

福建省 53 份茶树种质资源 SSR-PCR 反应体系的优化

朱晨^{1,2}, 田采云¹, 张舒婷^{1,3}, 常笑君^{1,2}, 傅海峰¹, 李小桢¹, 陈常颂⁴, 林玉玲^{1,3}, 郭玉琼^{1,2*}

(1. 福建农林大学园艺学院, 福建福州 350002; 2. 茶学福建省高校重点实验室, 福建福州 350002; 3. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建福州 350002; 4. 福建省农业科学院茶叶研究所, 福建福安 355015)

摘要 [目的]优化茶树种质资源 SSR-PCR 反应体系。[方法]以福建省不同地区的 53 份茶树种质资源作为 SSR-PCR 体系优化的供试材料,通过 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计,对茶树 SSR-PCR 反应体系的 3 个影响因素:DNA 模板浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)、引物浓度(mmol/L)和 *Taq* 酶浓度(U)在 4 个水平上进行比较筛选,并进行 PCR 验证。[结果]优化后最佳的福建省茶树 SSR-PCR 反应体系为 25 μL 体系,其中 DNA 模板浓度 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、引物浓度 0.25 mmol/L 、*Taq* 酶浓度 1.25 U。并从 23 对茶树 SSR 引物中筛选出 5 对清晰、明亮、无杂带的引物,适用于福建省茶树 SSR 标记的进一步研究。[结论]该研究可为后续福建省茶树品种的亲缘关系分析、杂交品种的选育等研究提供依据。

关键词 茶树; 种植资源; SSR-PCR; 体系优化; 正交设计

中图分类号 S571.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)28-0088-04

Optimization of SSR-PCR Reaction System for 53 Tea (*Camellia sinensis*) Germplasm Resources in Fujian Province

ZHU Chen^{1,2}, TIAN Cai-yun¹, ZHANG Shu-ting^{1,3} et al (1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Key Laboratory of Tea Science in Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350002; 3. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract [Objective] To optimize the SSR-PCR reaction system for tea germplasm resources. [Method] Fifty-three tea plant germplasm resources in different regions of Fujian Province were used as the optimized materials for the SSR-PCR system. Through the $L_{16}(4^3)$ orthogonal design, three factors affecting the SSR-PCR reaction system of tea plant, DNA template concentration ($\text{ng}/\mu\text{L}$), primer concentration (mmol/L) and *Taq* enzyme concentration (U) were screened at four levels, and PCR verification was performed. [Result] The optimum SSR-PCR reaction system for tea in Fujian Province was 25 μL system, in which the concentration of DNA template was 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, primer concentration was 0.25 mmol/L , *Taq* enzyme concentration was 1.25 U. From 23 pairs of SSR primers, 5 pairs of primers with clear, bright and no-stray bands were selected, which is suitable for further study on SSR markers of tea plants in Fujian Province. [Conclusion] This study provides a basis for the analysis of the genetic relationship and hybrid breeding of tea cultivars in Fujian Province.

Key words *Camellia sinensis*; Germplasm resource; SSR-PCR; System optimization; Orthogonal design

茶树(*Camellia sinensis*)属于山茶科山茶属,是多年生、木本、常绿植物,福建省是茶叶的主产地之一,该省茶树栽培历史悠久,种质资源丰富^[1]。近年来随着新品种选育研究和示范推广工作的不断深入,越来越多的优良茶树新品种对茶区产量和品质提升起到了推动作用^[2]。但优质茶树种质资源应用并不容易,因此,应进一步发掘、鉴定、筛选和推广具有众多优良遗传性状的种质资源^[3]。传统的育种方法选育周期长,亲本选择范围有限,种质资源的识别、鉴定困难等问题,限制了茶树种质资源研究工作的进一步深入。

SSR (simple sequence repeat) 标记是以串联重复 DNA 序列 PCR 扩增为核心的新型 DNA 分子技术^[4]。SSR 分子标记技术具有基因组覆盖率、多态性高,多等位基因特性显著,遗传信息量大等优点,在分子标记领域得到广泛认可^[5],并已运用到众多作物领域^[6-8]。已有报道显示,由于不同茶树品种的 SSRs 重复基元和重复次数都存在变异,同时 SSRs 两侧序列保守性高^[9],可以在 SSRs 的侧翼序列上设计特异引

物^[10],进行 PCR 扩增,电泳检测,依据扩增产物的多态性位点对茶树种质资源进行识别、鉴定、研究和分析^[11]。SSR 技术作为一种理想可靠的分子标记技术可以运用于茶树遗传连锁图谱构建^[12]、茶树亲缘关系^[13]、茶树遗传多样性^[14]、茶树种质资源鉴定和新品种选育等研究中^[15]。福建省茶树 SSR 技术研究起步较晚,适用于福建省茶树 SSR 标记数据库信息有限,国内外有关福建省茶树 SSR-PCR 体系优化的报道较少,这在极大程度上制约了福建茶树遗传分析、种质资源鉴定等研究的深入^[16]。因此,建立适合福建省茶树的 SSR-PCR 扩增体系至关重要。笔者以课题组的转录组数据为依托,开发适用于福建省茶树 SSR 的相关引物,并利用 $L_{16}(4^3)$ 正交试验对福建省茶树 SSR-PCR 反应体系进行优化筛选,旨在建立稳定高效的福建省茶树 SSR-PCR 反应体系,为后续 SSR 分子标记技术应用于福建省茶树亲缘关系分析和遗传多样性分析,揭示当前福建省茶树种质资源的现状提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料 53 份供试材料采自福建省 7 个地区(表 1),采后将茶树叶片置于密封袋中,经液氮处理后放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 茶叶 DNA 提取 茶树基因组 DNA 提取参照王磊等^[17]的改良 CTAB 法,用 2% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。

基金项目 福建省重大科技专项(2015NZ0002-1);福建省重大农技推广项目(KNJ151003);福建农林大学科技创新专项(CXZX2017164);福建农林大学乡村振兴茶产业技术服务项目(11899170102)。

作者简介 朱晨(1992—),男,安徽铜陵人,博士研究生,研究方向:茶树生物技术与茶叶生物化学。田采云(1997—),女,山西广灵人,从事茶树生物技术与茶叶生物化学研究。朱晨与田采云为共同第一作者。* 通讯作者,副教授,博士,从事茶树生物技术与茶叶生物化学研究。

收稿日期 2018-05-31; **修回日期** 2018-07-05

表 1 供试茶树资源及来源

Table 1 Resources and sources of tea plant

序号 No.	采样地 Sampling site	种质资源 Resource
1	福州鼓山	鼓山半岩茶(绿芽)、鼓山半岩茶(紫芽)
2	福州罗源	罗源碧里西洋、罗源中房沙坂、罗源白塔九溪、罗源飞竹外坂、罗源西洋 1 号、罗源西洋 2 号、榕春早
3	福州永泰	紫芽种、大叶 2 号
4	闽侯方山	乔木老树、方山 2 号、泮野 2 号、云门寺野茶
5	南平武夷山	软枝乌龙、矮脚乌龙-1、矮脚乌龙-2、大红袍、肉桂、铁罗汉、半天妖、白鸡冠
6	宁德福安	四季春、金萱、翠玉、迎春、白芽奇兰、诏安八仙、绿芽佛手、红芽佛手、霞浦元宵绿、福安菜茶、福云 6 号、福云 10 号、福鼎大白茶、武夷菜茶
7	泉州安溪	黄旦、本山、西坪铁观音-1、西坪铁观音-2、西坪铁观音-3、西坪铁观音-4、西坪铁观音-5、西坪铁观音-6、槐川铁观音、槐植铁观音-1、槐植铁观音-2、祥华铁观音-1、祥华铁观音-2、龙涓举溪铁观音-1、龙涓举溪铁观音-2、龙涓举源铁观音

1.2.2 SSR 引物筛选。根据茶树转录组数据运用 Primer 3 程序,选取 23 对 SSR 引物进行筛选,SSR-PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,退火(温度根据不同引物而定)1 min,72 °C 延伸 45 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。选择扩增条带单一、清晰明亮、无严重拖带的引物进行后续 SSR-PCR 反应体系的优化研究。

1.2.3 SSR-PCR 反应体系筛选。采用 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计,对茶树 SSR-PCR 反应体系的 3 个影响因素:DNA 模板浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)、引物浓度(mmol/L)和 Taq 酶浓度(U)在 4 个水平上进行比较筛选, $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计见表 2。

1.2.4 最适退火温度筛选。利用筛选出的 SSR 引物,根据各引物 T_m 值,选取 48~56 °C 之间 9 个梯度的退火温度进行试验,根据退火温度下的 SSR-PCR 扩增结果进行比较,确定各引物的最适退火温度。

表 2 茶树 SSR-PCR 反应正交试验设计

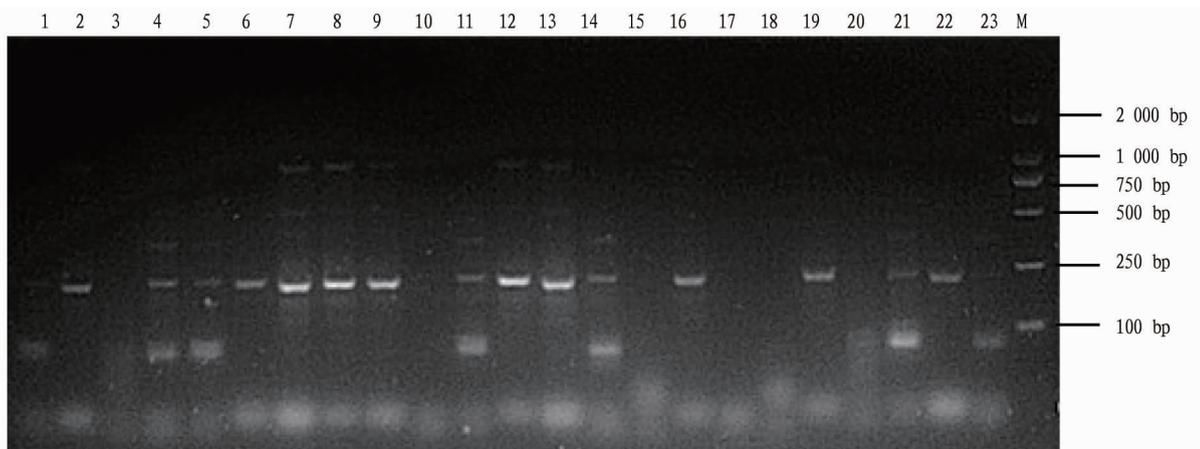
Table 2 Orthogonal test design of SSR-PCR reaction in tea plant

编号 Code	因素 Factor		
	DNA 模版 DNA template $\text{ng}/\mu\text{L}$	引物 Primer mmol/L	Taq 酶 Taq enzyme U
1	25	0.15	1.00
2	25	0.20	1.25
3	25	0.25	1.50
4	25	0.30	1.75
5	50	0.15	1.75
6	50	0.20	1.50
7	50	0.25	1.25
8	50	0.30	1.00
9	75	0.15	1.25
10	75	0.20	1.00
11	75	0.25	1.75
12	75	0.30	1.50
13	100	0.15	1.50
14	100	0.20	1.75
15	100	0.25	1.00
16	100	0.30	1.25

1.2.5 SSR-PCR 优化体系验证。从筛选出的 SSR 引物中随机选取一个引物,同时从 53 个茶树 DNA 模板中随机选取 12 个,根据 2% 琼脂糖电泳检测和 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)^[18] 的扩增结果综合判断福建省茶树 SSR-PCR 优化体系是否可靠。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物筛选结果 根据电泳结果显示,23 对引物中筛选出 5 对扩增结果符合预期的引物(G2、G6、G16、G19、G22),扩增条带单一、清晰明亮、无严重拖带、扩增效果最佳(图 1)。另外 18 对 SSR 引物存在扩增条带多且不够清晰明亮的问题。



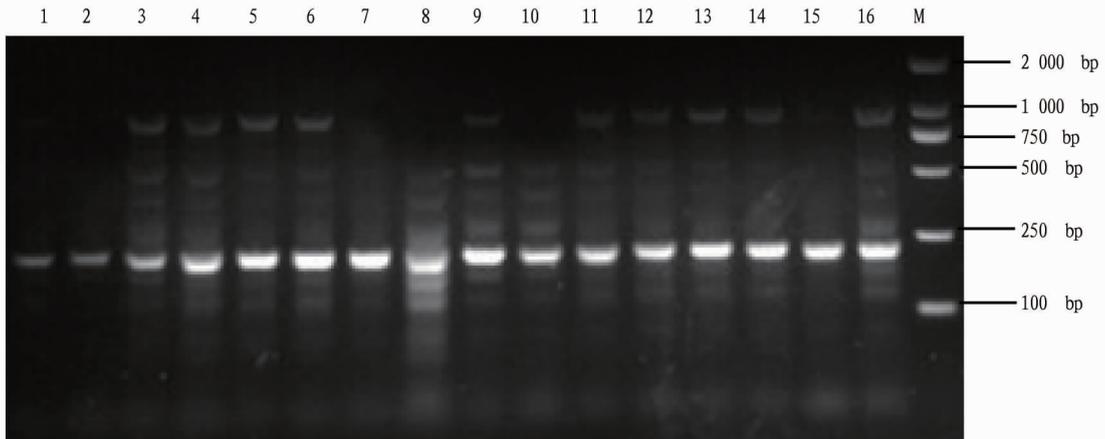
注:M.DL2000 DNA Marker

图 1 23 对引物 SSR-PCR 扩增结果

Fig.1 SSR-PCR amplification results of 23 pairs of primer

2.2 SSR-PCR 体系优化结果 根据茶树 SSR-PCR 反应 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计,PCR 扩增后的电泳结果如图 2 所示,16 个组合中有 10 个组合的扩增条带明亮,3 号、4 号、5 号、6 号、9 号、11 号和 12 号组合存在非特异性扩增条带;1 号、2

号和 7 号主带明显,无非特异性扩增条带,其中 7 号组合扩增出的条带最为清晰明亮、单一、稳定性最好且无其他杂带,因此 7 号组合为最佳的 SSR-PCR 反应体系,该体系的组合为 DNA 模板 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、引物 0.25 mmol/L 、Taq 酶 1.25 U。



注: M. DL2000 DNA Marker

图2 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计 SSR-PCR 扩增结果

Fig.2 The amplification results of $L_{16}(4^3)$ orthogonal experiment

2.3 最适退火温度的确定 退火温度影响 SSR 引物与 DNA 模板的特异性结合,利用之前筛选出来的 G2、G6、G16、G19 和 G22 这 5 对最佳的 SSR 引物进行退火温度 PCR 扩增, PCR 电泳结果(表 3)表明退火温度过高或过低时,PCR 扩增

条带都不太理想;当退火温度为 50~51 °C 时,各引物扩增的谱带清晰丰富,因此确定后续 SSP-PCR 扩增体系验证时的各引物的最佳退火温度。

表 3 SSR 引物在各退火温度下的扩增结果

Table 3 The amplification results of SSR primers at each annealing temperature

引物 Primer	各退火温度下扩增结果 The amplification results at each annealing temperature//°C									
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	
G2-F/G2-R	-	-/+	+	++	+	-/+	-	-	-	
G6-F/G6-R	-/+	-/+	+	++	+	+	-/+	-	-	
G16-F/G16-R	-	-	-	+	++	+	-/+	-	-	
G19-F/G19-R	+	+	++	+	+	-/+	-	-	-	
G22-F/G22-R	-	-/+	+	++	+	-/+	-	-	-	

注:-为无扩增条带;+为有扩增条带;-/+为扩增条带不清晰;++为扩增条带清晰

Note:- no amplification band;+ amplification band;-/+ unclear amplification band;++ clear amplification band

2.4 SSR-PCR 扩增体系验证分析 在筛选出的 G2、G6、G16、G19、G122 这 5 对 SSR 引物中随机选取 G6 引物,并从 53 份茶树种质资源中随机选取 12 份 DNA 模板进行 SSR-PCR 扩增体系验证,根据 2% 琼脂糖凝胶电泳结果可知扩增条带清晰明亮、单一、平整无杂带(图 3);同时 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)扩增电泳结果显示 SSR-PCR 扩增体系扩增出的条带清晰、多态性较强(图 4),以上结果表明该 SSR-PCR 优化体系具有较好的稳定性和可重复性,适用于福建省茶树种质资源的 SSR 分析研究。

3 结论与讨论

SSR 分子标记检测过程中最重要的环节就是 PCR 扩增,建立稳定的 SSR-PCR 反应体系和扩增程序是 SSR 分析的必要前提。而 SSR-PCR 反应体系涉及诸多因素,各因素均可能对 PCR 扩增的敏感性、特异性和扩增产量产生影响^[19],如用未优化的 SSR-PCR 体系进行试验,会导致 PCR 扩增结果的准确性大大降低,不利于 SSR 分子标记发挥其应有的作用,从而进一步影响到后续的遗传关系鉴定、亲缘分析、杂交亲本的选育、遗传图谱构建工作的开展^[20]。一般进行 SSR-PCR 反应体系优化的方法有 2 种,分别为正交试验

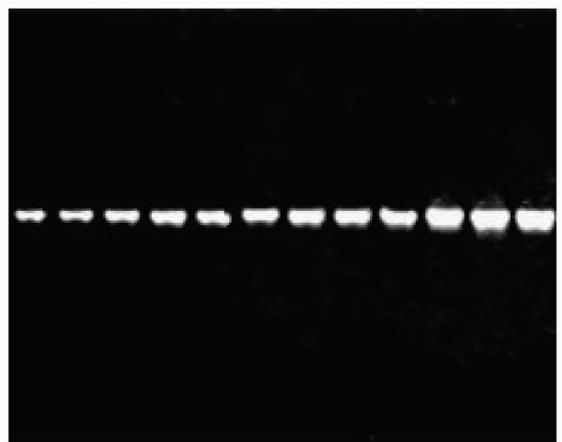


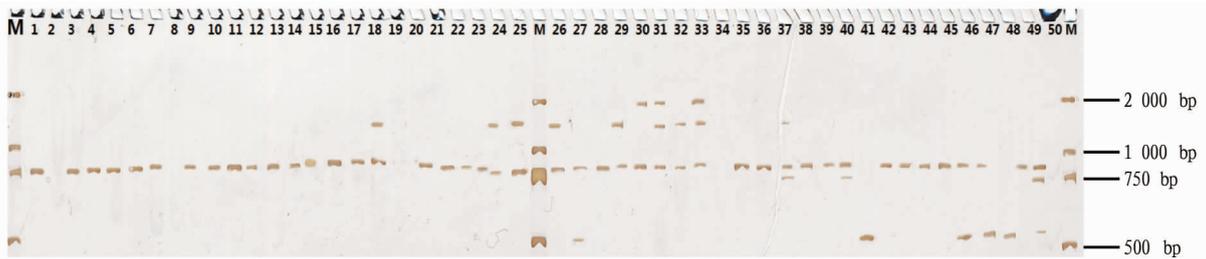
图3 琼脂糖凝胶 SSR-PCR 扩增体系验证结果

Fig.3 Verification of agarose gel SSR-PCR amplification system

法和单因素试验法。单因素试验法过程繁琐,需要根据各个因素的改变进行反复多次试验,耗费成本高,且各因素间的交互效应易被忽略^[21]。相比单因素试验法,正交试验设计就完全避免了以上缺陷。正交试验设计既能做到分散性效果均衡检测,又能综合分析比较各个因素的交互影响,还可

以对单个因素水平不同时的扩增结果进行检测分析。该研究采用正交试验设计法,通过 DNA 模板和引物的随机抽取,尽量降低偶然性误差对试验结果的影响^[22],并进行非变性

聚丙烯酰胺凝胶(Native-PAGE)SSR-PCR 扩增体系优化的验证,从多方面确保 SSR-PCR 优化体系结果的准确可靠^[8]。



注: M. DL2000 DNA Marker

图 4 聚丙烯酰胺凝胶(Native-PAGE)SSR-PCR 扩增体系验证结果

Fig.4 Verification of polyacrylamide gel SSR-PCR amplification system

在 SSR-PCR 体系优化试验中,当 DNA 模板、引物和 *Taq* 酶浓度过高或过低时,会导致 PCR 扩增的重复性下降、碱基错配、形成引物二聚体和非特异性产物产生^[23]。同时,退火温度直接影响 PCR 的扩增效率和扩增产物的大小,过低的退火温度易产生多条杂带,不利于后续条带统计分析,过高则 PCR 扩增准确度下降,目的条带模糊。因此须对不同引物进行退火温度筛选,以确定各引物的最适退火温度^[24]。

经过 SSR-PCR 优化体系和验证试验,确认福建省茶树种质资源最佳 SSR-PCR 反应体系为 *Taq* 酶 1.25 U (12.5 μ L)、ddH₂O 9.5 μ L、DNA 模板 1 μ L (浓度 50 ng/ μ L)、上下游引物各 1 μ L (浓度 0.25 mmol/L),总体积 25 μ L。在这个反应体系下进行 SSR-PCR 反应体系优化验证,得到的条带清晰明亮、平整、无杂带和拖带。表明该 SSR-PCR 优化体系稳定、可靠、重复性良好,可以进一步用于福建省茶树种质资源亲缘关系分析、优良品种选育等研究,为现有福建省珍稀茶树种质资源的鉴别和保护,建立省级优良茶树种质资源的 SSR 指纹图谱,以及福建省茶树核心种质资源库的建立提供科学依据。

参考文献

[1] 林志坤,孙威江,陈志丹,等. ISSR 分子标记技术及其在茶树研究中的应用[J]. 广东农业科学, 2014, 41(9): 139-142.
 [2] 李冬,张俊. 茶树新品种选育研究及推广应用[J]. 云南农业, 2006(12): 33.
 [3] 王萍,母洪娜,耿兴敏,等. 利用正交试验设计优化桂花的 SSR-PCR 体系[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(2): 44-46.
 [4] 范小宁,林萍,张盛周. 油茶 SSR-PCR 反应体系的优化研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(23): 14098-14102.
 [5] FISHER P J, GARDNER R C, RICHARDSON T E. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR [J]. Nucleic acids research, 1996, 24(21): 4369-4371.

[6] 赵鹏, WOSETE K E, 程飞, 等. 美国黑核桃 SSR 反应体系优化[J]. 植物研究, 2012, 32(2): 213-221.
 [7] 张皓凯,董胜君,刘明国,等. 山杏 SSR-PCR 反应体系优化[J]. 北方园艺, 2017(3): 115-120.
 [8] 周丽霞. 椰子 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 江西农业学报, 2017, 29(4): 36-39.
 [9] 洪仕南. 基于龙眼转录组的 SSR 引物开发与应用研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
 [10] 孙清信. 紫云英 SSR 引物的开发及种质资源遗传多样性分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
 [11] 胡小利, 马庆, 包海柱, 等. 食用向日葵 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 华北农学报, 2015, 30(2): 161-165.
 [12] 南文卓, 郑丹炜, 朱国鹏, 等. 甘薯 TD-SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 热带作物学报, 2017, 38(1): 89-93.
 [13] 翟梅枝, 肖志娟, 许静, 等. ISSR 和 SSR 体系优化及在分析不同核桃品种遗传多样性上的应用[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(1): 90-97.
 [14] 贾新平, 孙晓波, 梁丽建, 等. 绣球 SSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 华北农学报, 2016, 31(4): 68-73.
 [15] 马寅峰. 桂花 SSR 引物的开发和 SCoT 分子标记体系的建立[D]. 郑州: 河南大学, 2015.
 [16] 谭月萍. 茶树 SSR 分子标记技术体系的建立与应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
 [17] 王磊, 陈琪, 杨华, 等. 适于 SSR 分析的茶树高质量基因组 DNA 提取方法[J]. 茶业通报, 2013, 35(1): 21-24.
 [18] CHARTERS Y M, WILKINSON M J. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm[J]. Theoretical and applied genetics, 2000, 100(1): 160-166.
 [19] 周静, 陈书霞, 程智慧, 等. 大蒜 SSR 体系的建立与优化[J]. 西北农业学报, 2011, 20(11): 117-122.
 [20] 王心迪, 黄如葵, 冯诚诚, 等. 正交设计直观分析法优化苦瓜 SSR-PCR 反应体系[J]. 北方园艺, 2016(10): 99-103.
 [21] 任鹏鸿, 韩睿, 马胜超, 等. 菊芋 SSR-PCR 反应体系优化及 3 个品种的分子鉴别[J]. 西南农业学报, 2013, 26(6): 2441-2446.
 [22] 王芳, 廖柏勇, 李培, 等. 苦楝 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 林业科学研究, 2016, 29(2): 167-175.
 [23] 毕红园, 王长彪, 段永红, 等. 采用正交设计法优化梨 SSR-PCR 体系[J]. 生物技术通报, 2013(5): 111-115.
 [24] 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.

科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如 1990 年不能写成 90 年,文中避免出现“去年”“今年”等写法。小于 1 的小数点前的零不能省略,如 0.245 6 不能写成 .245 6。小数点前或后超过 4 位数(含 4 位数),从小数点向左右每 3 位空半格,不用“,”隔开。如 18 072.235 71。尾数多的数字(5 位以上)和小数点后位数多的小数,宜采用 $\times 10^n$ (n 为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。