

椰子 SSR 分子标记筛选

吴翼, 李静, 杨耀东* (中国热带农业科学院椰子研究所/海南省热带油料作物生物学重点实验室, 海南文昌 571339)

摘要 [目的] 筛选可用的 SSR 分子标记, 加快椰子分子辅助育种进程。[方法] 采用改良 CTAB 法提取椰子基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 对 36 对 SSR 引物进行筛选, 以条带清晰、多态性丰富为引物筛选原则。[结果] 共筛选出 7 对具有多态性的引物, 其中 2 对多态性较丰富, 可用于后续 SSR 分子标记分析。[结论] 该研究为开展椰子种质资源遗传多样性系统分析提供了 SSR 引物。

关键词 椰子; SSR; DNA 提取; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号 S667.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)17-0119-03

Screening of SSR Markers for Coconut

WU Yi, LI Jing, YANG Yao-dong* (Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Hainan Key Laboratory of Tropical Oil Crops Biology, Wenchang, Hainan 571339)

Abstract [Objective] To accelerate the molecular assisted breeding process of coconut by screening SSR markers. [Method] The genomic DNA was extracted by modified CTAB method, and 36 SSR primers were screened with genomic DNA as template. [Result] A total of 7 pairs of polymorphic primers were screened, of which more than 2 pairs of polymorphism were found, which could be used for subsequent SSR molecular marker analysis. [Conclusion] The study provides the SSR primers for analysis of coconut germplasm genetic diversity system.

Key words Coconut; SSR; DNA extraction; PAGE Gel

椰子 (*Cocos nucifera* L.) 是热带亚热带地区重要的木本油料作物和食品能源作物, 具有投资少、管理简单、易生长、收获期长、经济寿命长、投资风险小、营养丰富、用途广泛等优点, 深受人们的喜爱。椰子全身是宝, 被称为热带地区的“生命之树”。但是椰子的生长周期较长, 一般高种需要 6~10 年的营养生长, 矮种也需要 4~6 年才能开花。而传统的育种手段太慢, 且消耗大量的时间和人力。

分子标记辅助育种是一种可以有效缩短育种周期的重要手段, 且分子标记技术从 DNA 水平上检测物种的差异, 有效避免了形态标记和生化标记的缺点, 它不受环境和生长阶段影响, 仅在苗期就可以对植物进行评价。将分子标记应用于椰子育种中, 是一种行之有效的育种手段。目前应用于椰子中的分子标记有很多种, 例如 RFLP、RAPD^[1]、AFLP^[2]、ISSR^[3] 等。SSR (simple sequence repeats) 即简单重复序列^[4-6], 又称为微卫星 DNA, 是近年来在 PCR 基础上发展起来的一种分子标记技术, 是由少数核苷酸 (一般 1~6 bp) 为重复单位簇集而成的串联重复序列, 其在植物基因组中广泛分布、数量丰富、多态性高、信息含量大、重复性好、检测结果准确可靠, 可在亲缘关系较近的品种间检测遗传差异, 操作起来较灵活、简便、快速, 易于分布, 对 DNA 数量及质量要求不高, 即使是部分降解的样品也可进行分析。SSR 分子标记技术在植物遗传图谱构建、种质资源研究、基因定位、分子标记辅助选择、品种纯度鉴定及杂种优势利用等方面都得到了大量应用。椰子是椰子属唯一的一个种, 各品种间的亲缘关系较近, 目前可用于不同椰子品种间鉴定评价的 SSR 引物有限, 远远不能满足椰子品种的快速鉴定和种质资源遗传关系

的分析。该研究以 5 个海南常见的椰子品种共 144 份样品为材料, 对 36 对 SSR 引物进行筛选, 旨在获得多态性 SSR 引物, 为今后开展椰子种质资源遗传多样性系统分析提供更多的 SSR 引物。

1 材料与方法

1.1 材料 取中国热带农业科学院椰子研究所种质苗圃内收集的黄矮椰子、红矮椰子、本地高种、香水椰子、马哇 5 个椰子品种共 144 份样品的嫩叶为试验材料。

1.2 试剂

(1) 提取缓冲液: 蔗糖 119.8 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 100 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 10 mL, PVP₄₀ 20 g, β-巯基乙醇 (使用前加) 30 mL, 用 DDH₂O 定容至 1 000 mL, 4 °C 保存。

(2) 裂解液: 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 100 mL, NaCl 81.8 g, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 40 mL, CTAB 20 g, PVP₄₀ 20 g, β-巯基乙醇 (使用前加) 30 mL, 用 DDH₂O 定容至 1 000 mL, 4 °C 保存。

(3) TE 缓冲液: 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 1 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 0.2 mL, 用 DDH₂O 定容至 100 mL, 4 °C 保存。

(4) 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 200 mL; Tris 碱 24.2 g, 加 160 mL DDH₂O 溶解, 用浓 HCl (约 8 mL) 调 pH 8.0。

(5) 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 100 mL; EDTA 二钠 18.6 g, 加 80 mL DDH₂O 溶解, 用 NaOH (约 2 g) 调 pH 8.0, 定容至 100 mL, 高压灭菌后 4 °C 保存。

(6) 3 mol/L 乙酸钠 (pH 5.2) 100 mL; 三水合乙酸钠 40.8 g, 加 80 mL DDH₂O 溶解, 用冰乙酸调 pH 5.0, 定容至 100 mL, 高压灭菌后 4 °C 保存。

(7) 50 × TAE 缓冲液: Tris 碱 242.0 g, 冰乙酸 57.1 g, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 100 mL, 用 DDH₂O 定容至 1 000 mL。

基金项目 海南省国际合作专项 (KJHZ2014-24); 农业部热带作物种质资源保护项目 (16RZZY-104)。

作者简介 吴翼 (1980—), 男, 海南文昌人, 助理研究员, 硕士, 从事热带油料作物分子生物学研究。* 通讯作者, 博士, 研究员, 从事热带油料作物分子生物学研究。

收稿日期 2017-04-10

(8)6 × 电泳缓冲液: 溴酚蓝 0.125 g, 蔗糖 20 g, 用 DDH₂O 定容至 50 mL, 4 °C 保存。

(9)5 × TBE 缓冲液(1 000 mL): Tris 碱 54.0 g, 硼酸 27.5 g, 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 20 mL, 用 DDH₂O 定容至 1 000 mL。

(10)1 × TBE 缓冲液: 5 × TBE 缓冲液 200 mL, 用 DDH₂O 稀释 5 倍至总体积 1 000 mL。

(11)10% AP(50 mL): 过硫酸铵 5 g, 用 DDH₂O 加至 50 mL, 搅拌溶解充分后, 4 °C 保存。

(12)脱色液: 50 mL 乙酸, 300 mL 乙醇, 定容至 1 000 mL。

(13)保存液: 5% ~ 7% 的乙酸。

(14)30% (29:1) Acrylamide 贮存液(500 mL): Acrylamide 145 g, Bis-Acrylamide 5 g, 用 DDH₂O 定容至 500 mL, 过滤后于棕色瓶中 4 °C 保存。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取。称取 1.2 g 叶片, 液氮磨成粉状加入 6 mL DNA 提取缓冲液后转至 10 mL 离心管中, 8 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 弃上清, 加入 5 mL 预热至 65 °C 的 DNA 裂解缓冲液水浴 90 min, 每 20 min 摇匀 1 次; 8 000 r/min, 15 °C 离心 10 min, 取上清, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 上下摇匀后 8 000 r/min, 4 °C 离心 10 min; 取上清, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1), 摇匀, 8 000 r/min, 4 °C 离心 10 min; 取上清, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH5.2)和 6/10 体积冰冻异丙醇, 缓慢摇匀至有絮状沉淀析出; 8 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 弃去液体, 加入 1 mL 75% 乙醇, 振荡, 迅速倒入 1 mL 离心管, 置于冰中; 将已提取好的 DNA 用 75% 乙醇洗 2 次, 室温放置干燥, 加入 200 μL TE 溶液溶解, 置于 4 °C 保存。

1.3.2 DNA 质量检测。

1.3.2.1 琼脂糖检测。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA; 取 2 μL DNA 工作液于 120 V, 电泳 30 min 后在凝胶成像仪上观察电泳条带。

1.3.2.2 核酸微量检测。取 1 μL DNA 在 Nandrop 仪(Thermo 公司)上测定其在 230、260 和 280 nm 下的吸光度值, 计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 及 OD₂₆₀/OD₂₃₀。

1.3.3 SSR 引物筛选。

1.3.3.1 PCR 扩增体系及程序。PCR 扩增反应体系的总体积为 20 μL, 其中 10 × Ex Taq Buffer 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.6 μL, 4 × dNTP Mixture 0.5 μL, 10 μmol/L Primer 各 1 μL, 基因组 DNA 2 μL, 5 U/μL Taq DNA polymerase 0.2 μL, 加无菌 DDH₂O 至 20 μL, 混匀后 4 500 r/min, 离心 10 s。在 TP1600 梯度 PCR 仪上进行反应。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。

1.3.3.2 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备。H₂O 15.81 mL, 5 × TBE 6 mL, 30% (29:1) 贮存液 7.98 mL, 10% AP(过硫酸铵)0.21 mL, TEMED 0.015 mL, 将以上溶液混合,

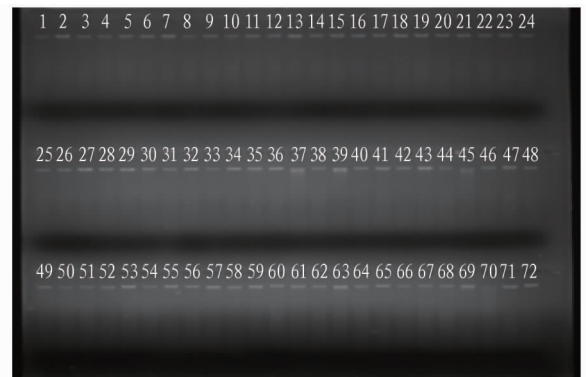
匀速灌入聚丙烯酰胺凝胶电泳所用的 2 块电泳玻璃板之间的缝隙中, 放置 3 ~ 5 h 凝胶后备用。

1.3.3.3 银染方法。漂洗, 用蒸馏水漂洗 2 遍; 银染, 配制银染液(AgNO₃ 1 g, 无水乙醇 50 mL, 10% 乙酸 50 mL, 蒸馏水 400 mL), 在摇床上摇 12 min, 洗 2 遍, 约 30 s; 显影, 配制显影液(NaNO₃ 9 g, 甲醛 3 mL, 蒸馏水 600 mL), 在摇床上摇至条带显出, 洗 3 遍; 终止, Na₂CO₃ 4.5 g, 蒸馏水 600 mL, 暂时保存, 在扫描仪上进行扫描, 拍照, 观察。

1.3.3.4 特异性引物筛选。分别从 5 个不同椰子品种中随机选取 6 个样本作为 PCR 扩增的 DNA 模板, 对 36 对 SSR 引物进行初筛, 筛选出具有多态性的引物, 再以 5 个品种共 144 份样品的基因组 DNA 为模板, 对其进行复筛。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果 由表 1 可以看出, 5 个椰子品种共 144 个样品的 DNA 质量均较高。5 个品种的 DNA 样本 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.98 ~ 2.02, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 在 1.86 ~ 2.00, 估计有少量 RNA 污染, 但是不影响后续的试验。琼脂糖电泳检测见图 1, 电泳结果表明 DNA 条带清晰, 无弥散, 不拖尾, 点样孔干净, 无蛋白和 RNA 污染, 说明 DNA 质量较好。



注: 1 ~ 12 为红矮椰子; 13 ~ 30 为黄矮椰子; 31 ~ 42 为本地高种; 43 ~ 60 为香水椰子; 61 ~ 72 为马哇

Note: 1 ~ 12 were Red dwarf coconut; 13 ~ 30 were Yellow dwarf coconut; 31 ~ 42 were Local high coconut; 43 ~ 60 were Perfume coconut; 61 ~ 72 were Mawa coconut

图 1 各椰子品种 DNA 琼脂糖检测结果

Fig. 1 Agarose test results of DNA of the coconut varieties

2.2 SSR 引物筛选结果 选用 5 个椰子品种共 30 个样品的 DNA 作模板, 对该试验中合成的 36 对 SSR 引物进行筛选, 大部分引物能扩增出清晰条带, 该研究以条带清晰、多态性丰富为引物筛选原则, 36 对引物中共筛选出 7 对具有多态性的引物, 多态率达 19.4%, 具体序列见表 2。再以 5 个椰子品种共 144 个样品的基因组 DNA 为模板, 对具有多态性的 7 对 SSR 引物进行复筛, 最后发现有 2 对 SSR 引物(HAYZ-D-QH-5506 和 HAYZ-D-ZH-5506)多态性高且重复性好, 可用于后续的遗传多样性分析, 电泳结果见图 2、图 3。

3 讨论

近年来, 随着分子生物学技术的发展, 分子标记越来越广泛地应用于各种作物的遗传和育种研究中; 利用 SSR 标记

表 1 各椰子品种的 DNA 质量

Table 1 DNA quality of the coconut varieties

品种 Varieties	样本数量 Sample number(株)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀			OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀		
		最大值 Maximum	最小值 Minimum	平均值 Average	最大值 Maximum	最小值 Minimum	平均值 Average
红矮椰子 Red dwarf coconut	24	2.07	1.95	2.04	2.11	1.53	2.00
黄矮椰子 Yellow dwarf coconut	36	2.08	1.93	2.01	2.11	1.27	1.86
本地高种 Local high coconut	24	2.08	1.94	2.01	2.07	1.70	1.90
香水椰子 Perfume coconut	36	2.09	1.96	2.02	2.17	1.44	1.97
马哇 Mawa coconut	24	2.09	1.90	1.98	2.21	1.40	2.00

表 2 SSR 相关引物序列

Table 2 SSR related primer sequence

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer(5' — 3')	反向引物 Reverse primer(5' — 3')	产物长度 Production length//bp
XSYZ - D - QH - 44484	AGTCAGAGGGCGAAGAGGA	ATCAAGGAATGGTACGTGGTT	708
XSYZ - D - QH - 24562	TGATGCTTAGCCTAATGCC	CAACTGAAGAAGAAGTCCAAA	632
XSYZ - D - ZH - 24562	TGCTCGAATCCTAGCCG	CTGAAGAAGACATCCGAAAGA	459
XSYZ - D - QH - 8815	TTATGGCATCAGATGGACTTCG	TGCTTGCTTCTTGGCACTACTC	453
HAYZ - D - QH - 5506	TGGCTCTTTGGGTGCTT	TTTCTACTGTACTTGGGAGGTTA	550
HAYZ - D - ZH - 5506	TCAGAAGAAGCCTGGAGC	CGATGGAAGACCCGACAAC	543
HAYZ - D - QZ - 21376	CTCAACAAGGCTAAAGGTCTC	TTTCATCACTCGGTAAGGT	520

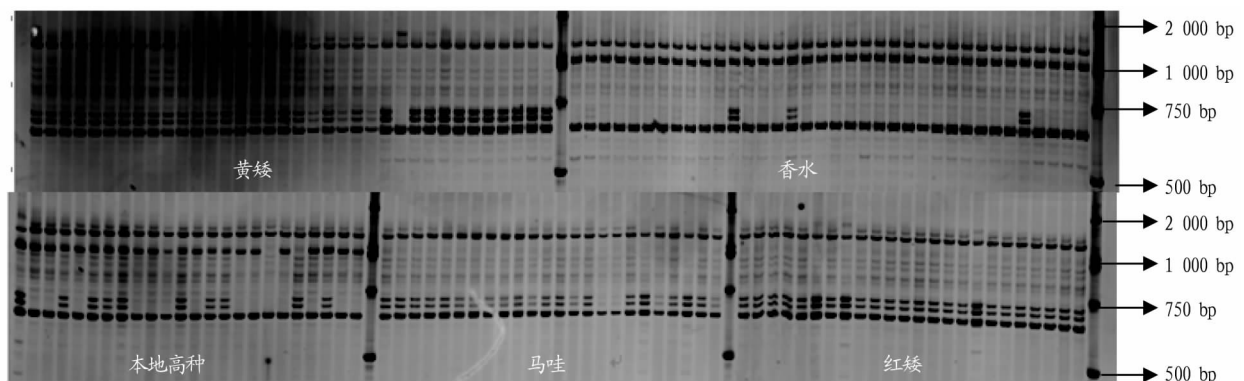


图 2 引物 HAYZ - D - QH - 5506 在 5 个椰子品种中的扩增结果

Fig. 2 The amplification of HAYZ - D - QH - 5506 in 5 coconut varieties

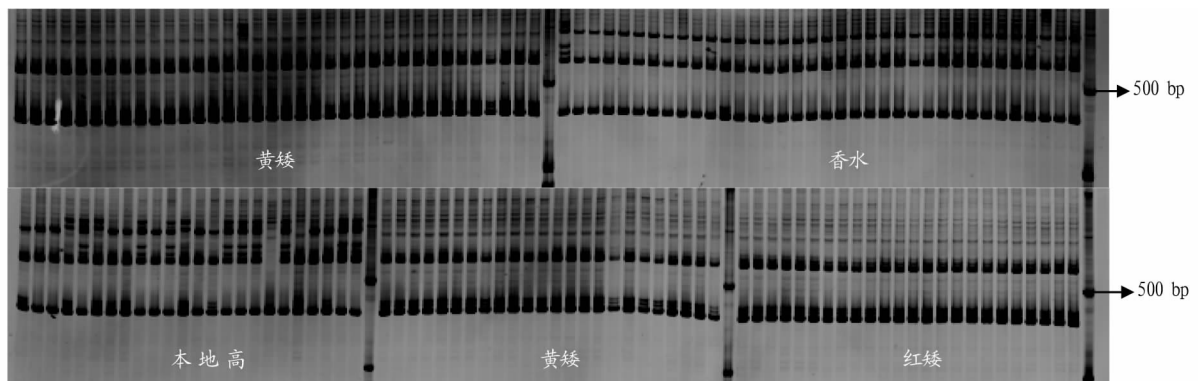


图 3 引物 HAYZ - D - ZH - 5506 在 5 个椰子品种中的扩增结果

Fig. 3 The amplification of HAYZ - D - ZH - 5506 in 5 coconut varieties

的高多态性,结合相关分析、聚类分析等数量遗传分析手段,可以对不同亲缘物种进行分类,判断其亲缘关系,评价不同品种的异质性,并进而划分杂交优势群;筛选出扩增性强、多态性和稳定性好的引物是进行全部基因组扩增成败的关键,

尤其是种内的扩增,因为种内的个体除自然变异外,其基因型没有太多的差异,所以没有多态性强、稳定性好的引物很难区别个体内的差异。SSR 引物筛选是 SSR 分子标记的前 (下转第 130 页)

之,1龄若虫过冷却点和结冰点均最高,其过冷却点为 $(-10.3 \pm 0.14)^\circ\text{C}$,与其他虫态之间的差异较显著。紫薇绒蚧的平均过冷却点和冰点分别为 (-17.83 ± 0.20) 和 $(-16.92 \pm 0.18)^\circ\text{C}$,过冷却点和结冰点差异较显著。

表1 紫薇绒蚧不同虫态过冷却点和结冰点

Table 1 The supercooling points and freezing points at different stages of *E. legerstroemiae* $^\circ\text{C}$

虫态 Insect stage	过冷却点 Super-cooling point	结冰点 Freezing point
1龄若虫 The first instar nymph	-10.31 ± 0.14	-9.93 ± 0.15
2龄若虫 The second instar nymph	-22.62 ± 0.16	-22.12 ± 0.21
蛹 Pupa	-20.85 ± 0.23	-19.43 ± 0.22
雌成虫 Female adult	-17.53 ± 0.22	-16.21 ± 0.16
平均 Average	-17.83 ± 0.20	-16.92 ± 0.18

3 结论与讨论

该研究对紫薇绒蚧1龄若虫、2龄若虫、蛹和雌成虫的过冷却点和结冰点进行测定,结果表明:紫薇绒蚧各虫态中以2龄若虫过冷却点和结冰点最低,故这个阶段抗寒性最强,该虫大多以2龄若虫越冬,一般情况下昆虫的越冬虫态抗寒力最强,因此时处于滞育或者休眠状态,故其耐受力较强^[19];1龄若虫冷却点和结冰点最高,这个阶段昆虫抵抗低温的能力最弱,这与1龄若虫表面蜡质层稀薄有一定关系。按紫薇绒蚧各虫态抗寒性从高到低的顺序排列为2龄若虫、蛹、雌成虫、1龄若虫。过冷却点的高低是昆虫耐寒性强弱的重要指标之一,一般情况下,过冷却点低则其耐寒性强,反之亦然^[20]。但过冷却点并非耐寒性的唯一指标,有相关研究显示,有大多数昆虫在达到过冷却点之前已死亡,所以一般不可以代表昆虫存活的低温下限^[21]。昆虫耐寒性除了与昆虫本身的发育阶段及滞育情况有关外,还受到气候的季节变化、栖息地纬度和海拔的差异等环境因素的影响^[22],所以关于紫薇绒蚧的低温存活试验和抗寒性等还需深入研究。

参考文献

- [1] 景晓红,康乐. 昆虫耐寒性的测定与评价方法[J]. 昆虫知识,2004,41(1):7-9.
- [2] 张蒲,肖运才,王军霞. 紫薇绒蚧的发生规律和综合防治技术的探讨[J]. 园林科技,2008(2):14,16.
- [3] 张振刚. 紫薇绒蚧的生物学特性与药剂防治试验[J]. 林业实用技术,2010(2):32-34.
- [4] 贺冬英,程建,赵胡,等. 紫薇绒蚧的生物学特性与药剂防治[J]. 昆虫知识,2008,45(5):811-814.
- [5] 中国科学院动物研究所. 中国农业昆虫:上册[M]. 北京:中国农业出版社,1986:483.
- [6] 赵玲. 紫薇绒蚧的发生规律及防治技术[J]. 现代农业科技,2015(15):145-146.
- [7] 焦浩,张玉俊. 宝鸡地区紫薇绒蚧的发生规律与防治策略[J]. 陕西农业科学,2011(1):107-109.
- [8] 张之光,石毓亮. 紫薇绒蚧形态及生物学的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),1986(2):65-70.
- [9] 关鑫,陆永跃,曾玲,等. 扶桑绵粉蚧的过冷却点和体液结冰点测定[J]. 环境昆虫学报,2009,31(4):381-384.
- [10] 张方平,朱俊洪,韩冬银,等. 橡副珠蜡蚧及其寄生蜂过冷却点的测定[J]. 环境昆虫学报,2013,35(6):827-831.
- [11] 钟景辉,张飞萍,江宝福,等. 不同地区松突圆蚧耐寒性的研究[J]. 中国生态农业学报,2010,18(1):117-122.
- [12] 秦玉川,杨建才. 一种便携式测定昆虫过冷却点的方法[J]. 昆虫知识,2000,47(4):236-238.
- [13] 任小云,张礼生,齐晓阳,等. 滞育七星瓢虫的代谢适应与抗寒性评价[J]. 环境昆虫学报,2015,37(6):1195-1202.
- [14] 岳雷,周忠实,刘志邦,等. 不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫耐寒性生理指标的影响[J]. 昆虫学报,2014,57(6):631-638.
- [15] 关鑫,陈芳,陆永跃. 广州地区棉花粉蚧雌成虫过冷却点和结冰点的季节性变化[J]. 广东农业科学,2015(4):55-59.
- [16] 张柱亭,孙宽,胡志凤,等. 东北地区亚洲玉米螟野生滞育幼虫耐寒性研究[J]. 应用昆虫学报,2013,50(5):1348-1353.
- [17] 孔锋. 美国白蛾越冬蛹抗寒性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2008.
- [18] 阙晓堂,王竹红,黄建. 小黑瓢虫过冷却点和结冰点的测定[J]. 武夷科学,2001,27(1):80-83.
- [19] 刘晓静,石荫,马纪. 小胸鳖甲各龄期幼虫过冷却点的测定[J]. 新疆农业科学,2012,49(6):1080-1085.
- [20] 薛冬,陈丹,范秀娟,等. 烟草潜叶蛾的过冷却点测定[J]. 环境昆虫学报,2014,36(5):860-864.
- [21] 杨燕涛,谢宝瑜,高增祥,等. 寄主植物对棉铃虫越冬蛹抗寒能力的影响[J]. 昆虫知识,2003,40(6):509-512.
- [22] 崔双双,贺一原. 昆虫的耐寒性及其影响因素[J]. 生命科学研究,2011,15(3):273-276.

(上接第121页)

提,该研究以5个不同椰子品种的基因组DNA作模板,对36对SSR引物进行筛选,由于种内品种间遗传关系较近,扩增到的特异位点较少,36对SSR引物共筛选到7对具有多态性的引物,为确保后续SSR分析的可靠性,进一步复筛,最后得到条带清晰、多态性明显的引物仅2对,这显然不够,今后还应继续筛选更多的SSR引物,用于椰子品种间遗传多样性的分析。

参考文献

- [1] SANKARAN M, DAMODARAN V, SINGH D R, et al. Characterization and diversity assessment in coconut collections of Pacific Ocean Islands and Nicobar Islands[J]. African journal of biotechnology, 2012, 11(97):16320

-16329.

- [2] LEBRUN P, BAUDOUIN L, BOURDEIX R, et al. Construction of a linkage map of the Rennell Island Tall coconut type (*Cocos nucifera* L.) and QTL analysis for yield characters[J]. Genome, 2001, 44(6):962-970.
- [3] MANIMEKALAI R, NAGARAJAN P. Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers[J]. Scientia horticulturae, 2006, 108(1):49-54.
- [4] ZHEBENTYAYEVA T N, REIGHARD G L, GORINA V M, et al. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm[J]. Theoretical and applied genetics, 2003, 106(3):435-444.
- [5] 罗意,黄绵佳,范海阔,等. 椰子SSR标记的开发[J]. 广东农业科学, 2012(23):139-141.
- [6] XIAO Y, LUO Y, YANG Y D, et al. Development of microsatellite markers in *Cocos nucifera* and their application in evaluating the level of genetic diversity of *Cocos nucifera*[J]. Plant omics journal, 2013, 6(3):193-200.