增效果的影响不显著,退火温度偏低时扩增效果相对较好。

综合单因素实验和正交设计实验结果,同时考虑到试剂成本,最终确定苦楝 SSR-PCR 最优体系为: $1.0 \mu\text{L} 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA, $1.2 \mu\text{L} 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, $1.0 \mu\text{L} 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, $0.8 \mu\text{L} 25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Mg^{2+}$, $0.15 \mu\text{L} 5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶, $1.5 \mu\text{L} 10 \times \text{Buffer}$,补 ddH₂O 至 $15 \mu\text{L}$ 。PCR 反应退火温度设置在 56°C 为宜。

2.3 SSR 引物筛选

2.3.1 初筛结果 利用优化的 PCR 反应体系和条件,以 4 个不同种源的苦楝基因组 DNA 为模板,对 135 对候选 SSR 引物进行初筛,结果如图 8 所示。第 25、29、113、115、117、119、120 号引物在 4 个不同种源中扩增产物的电泳条带比较清晰明亮,尤其第 29、113、115、117、119、120 号引物具有明显的多态性;而第 26、27、112、114、116 号引物条带比较模糊且不完整;第 28、110、111、118 号引物几乎无明显条带。初筛一共筛选出 36 对能有效扩增 SSR 序列的引物。

2.3.2 复筛结果 利用优化的 PCR 反应体系和条件,以 8 个不同种源的苦楝基因组 DNA 为模板,对初筛所获得的 36 对引物进行复筛,筛选目标是在 8 个不同种源的苦楝中均能扩增出清晰明亮的条带且具有高度多态性、重复性好又比较稳定的引物。通过反复筛选和分析比较,最终筛选出 15 对适用于苦楝的较为理想的 SSR 引物(图 9),其详细信息参见表 4,筛选效率为 11.11%。

3 讨论与结论

本研究采用单因素法和正交试验设计对苦楝

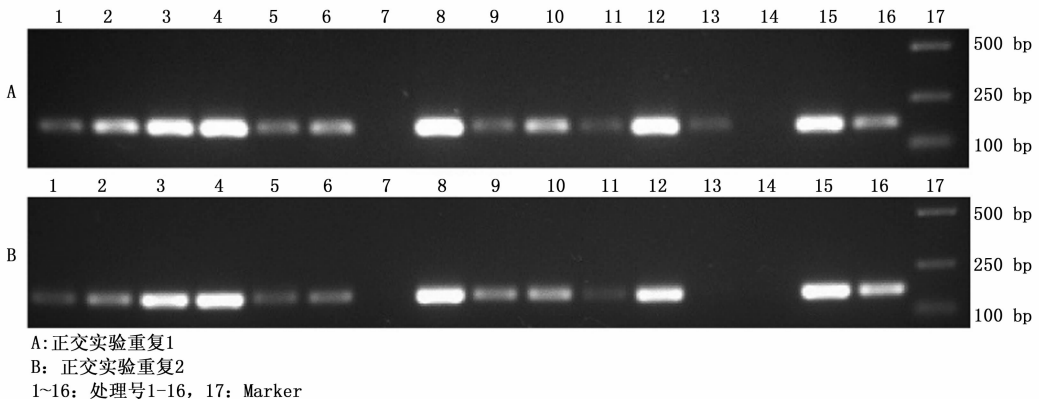


图7 正交实验电泳图

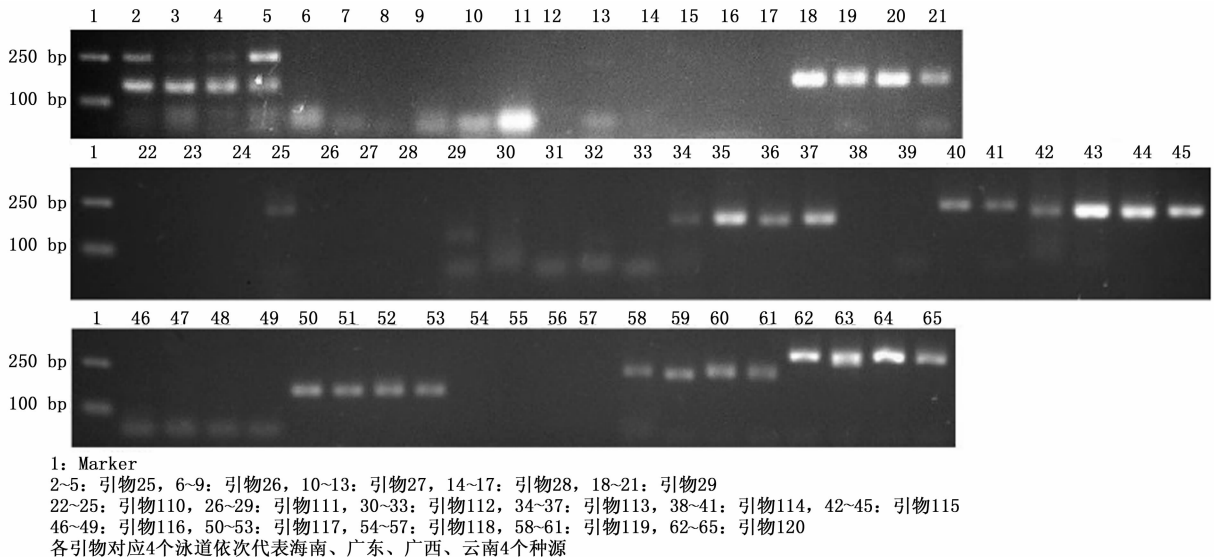


图8 部分引物初筛电泳图

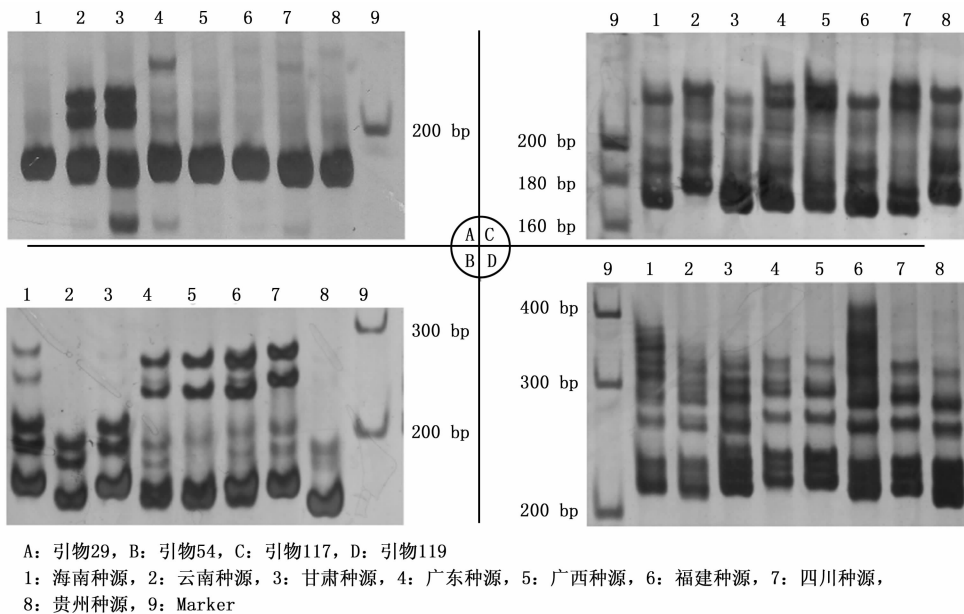


图9 部分引物复筛电泳图

SSR-PCR 反应体系进行优化,确定最优反应体系为:1.0 μL 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA,1.2 μL 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物,1.0 μL 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs,0.8 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} ,0.15 μL 5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶,1.5 μL 10 \times Buffer,补 ddH₂O 至 15 μL 。扩增反应退火温度确定为 56 $^{\circ}\text{C}$ 。利用最优体系,以 8 个不同种源的苦楝基因组 DNA 为模板,从 135 对 SSR 引物中筛选出 15 对具有高度多态性、稳定性高、重复性好的引物。实验结果为今后苦楝遗传多样性分析、地理种源变异、遗传图谱构建等研究奠定一定的基础。

在 SSR-PCR 体系优化实验中,当模板 DNA、引物、dNTPs 和 Taq 酶分别采用不同浓度时,电泳条

带亮度均大致呈梯度变化,但是不宜采用过高浓度,否则会导致 PCR 扩增的重复性下降、非特异性扩增产物增多;而 Mg^{2+} 浓度是影响 PCR 扩增效果的关键因素,稍低则扩增产物极少,适当则扩增产率很高,过高并不能提高扩增效率,因为 Mg^{2+} 在 DNA 延伸反应中仅仅起到 Taq 酶激活剂的作用^[37];PCR 反应中退火温度直接影响引物与模板 DNA 的结合效率,过高则退火反应速率低、准确度下降,过低则易形成引物二聚体、产生过多杂带;不同引物的退火温度因为引物自身序列的 CG 含量、物种差异等不同,允许退火温度在 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 范围内变化,否则会降低实验的效果^[37],所以个别的引物

退火温度需要根据具体的实验效果进行单独的调整。例如,2号、122号、123号引物等(表4)。体系优化实验中选用的99号引物的特异性和稳定性很好,但是它在8个不同的DNA模板中扩增结果多态性不明显,所以也不能入选。

表4 复筛所得引物信息

编号	名称	序列(5'-3')	退火温度/℃
2	HM041034	F: GATAGCGGAGCCGGTGATT R: GGATGGAAGGCTCAAGATTCC	60
29	---	F: ATGGATGAGTGTCCGATAGG R: TGTGATGTAGGACTCTGAAC	56
54	GQ254833	F: GAGAAGAGAAGGCTGTGTGC R: GAAACCTGATTCCGTCGTCGT	56
59	GQ254847	F: CTCCTCGTTTGCCACTCATT R: AACAGAGGGTTTTCCGTGTC	56
74	FM161912	F: GTCCACGCCAACAGAGACAC R: TTGGCTTGGCTTTCTCTTTC	60
111	AB674473	F: CCCTATTCTATGTCCTCCCA R: GTCCTCTCGAATTCGTGTGC	60
113	AB674475	F: CAACCATGGTGTGAGAAGA R: TGCTTAATTGCTCTGTGCAT	56
114	AB674476	F: CTAGACCAGCCCAAGAACA R: TTCAAGGGCTTCTTCTGAATC	60
116	AB674478	F: GGAACCCCAATTTAGGAACT R: TGCTTGGTGAACCATAGA	56
117	AB674479	F: CCGTGAAGAGTGCCAAATC R: TCTTGGAGGTGAGATCAAGTC	56
118	AB674480	F: TCTGTTGGTGTGTTGTCCAC R: TAATGTGGATGCAAGCAGTG	58
119	AB674481	F: CAAGCACACACAAGGATTTG R: TGGCAACTCTCAGGTATCAA	56
120	AB674482	F: GTTGTGTTGCGGTGTGTGTT R: GAGAGAGAACCCAAAGGAAAA	56
122	AB674484	F: GTGCAGTGTCCATGTTGAAG R: GACATTTTCTCTGCAAGGTCA	60
123	AB674485	F: TTCCTCAGCATTAAGGTGT R: CAGGCAAAGGAAGGTAGGTA	60

---: 无名称; F: 上游引物序列; R: 下游引物序列

相较于其它植物和作物,林木的基因组更为庞大,且分子标记技术在林木中的研究和应用起步较晚,因此,最终筛选得到的适用于林木的理想引物所占候选引物的比例普遍比其他物种低。例如,马洪峥等^[38]以能源作物尼泊尔芒(*Miscanthus nepalensis* (Trinius) Hackel)和双药芒(*M. nudipes* (Grisebach) Hackel)为试验材料,从42对SSR候选引物中筛选得到14对理想引物,筛选效率为33.33%;张龙等^[37]以8种柱花草属(*Stylosanthes*)牧草为试验材料,从123对SSR候选引物中筛选得到26对理想引物,筛选效率为21.14%;而李光友等^[39]以尾叶桉(*Eucalyptus urophylla* S. T. Blakely)杂种子代为试

验材料,从100对SSR候选引物中筛选得到17对理想引物,筛选效率为17.00%,明显低于前两组数据。由此可见,苦楝和其他林木的SSR引物筛选及SSR分子标记技术在苦楝等林木的遗传学研究中的应用仍然需要进一步加强。本研究最终筛选出来的15对SSR引物对于庞大的苦楝基因组来说数量甚少,因此在进行后续的遗传多样性分析时,可能还需要根据具体的样本进行深入试验。随着SSR引物的进一步筛选,基于SSR分子标记技术的苦楝遗传多样性分析效率可能还有进一步提升的空间。

参考文献:

- [1] Peng H, David J M. 16. *MELIA Linnaeus*, Sp. Pl. 1: 384. 1753 [J]. *Flora of China*. 2008(11): 130-131.
- [2] Evans P T, Rombold J S. Paraiso (*Melia azedarach* var. "Gigante") woodlots: an agroforestry alternative for the small farmer in Paraguay[J]. *Agroforestry Systems*, 1984, 2(3): 199-214.
- [3] Vila S, Scocchi A, Mroginski L. Plant regeneration from shoot apical meristems of *Melia azedarach* L. (Meliaceae)[J]. *Acta Physiologica Plantarum*, 2002, 24(2): 195-199.
- [4] Vila S, Gonzalez A, Rey H, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Melia azedarach* (Meliaceae)[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2003, 39(3): 283-287.
- [5] Vila S K, Rey H Y, Mroginski L A. Influence of genotype and explant source on indirect organogenesis by in vitro culture of leaves of *Melia azedarach* L[J]. *Biocell*, 2004, 28(1): 35-41.
- [6] Vila S, Gonzalez A, Rey H, et al. Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segments of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) seedlings[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2005, 41(6): 746-751.
- [7] 教忠意,唐凌凌,隋德宗,等. 苦楝的研究现状与展望[J]. *福建林业科技*, 2009, 36(4): 269-274.
- [8] 张国栓,王少波,刘顺国. 河南省苦楝基因资源及其遗传改良策略研究[J]. *河南林业科技*, 2009, 29(3): 41-42.
- [9] 程诗明,顾万春. 苦楝中国分布区的物候区划[J]. *林业科学*, 2005, 41(3): 186-191.
- [10] 程诗明,顾万春. 苦楝遗传资源学研究进展及其展望[J]. *浙江林业科技*, 2007, 27(2): 64-69.
- [11] Chen L, Deng X, Ding M, et al. Geographic variation in traits of fruit stones and seeds of *Melia azedarach* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2014, 36(1): 15-20.
- [12] 廖柏勇,陈晓阳,陈丽君,等. 苦楝种源间种子发芽变异的观测[J]. *广东农业科学*, 2014(11): 43-47, 52.
- [13] 陈丽君,刘明骞,廖柏勇,等. 苦楝不同种源苗期生长性状和生长节律研究[J]. *西南林业大学学报*, 2014, 34(4): 1-7.
- [14] 陈丽君,邓小梅,丁美美,等. 苦楝种源果核及种子性状地理变异的研究[J]. *北京林业大学学报*, 2014, 36(1): 15-20.
- [15] 夏海涛. 药用苦楝遗传多样性 ISSR 分析和遗传变异规律研究

- [D]. 2009.
- [16] 陈羨德,陈礼光,陈珺,等. 不同来源苦楝种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版),2010(4):118-122.
- [17] 程诗明. 苦楝聚合群体遗传多样性研究与核心种质构建[D]. 中国林业科学研究院,2005.
- [18] 黄映萍. DNA 分子标记研究进展[Z]. 2010.
- [19] 陈争,姜小凤,童再康. 光皮桦 EST-SSR PCR 反应体系的优化[J]. 浙江农林大学学报,2012,29(6):960-965.
- [20] 吕学辉,李根前. SSR 分子标记及在林木基因组中的应用[J]. 山东林业科技,2011(5):57-60.
- [21] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 48-55.
- [22] Lemes M R, Esashika T, Gaoue O G. Microsatellites for mahoganies: Twelve new loci for *Swietenia macrophylla* and its high transferability to *Khaya senegalensis*[J]. American Journal of Botany, 2011, 98(8): e207-e209.
- [23] Dayanandan S, Dole J, Bawa K, et al. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae)[J]. Mol Ecol,1999, 8(10): 1585-1592.
- [24] 刘军,孙宗修,陈益泰,等. 珍稀濒危树种毛红椿微卫星 DNA 分离及 SSR 反应体系优化[J]. 中国生物工程杂志,2006, 12(26): 50-55.
- [25] Cespedes M, Gutierrez M V, Holbrook N M, et al. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica[J]. Molecular Ecology, 2003, 12(12): 3201-3212.
- [26] Sexton G J, Frere C H, Dieters M J, et al. Development and characterization of microsatellite loci for *Khaya senegalensis* (Meliaceae)1 [J]. American Journal of Botany, 2010, 97(11): e111-e113.
- [27] Pereira M F, Bandeira L F, Blanco A J V, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cabralea canjerana* (Meliaceae) [J]. American Journal of Botany, 2010, 98(1): e10-e12.
- [28] White G, Powell W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species [J]. Molecular Ecology, 1997, 6(9): 851-860.
- [29] 刘军. 毛红椿天然居群遗传结构研究[D]. 2007.
- [30] Boontong C, Pandey M, Changtragoon S. Isolation and characterization of microsatellite markers in Indian neem (*Azadirachta indica* var. *indica* A. Juss) and cross-amplification in Thai neem (*A. indica* var. *siamensis* Valenton) [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(3): 669-671.
- [31] Hernández G, Buonamici A, Walker K, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree [J]. Conservation Genetics, 2008, 9(2): 457-459.
- [32] Karan M, Evans D S, Reilly D, et al. Rapid microsatellite marker development for African mahogany (*Khaya senegalensis*, Meliaceae) using next-generation sequencing and assessment of its intra-specific genetic diversity [J]. Molecular Ecology Resources, 2012, 12(2): 344-353.
- [33] White G, Powell W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family[J]. Molecular Ecology, 1997, 6(12): 1195-1197.
- [34] Lemes M R, Brondani R P V, Grattapaglia D. Multiplexed Systems of Microsatellite Markers for Genetic Analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a Threatened Neotropical Timber Species [J]. The Journal of Heredity, 2002, 4(93): 287-291.
- [35] Hanaoka S, Muturi G M, Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Melia volkensii* Gurke [J]. Conservation Genet Resour. 2012(4): 395-398.
- [36] de Lima P F, Ramos F N, Zucchi M I, et al. Development and characterization of microsatellite markers from *Guarea guidonia* (Meliaceae), a tree species from different habitats within the Brazilian Atlantic forest [J]. Conservation Genetics Resources, 2009, 1(1): 171-173.
- [37] 张龙,丁西朋,严琳玲,等. 8种柱花草属牧草 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选 [J]. 草业科学, 2014, 31(2): 232-242.
- [38] 马洪峥,李珊珊,葛颂,等. 能源作物芒属双药芒组 SSR 引物的筛选及其评价[J]. 生物多样性, 2011,19(5):535-542.
- [39] 李光友,徐建民,吴世军,等. 尾叶桉杂种子代 DNA 提取和 SSR 引物筛选[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(2):81-85.

(责任编辑:张研)