

## 珍稀濒危植物银缕梅 ISSR-PCR 反应体系建立及优化

陈云霞, 路志远, 肖卓恒 (南京森林警察学院, 江苏南京 210023)

**摘要** [目的]建立和优化银缕梅 ISSR-PCR 反应体系。[方法]采用正交试验和单因子试验对影响 PCR 扩增体系中的  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs、模板 DNA 及引物浓度、*Taq* 酶用量 5 个因子进行分析研究。[结果]银缕梅 ISSR-PCR 25  $\mu$ L 反应体系中 5 个因子最优水平: DNA 模板(20 ng/ $\mu$ L)2.50  $\mu$ L, 引物(10  $\mu$ mol/L)1.00  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L)0.10  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L)3.00  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.50  $\mu$ L。[结论]银缕梅 ISSR-PCR 反应最优体系的建立为进一步利用 ISSR 对其进行分子标记辅助育种、分子指纹图谱构建和遗传多样性分析等后续研究奠定了基础。

**关键词** 银缕梅; ISSR; PCR 反应体系; 资源保护

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)11-0081-03

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for Rare and Endangered Plant *Parrotia subaequalis*

CHEN Yun-xia, LU Zhi-yuan, XIAO Zhuo-heng (Nanjing Forest Police College, Nanjing, Jiangsu 210023)

**Abstract** [Objective] To establish and optimize ISSR-PCR reaction system. [Method] Effect for ISSR-PCR reaction of *Parrotia subaequalis* on 5 factors ( $Mg^{2+}$ , dNTPs, DNA template, *Taq* polymerase and primer) were analyzed by orthogonal design and single factor test. [Result] The optimal ISSR-PCR reaction system (25  $\mu$ L) mixture contained DNA template (20 ng/ $\mu$ L) 2.50  $\mu$ L, primer (10  $\mu$ mol/L) 1.00  $\mu$ L, *Taq* polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.10  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L) 3.00  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.50  $\mu$ L. [Conclusion] The establishment of ISSR-PCR reaction system for *P. subaequalis* laid the foundation for the further use of ISSR to study molecular marker-assisted breeding, molecular identity and genetic diversity.

**Key words** *Parrotia subaequalis*; ISSR; PCR reaction system; Resources protection

银缕梅(*Parrotia subaequalis*)是仅存于我国被再发现的“活化石”树种,也是我国特有的单种属乔木树种,在植物进化史上有着承前(裸子植物)启后(被子植物)的重要地位。银缕梅是一种珍贵的兼具观花和秋季观叶的优良绿化观赏树种。但由于其分布区狭小,呈间断岛屿状散布于天目山北段及大别山东南部,现存种群个体数量极少,已濒于灭绝,1999年被列入《国家一级重点保护野生植物名录》<sup>[1-2]</sup>,并被国际自然保护联盟(IUCN)列为极度濒危(critically endangered, CR)物种<sup>[3]</sup>。面对如此严峻的形势,对银缕梅遗传多样性的研究与分析,制定更具针对性的种质资源保护策略非常迫切。

简单重复序列区间扩增(inter-simple sequence repeats, ISSR)是在卫星技术基础上发展起来的一类分子标记技术。ISSR 技术以其多态性好、成本低、操作简单、所需 DNA 模板含量少等特点备受青睐,其在植物种质资源收集和鉴定、遗传多样性和亲缘关系及基因定位等方面被广泛应用<sup>[4-5]</sup>。

近年来针对银缕梅开展的研究工作虽然比较活跃,但大多数研究还是集中于形态解剖<sup>[6-7]</sup>、系统分类<sup>[8-9]</sup>、生理生态<sup>[10-16]</sup>、生物学特性<sup>[17-18]</sup>及繁殖培育<sup>[19-21]</sup>等方面,在分子水平的研究几乎空白。笔者通过正交试验和单因子试验,分析模板 DNA、*Taq* 酶、引物、 $Mg^{2+}$  和 dNTPs 5 个因子对银缕梅 ISSR-PCR 反应的影响,建立银缕梅最佳 ISSR-PCR 反应体系,以期利用 ISSR 标记对其进行分子标记辅助育种、分子身份证构建和遗传多样性分析等后续研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材料 银缕梅植物材料采自江苏省宜兴林场大垅沟,

基金项目 国家级大学生创新训练项目(201612213012)。

作者简介 陈云霞(1982—),女,山西吉县人,副教授,博士,从事野生动植物鉴定与保护研究。共同第一作者:路志远(1996—),男,安徽亳州人,专业:刑事科学技术。

收稿日期 2018-01-19;修回日期 2018-02-01

植物叶片采用硅胶快速干燥保存。

## 1.2 方法

**1.2.1 银缕梅 DNA 提取。**将 0.1 g 银缕梅叶片剪碎,先用液氮处理再用研钵研磨粉碎,用 DNeasy Plant Mini Kit 植物基因组 DNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司)提取基因组。使用紫外分光光度法和 1% 琼脂糖凝胶电泳法对 DNA 的浓度和质量进行检测。

**1.2.2 银缕梅 ISSR-PCR 反应引物筛选。**从加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的 100 个 ISSR 引物中随机选择 16 条引物(805、809、816、821、829、832、834、838、843、845、851、863、869、872、877、880)进行初筛选。初反应体系为 25  $\mu$ L,其中 *Taq* 酶 0.20  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  2.00  $\mu$ L, DNA 2.00  $\mu$ L, dNTPs 2.00  $\mu$ L, 引物 1.00  $\mu$ L, MilliQ 水 17.80  $\mu$ L。

扩增的程序为 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 36 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

**1.2.3 银缕梅 ISSR-PCR 反应体系建立。**对银缕梅 ISSR 反应 5 因素(*Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、DNA、dNTPs、引物)进行 4 浓度梯度试验,共 16 个处理,建立银缕梅 ISSR-PCR 反应体系(表 1)。

**1.2.4 银缕梅 ISSR-PCR 反应单因子试验设计。**对正交试验建立的 ISSR-PCR 反应体系进行单因子(*Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、DNA、dNTPs、引物)试验,分析不同因素对银缕梅 ISSR-PCR 反应的影响(表 2)。

## 2 结果与分析

**2.1 目标引物确定** 经过对多态性、稳定性以及亮度的综合比较后,结果显示引物 845 的条带效果最好(图 1)。因此选定引物 845 来进行银缕梅 ISSR-PCR 反应体系正交试验探索。

**2.2 银缕梅 ISSR-PCR 正交试验结果** 对引物 845 进行 5

因素4梯度的正交试验(图2),发现16个处理中只有处理5和9没有扩增出条带。对有扩增条带的进行进一步比较,发现处理6条带最清晰、多态性较好,故选取处理6进行单因子试验。由表1可知,处理6的25  $\mu\text{L}$ 反应体系中,DNA 2.50  $\mu\text{L}$ (20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ),*Taq*酶0.10  $\mu\text{L}$ (5  $\text{U}/\mu\text{L}$ ),引物1.00  $\mu\text{L}$ (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ),dNTPs 1.50  $\mu\text{L}$ (2.5  $\text{mmol}/\text{L}$ ), $\text{Mg}^{2+}$  3.00  $\mu\text{L}$ (25  $\text{mmol}/\text{L}$ )。根据正交试验结果,设计出单因子试验浓度梯度(表2)。

表1 银缕梅 ISSR-PCR 反应体系正交试验设计

Table 1 The orthogonal experiment design of ISSR-PCR reaction system for *P. subaequalis*  $\mu\text{L}$

编号 No.	DNA	引物 Primer	dNTPs	$\text{Mg}^{2+}$	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> polymerase
1	1.00	0.50	0.50	2.00	0.10
2	1.00	1.00	1.00	1.50	0.15
3	1.00	1.50	1.50	3.00	0.20
4	1.00	2.00	2.00	2.50	0.25
5	2.50	0.50	2.00	2.50	0.15
6	2.50	1.00	1.50	3.00	0.10
7	2.50	1.50	1.00	1.50	0.25
8	2.50	2.00	0.50	2.00	0.20
9	4.00	0.50	1.00	3.00	0.25
10	4.00	1.00	0.50	2.50	0.20
11	4.00	1.50	2.00	2.00	0.15
12	4.00	2.00	1.50	1.50	0.10
13	6.00	0.50	1.50	1.50	0.10
14	6.00	1.00	2.00	2.00	0.20
15	6.00	1.50	0.50	2.50	0.15
16	6.00	2.00	1.00	3.00	0.25

注: DNA 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ; 引物 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ; dNTPs 2.5  $\text{mmol}/\text{L}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$  25  $\text{mmol}/\text{L}$ ; *Taq* 酶 5  $\text{U}/\mu\text{L}$ 。

Note: DNA 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ; Primer 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ; dNTPs 2.5  $\text{mmol}/\text{L}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$  25  $\text{mmol}/\text{L}$ ; *Taq* Polymerase 5  $\text{U}/\mu\text{L}$ 。

表2 银缕梅 ISSR-PCR 反应体系单因子试验设计

Table 2 The single factor experiment design of ISSR-PCR reaction system for *P. subaequalis*  $\mu\text{L}$

编号 No.	DNA	引物 Primer	dNTPs	$\text{Mg}^{2+}$	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> polymerase
1	2.00	1.00	1.50	3.00	0.10
2	2.50	1.00	1.50	3.00	0.10
3	3.00	1.00	1.50	3.00	0.10
4	3.50	1.00	1.50	3.00	0.10
5	2.50	0.80	1.50	3.00	0.10
6	2.50	1.00	1.50	3.00	0.10
7	2.50	1.20	1.50	3.00	0.10
8	2.50	1.40	1.50	3.00	0.10
9	2.50	1.00	1.20	3.00	0.10
10	2.50	1.00	1.50	3.00	0.10
11	2.50	1.00	1.80	3.00	0.10
12	2.50	1.00	2.10	3.00	0.10
13	2.50	1.00	1.50	2.60	0.10
14	2.50	1.00	1.50	3.00	0.10
15	2.50	1.00	1.50	3.40	0.10
16	2.50	1.00	1.50	3.80	0.10
17	2.50	1.00	1.50	3.00	0.05
18	2.50	1.00	1.50	3.00	0.10
19	2.50	1.00	1.50	3.00	0.15
20	2.50	1.00	1.50	3.00	0.20

注: DNA 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ; 引物 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ; dNTPs 2.5  $\text{mmol}/\text{L}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$  25  $\text{mmol}/\text{L}$ ; *Taq* 酶 5  $\text{U}/\mu\text{L}$ 。

Note: DNA 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ; Primer 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ; dNTPs 2.5  $\text{mmol}/\text{L}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$  25  $\text{mmol}/\text{L}$ ; *Taq* Polymerase 5  $\text{U}/\mu\text{L}$ 。

**2.3.1 模板 DNA 浓度对银缕梅 ISSR-PCR 反应的影响。**最优 DNA 模板浓度取决于物种基因组大小及 DNA 模板纯度。该研究比较了 25  $\mu\text{L}$  反应体系中模板 DNA 4 个浓度梯

度 2.00、2.50、3.00、3.50  $\mu\text{L}$ (20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )的扩增效果,发现在一般情况下,随着浓度的增加,条带亮度和多态性都会增强。因此银缕梅 ISSR-PCR 体系模板 DNA 浓度在 0.50 ~ 5.00  $\mu\text{L}$ (20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )时,2.50  $\mu\text{L}$ (20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )的效果最优。

M 805 809 816 821 829 832834838 843 845 851 863 869 872 877 880

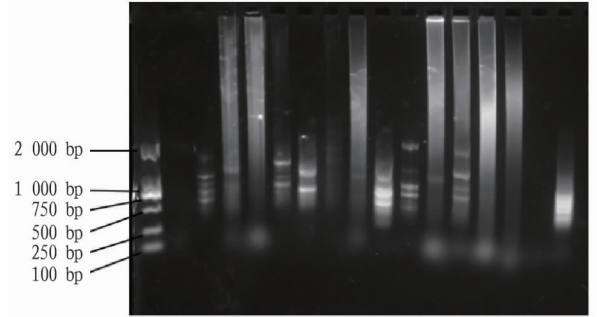


图1 16条引物 ISSR-PCR 扩增电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of 16 primers ISSR-PCR amplification

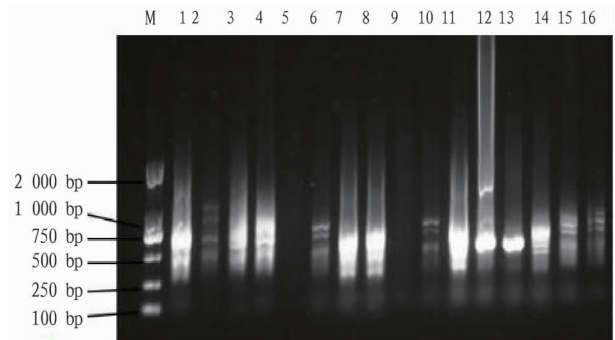


图2 引物 845 正交试验电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of primer 845 orthogonal experiment

**2.3 银缕梅 ISSR-PCR 单因子试验结果** 图3为不同浓度的 DNA、引物、dNTPs、 $\text{Mg}^{2+}$  和 *Taq* 酶对银缕梅 ISSR-PCR 反应的影响。

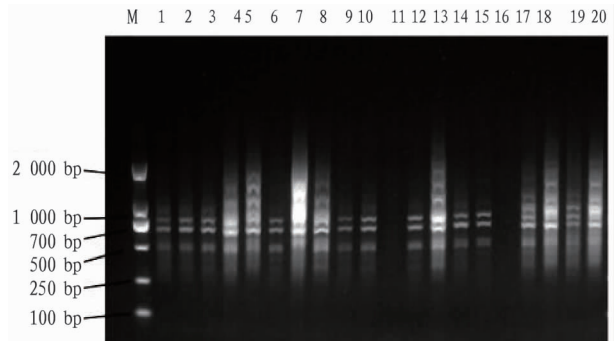


图3 单因子试验电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis results of single factor experiment

**2.3.2 引物浓度对银缕梅 ISSR-PCR 反应的影响。**引物浓度直接影响 PCR 结果的可靠性。浓度偏高可能会引起错配和非特异性扩增,浓度过低则可能无法检测出所有 ISSR 位点。试验设置了 0.80、1.00、1.20、1.40  $\mu\text{L}$ (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )4 个梯度。由图3可知,浓度在 1.00  $\mu\text{L}$ (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )时条带最

多且清晰,所以该浓度是银缕梅 ISSR-PCR 体系的最适引物浓度。

**2.3.3 dNTPs 浓度对银缕梅 ISSR-PCR 反应的影响。**作为 ISSR-PCR 反应的原料,dNTPs 浓度过高,会出现非特异性扩增条带;反之则影响合成效率。由图 3 可知,在浓度为 1.50  $\mu\text{L}$  (2.5 mmol/L) 时扩增条带亮度和多态性最好,故银缕梅 ISSR-PCR 体系 dNTPs 最优浓度为 1.50  $\mu\text{L}$  (2.5 mmol/L)。

**2.3.4  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对银缕梅 ISSR-PCR 反应的影响。** $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 PCR 扩增特异性和产物有显著影响。比较反应体系中 2.60、3.00、3.40、3.80  $\mu\text{L}$  (25 mmol/L) 4 个浓度电泳结果,当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 3.00  $\mu\text{L}$  (25 mmol/L) 时条带多态性较丰富,因此银缕梅 ISSR-PCR 体系中最适  $\text{Mg}^{2+}$  浓度应为 3.00  $\mu\text{L}$  (25 mmol/L)。

**2.3.5 Taq 酶浓度对银缕梅 ISSR-PCR 反应的影响。**Taq 酶用量直接影响扩增反应成功与否,使用高浓度 Taq 酶易产生非特异扩增产物,但如果 Taq 酶浓度过低,则会导致产物合成效率下降。由图 3 可知,Taq 酶浓度在 0.05 ~ 0.50  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 时,以 0.10  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 的效果最好。

### 3 讨论与结论

ISSR-PCR 是基于 PCR 反应的分子标记,具有稳定性好、多态性高的特点,建立稳定性好、扩增效率高的反应体系是开展后续研究的基础。ISSR 反应体系容易受到模板 DNA 浓度和纯度、引物与 dNTPs 用量、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度、Taq 酶浓度等因素的影响,为了保证 ISSR-PCR 反应结果的清晰、准确,必须对扩增条件进行优化。该试验先采用正交设计进行初筛选,再通过单因素进行优化,最终筛选出银缕梅 ISSR-PCR 的最佳反应体系,即 25  $\mu\text{L}$  的反应体系中 DNA 模板 2.50  $\mu\text{L}$  (20 ng/ $\mu\text{L}$ ),引物浓度 1.00  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ),Taq 酶浓度 0.10  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ), $\text{Mg}^{2+}$  浓度 3.00  $\mu\text{L}$  (25 mmol/L),dNTPs 浓度 1.50  $\mu\text{L}$  (2.5 mmol/L)。上述 ISSR 反应体系中,关键影响因子为引物浓度和 Taq 酶浓度。引物浓度不同,扩增片段大小会呈现很大差异,引物浓度越高,条带不清晰,且弥散增多。Taq 酶浓度过高易产生非特异扩增产物,但如 Taq 酶浓度过低,则会导致产物合成效率下降。笔者首次针对银缕梅

ISSR-PCR 反应体系开展了研究,该研究结果为以后利用 ISSR 开展银缕梅遗传多样性及遗传结构进一步分析奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 国务院.国家重点保护野生植物名录[Z].1999.
- [2] 胡一民,方国富.国家一级重点保护野生植物——银缕梅[J].安徽林业科技,2009(1):52.
- [3] 汪松,解焱.中国物种红色名录:第 1 卷[M].北京:高等教育出版社,2004.
- [4] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J].生物学通报,2004,39(2):19-21.
- [5] 赵谦. ISSR 标记在植物遗传分析中的应用研究[D].汕头:汕头大学,2008.
- [6] 郝日明,魏宏图,刘晚苟.银缕梅属花形态及其分类学意义[J].植物资源与环境,1996,5(1):38-42.
- [7] 方炎明,金岳杏,邓懋彬,等.银缕梅叶器官的宏观与微观结构及系统意义[J].植物资源与环境,1997,6(3):35-41.
- [8] 李建华,BOGLE A L,KLEIN A S,等.金缕梅科银缕梅属与帕罗堤属的亲缘关系——核糖体 DNA ITS 序列证据[J].植物分类学报,1997,35(6):481-493.
- [9] SHI S,CHANG H T,CHEN Y Q,et al. Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. Biochemical systematics and ecology,1998,26(1):55-69.
- [10] 吴献礼,周荣汉,段金彪.银缕梅茎皮的化学成分[J].植物资源与环境,1998,7(4):59-60.
- [11] YUE C L,JIN S H,CHANG J,et al. Response of photosynthesis in *Shaniodendron subaequale* to soil water status[J]. Annales botanici fennici,2006,43(5):389-393.
- [12] 方顺清,颜建法,翁琴,等.宜兴龙池山自然保护区银缕梅种群生态现状与保护研究[J].江苏林业科技,2004,31(2):4-5,11.
- [13] 黄绍辉,方炎明,彭治,等.江苏宜兴市龙池山银缕梅种群的生态位研究[J].中南林学院学报,2005,25(6):80-83.
- [14] 朱汤军,岳春雷,金水虎.银缕梅和伴生植物光合生理生态特性比较[J].浙江林学院学报,2008,25(2):176-180.
- [15] 颜超,王中生,安树青,等.濒危植物银缕梅(*Parrotia subaequalis*)不同等级个体的光合能力差异与更新限制[J].生态学报,2008,28(9):4153-4161.
- [16] 姚志刚,王中生,颜超,等.濒危植物银缕梅幼苗对不同光强的光合响应[J].南京林业大学学报(自然科学版),2010,34(3):83-88.
- [17] 邓懋彬,金岳杏,盛国英,等.银缕梅花芽生长和开花习性的观察[J].应用与环境生物学报,1997,3(3):226-229.
- [18] 刘兴剑,汤诗杰,姚益,等.银缕梅开花过程与花形态观察[J].江苏农业科学,2008(6):165-166.
- [19] 黄绍辉,方炎明,张启香,等.银缕梅扦插繁殖试验[J].西南林学院学报,2006,26(5):94-96.
- [20] 刘兴剑,孙起梦,窦剑.珍稀树种银缕梅引种观察[J].江苏农业科学,2008(4):173-175.
- [21] 张莹,李思锋,黎斌,等.银缕梅引种栽培及种子营养成分分析[J].西北林学院学报,2011,26(4):148-151.
- [22] 王中,1962,42(1):49-64.
- [23] PAGETT R M. Distribution of sodium,potassium and chloride in the ophiroid,*Ophiocoma nigra* (Abildgaard)[J]. Journal of the marine biological association of the UK,1980,60(01):163-170.
- [24] LANGE R. The osmotic adjustment in the echinoderm,*Strongylocentrotus droebachiensis*[J]. Comparative biochemistry and physiology,1964,13(3):205-216.
- [25] FRIDOVICH I. Superoxide radical and superoxide dismutases[J]. Annual review of biochemistry,1995,64:97-112.
- [26] ROCHE H,BOGÉ G. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication[J]. Marine environmental research,1996,41(1):27-43.
- [27] 王晓杰,张秀梅,李文涛.盐度胁迫对许氏平鲱血液免疫酶活性的影响[J].海洋水产研究,2005,26(6):17-21.
- [28] 胡利华,闫茂仓,郑金和,等.盐度对日本鳗鲡生长及非特异性免疫酶活性的影响[J].台湾海峡,2011,30(4):528-532.
- [29] 陈宇锋,艾春香,林琼武,等.盐度胁迫对锯缘青蟹血清及组织器官中 PO 和 SOD 活性的影响[J].台湾海峡,2007,26(4):569-575.

(上接第 68 页)

育的盐度为 25% ~ 30%。

### 参考文献

- [1] 曾志南,刘伟斌,林向阳,等.光裸方格星虫初期海球幼体对温度和盐度的耐受性试验[J].福建水产,2010(1):14-18.
- [2] 代悦,王庆恒,陈桂依,等.光裸星虫对盐度和温度的耐受性研究[J].水产科学,2009,28(10):563-566.
- [3] 张亦陈.温度和盐度对日本沼虾渗透调节的影响[D].保定:河北大学,2002.
- [4] VIDOLIN D,SANTOS-GOUVEA I A,FREIRE C A. Osmotic stability of the coelomic fluids of a sea-cucumber(*Holothuria grisea*) and starfish(*Asterina stellifera*) (Echinodermata) exposed to the air during low tide[J]. Acta biologica paranaense,2002,31:113-121.
- [5] BINYON J. Salinity tolerance and ionic regulation[M]//BOOLOOTION R A. Physiology of echinodermata. New York: Wiley-Interscience,1966:359-377.
- [6] BINYON J. Ionic regulation and mode of adjustment to reduced salinity of the starfish *Asterias rubens* L. [J]. Journal of the marine biological association of the UK,1962,42(1):49-64.