

树莓 SSR 反应体系的优化及应用

张玉平^{1,2} 潘青华² 金万梅² 李少宁² 许奕华³ 姜明² 韩振海^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093;

3. 北京市农林科学院 科研处, 北京 100097)

摘要 本研究主要对树莓 SSR-PCR 体系进行优化,以‘来味里(Reveille)’红树莓为试材,利用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计和两因素完全随机试验,研究各主要参数的适宜浓度,建立适合树莓 SSR 反应的最佳体系,并通过 16 个不同的树莓栽培品种对优化后的体系进行验证。结果表明:各影响因素中,引物浓度的变化对扩增结果的影响最大,优化后的最佳反应体系(25 μ L)中,*Taq* DNA 聚合酶和 DNA 最适用量分别为 1.0 U 和 30 ng; Mg^{2+} 、dNTP 和引物最适浓度分别为 1.5、0.2 mmol/L 和 0.4 μ mol/L。利用优化后的反应体系和 10 对 SSR 引物对 16 个树莓品种进行 PCR 扩增,不同品种间扩增结果稳定,多态性位点丰富,共有 54 个等位位点,表明该体系稳定可靠,适合树莓的 SSR 分析。

关键词 树莓; SSR; 体系优化; 应用

中图分类号 S 663.2

文章编号 1007-4333(2011)06-0058-06

文献标志码 A

Optimization and application of SSR reaction system in bramble

ZHANG Yu-ping^{1,2}, PAN Qing-hua², JIN Wan-mei², LI Shao-ning²,
XU Yi-hua³, JIANG Ming², HAN Zhen-hai^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Beijing Academy of Forestry and Pomology, Institute of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093, China;

3. Scientific Research Department, Beijing Institute of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract This paper is concerned on optimizing the SSR-PCR reaction system on bramble. The cultivar ‘Reveille’ of bramble was used. And the $L_9(3^4)$ orthogonal design and completely randomized design of two factors were used to determine the appropriate concentrations of the main factors. The best system of SSR-PCR on bramble was built and checked in 16 different bramble cultivars. The results showed that the primer concentration among the factors had highest impacts on SSR-PCR. The optimum amplification conditions of SSR-PCR were as following: *Taq* Polymerase 1.0 U, DNA template 30 ng, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L and Primer 0.4 μ mol/L in 25 μ L reaction volumes. With the optimum system, the amplification of 10 SSR primer pairs in 16 bramble cultivars revealed high stability. Polymorphism with 54 alleles were obtained simultaneously. It was evident that the reaction system established in this study was stable and reliable for SSR analysis of bramble, and could be used in germplasm identification, genetic polymorphism analysis and marker assisted selection.

Key words bramble; simple sequence repeats; system optimization; application

树莓为蔷薇科悬钩子属(*Rubus* L.)落叶稀常绿灌木、半灌木或多年生匍匐草本植物^[1],全世界有 750 余种^[2],我国有 201 种,98 变种^[3],主要以野生

资源为主,广泛分布于全国各地。树莓果实艳丽多汁,富含多种营养及保健成分,具有“生命之果”的美誉,在欧美等西方国家具有悠久的栽培历史。近

收稿日期: 2011-03-21

基金项目: 北京市农林科学院青年基金项目(QNJJ201002)

第一作者: 张玉平, 硕士研究生, 副研究员, 主要从事树莓遗传育种研究, E-mail: zhyp7204@yahoo.com.cn

通讯作者: 韩振海, 教授, 主要从事果树种质资源创新研究, E-mail: hanzhh@cau.edu.cn

年来随着加工产业的发展,我国树莓的栽培面积不断增加。然而目前生产中绝大部分栽培品种都引自国外,许多品种表现不佳,我国树莓育种工作基础十分薄弱,自育品种严重缺乏,不能满足生产的需要。加速树莓育种进程需要深入了解资源遗传多样性及亲缘关系,目前国内树莓资源较多,但树莓分类十分复杂,加上同物异名现象严重,应用现有的研究手段往往无法快速准确进行深入研究,而 SSR 分子标记为此提供了便利可行的研究方法。

SSR (Simple sequence repeat) 即简单序列重复,通常又称为微卫星,是一类由几个碱基组成的基序串联重复而成的 DNA 序列。具有操作简便、多态性强、遗传信息量大、共显性遗传等特点^[4]。目前已广泛应用于人类遗传和许多动物研究中,在果树中主要应用在苹果、梨、桃、葡萄、核桃、板栗和果梅等树种的种质资源遗传多样性领域,但有关树莓的 SSR 标记在国内研究还很少^[5-11]。本研究拟建立树莓的 SSR 分子标记技术,为树莓种质资源鉴定、遗传多样性及亲缘关系分析等方面的研究和品种选育提供技术支持,从而促进我国树莓产业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用品种取自北京市农林科学院林业果树

研究所和中国林业科学院顺义树莓基地永新源农场,取春季基生枝上刚展开的嫩叶,用液氮处理后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存待用。所用试剂 25 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L dNTP, 5 U/ μL *Taq* 聚合酶,均购自上海生工生物工程有限公司。

引物序列参照 J. Graham 等^[12]设计的 Rubus153a: P1 5' CCCAGCTTCAGTTGGAAAGA3' 和 P2 5' AGAGGCTCATTTCCTTGAA3', 由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测

采用改良 CTAB 法提取基因组 DNA^[13],用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和质量。样品稀释到 10 ng/ μL 后,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2.2 SSR-PCR 扩增体系优化

以红树莓品种‘来味里(Reveille)’为试材,优化 SSR-PCR 扩增体系首先选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行 4 因素(*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、引物和 Mg^{2+}) 3 水平的正交试验,共 9 个组合(表 1)。参照张春华等^[14]方法选择特异条带清晰的最佳组合作为反应的基本体系,再根据组合情况分析确定影响扩增反应的关键因素,最后设计 2 组 2 因素 4 水平完全随机试验(表 2 和表 3),逐个优化其他反应成分终浓度水平,从而确定适合树莓 SSR 反应的体系。

表 1 树莓 SSR 反应体系正交试验设计表 [$L_9(3^4)$]

Table 1 Factor-level table of SSR system of bramble in orthogonal design ([$L_9(3^4)$])

组合号	PCR 反应体系			
	<i>Taq</i> 聚合酶用量/U	dNTPs 浓度/(mmol/L)	引物浓度/($\mu\text{mol/L}$)	Mg^{2+} 浓度/(mmol/L)
1	0.5	0.16	0.2	1.0
2	0.5	0.20	0.4	1.5
3	0.5	0.24	0.6	2.0
4	1.0	0.16	0.4	2.0
5	1.0	0.20	0.6	1.0
6	1.0	0.24	0.2	1.5
7	1.5	0.16	0.6	1.5
8	1.5	0.20	0.2	2.0
9	1.5	0.24	0.4	1.0

表2 dNTP浓度和 *Taq* DNA聚合酶2因素4水平完全随机设计Table 2 A four level completely randomized orthogonal design for two factors of dNTP and *Taq* polymorphism polymerase

组合号	dNTP浓度/(mmol/L)	<i>Taq</i> 聚合酶用量/U	组合号	dNTP浓度/(mmol/L)	<i>Taq</i> 聚合酶用量/U
1	0.16	0.5	9	0.24	0.5
2	0.16	1.0	10	0.24	1.0
3	0.16	1.5	11	0.24	1.5
4	0.16	2.0	12	0.24	2.0
5	0.20	0.5	13	0.28	0.5
6	0.20	1.0	14	0.28	1.0
7	0.20	1.5	15	0.28	1.5
8	0.20	2.0	16	0.28	2.0

表3 引物浓度和DNA2因素4水平完全随机设计

Table 3 Completely randomized design of two factors and four levels on primer and DNA

组合号	引物浓度/(μ mol/L)	DNA用量/ng	组合号	引物浓度/(μ mol/L)	DNA用量/ng
1	0.2	10	9	0.6	10
2	0.2	30	10	0.6	30
3	0.2	50	11	0.6	50
4	0.2	70	12	0.6	70
5	0.4	10	13	0.8	10
6	0.4	30	14	0.8	30
7	0.4	50	15	0.8	50
8	0.4	70	16	0.8	70

1.2.3 SSR-PCR扩增程序及SSR反应体系的验证

PCR反应采用美国MJ公司生产的Mini PCR基因扩增仪。反应程序:94℃预变性4 min,94℃变性45 s,52℃退火45 s,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃继续延伸5 min。

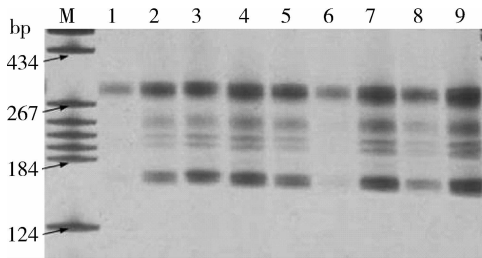
利用16个树莓品种对构建的SSR-PCR反应体系进行验证,6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物。电压1 kV,时间1.5 h;电泳结束后银染显色。染色方法为:10%乙酸固定5 min,双蒸水漂洗0.5~1 min,0.1%硝酸氧化5 min,双蒸水漂洗0.5~1 min,0.1%硝酸银染色40~60 min,双蒸水漂洗10~15 s,在3%碳酸钠(加入1.5 mL/L甲醛和1.5 mg/L硫代硫酸钠)溶液中显色5~10 min,显色后用10%乙酸固定,用水洗净残余乙酸后阴干保存。

2 结果与分析

2.1 SSR反应体系的初步建立

图1可示,在9个处理中,第1、6和8个组合扩增结果最差,其中组合1未扩出目的条带,第6和8组合的扩增条带也微弱。第1、6和8个组合的引物浓度均为0.2 μ mol/L,而在其他组合中当引物浓度分别为0.4和0.6 μ mol/L时均能扩增出稳定条带,由此推断本试验中引物浓度是影响扩增效率的关键因素。相同的引物浓度下,随着*Taq* DNA聚合酶用量的增加,扩增特异条带浓度增强,但有些弥散,如引物为0.4 μ mol/L时的组合2、4和9以及引物为0.6 μ mol/L时的组合3、5和7。由此可见引物用量对扩增结果有明显影响,用量太低,不能扩增特异带,用量过高会增加引物与模板之间非特异性结

合,导致条带弥散,背景增加。因此选用第 2 组合为最优组合,即 25 μ LPCR 体系为: Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 和引物浓度分别是 1.5 mmol/L、0.5 U、0.20 mmol/L 和 0.4 μ mol/L 作为初步反应体系。



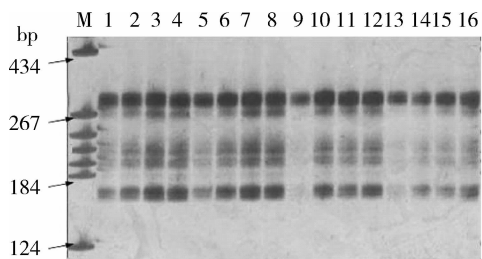
1~9 为各处理

图 1 正交试验设计反应体系扩增结果

Fig. 1 Amplified results of SSR according to the orthogonal design scheme

2.2 完全随机试验进一步筛选最适 dNTP 浓度和 *Taq* DNA 聚合酶用量

利用 2 因素 4 水平完全随机试验设计优化 dNTP 浓度和 *Taq* DNA 聚合酶用量(表 2)。扩增结果如图 2 所示,当 dNTP 浓度为 0.16~0.24 mmol/L,*Taq* 酶用量在 1.0~2.0 U 时,均有扩增。但当 dNTP 浓度增加到 0.28 mmol/L 时扩增产物降低,如组合 13~16。当 dNTP 浓度在同一水平下,随着 *Taq* DNA 酶用量由 0.5 U 增加至 1.5 U 时条带较浓,严重弥散。dNTP 作为 PCR 反应的重要底物,其含量不足将直接影响 PCR 的扩增产量,过量的 dNTP 会与聚合酶竞争结合 Mg^{2+} ,抑制 PCR 反应,从图 2 可看出,选择组合 6,即 dNTP 浓度为 0.20 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶用量为 1.0 U



1~16 为表 2 中的组合号

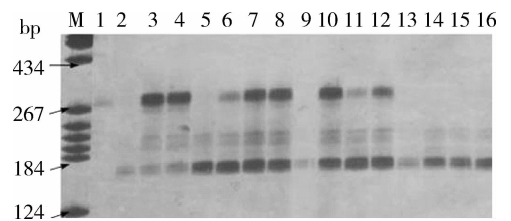
图 2 不同 dNTP 浓度和 *Taq* DNA 聚合酶对 SSR 扩增结果的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of dNTP and *Taq* DNA polymerase on SSR reaction

时,扩增效果较好,条带较为清晰。

2.3 完全随机试验筛选最适引物浓度和 DNA 用量

进一步利用 2 因素 4 水平完全随机试验设计优化引物终浓度和 DNA 用量(表 3),扩增结果如图 3 所示。引物终浓度在 0.2 μ mol/L 时无扩增或扩增较弱,当增至 0.4 μ mol/L 时,扩增产物最多,但当浓度为 0.8 μ mol/L 时,扩增降低。模板 DNA 的用量在 10 ng 时扩增较弱,在 30~70 ng 均有扩增,但随着 DNA 用量的增加,扩增产物增多,同时也增加了非特异性扩增产物。引物浓度太低,没有扩增产物或较少,引物浓度太高,有可能产生二聚体。从本实验结果看,选择组合 6,即引物终浓度和 DNA 最适用量分别为 0.4 μ mol/L 和 30 ng 为最佳优化条件。



1~16 为表 3 中的组合号

图 3 不同引物浓度和 DNA 用量对 SSR-PCR 扩增结果的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of primer and DNA on SSR-PCR reaction

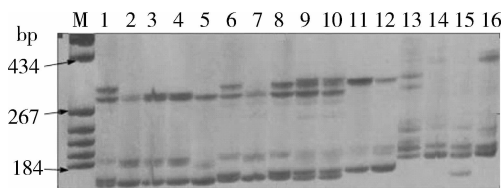
2.4 SSR 反应体系的应用

利用优化后的 25 μ L SSR 反应体系:*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U;DNA 用量 30 ng; Mg^{2+} 1.5 mmol/L;dNTP 0.20 mmol/L;引物 0.4 μ mol/L;引物序列参照 Graham 等^[15]设计的 10 对引物对 16 个栽培品种进行扩增,检测结果,每对引物可检测到 4~7 个数目不等的等位基因,多态位点共 54 个,平均为 5.4 个。扩增片段长度为 130~300 bp(表 4)。10 对引物均为多位点引物,可用于树莓属植物的遗传多样性研究。16 个品种扩增结果如图 4 所示,条带清晰,多态性高根据扩增的特异带型可将 16 个品种分为两大类,即树莓类群(空心类群)和黑莓类群(实心类群),其中树莓类群又可区分开黑树莓,如 11 和 12;黑莓类群又可区分匍匐类无刺品种 15(Waldo)。扩增结果表明建立的反应体系具有较好的稳定性和可重复性,可应用于树莓属植物遗传规律、系统发育等方面的研究。

表4 引物基本情况及在树莓上扩增片段长度和位点数

Table 4 Length of amplified fragments and number of alleles for 10 SSR primers

引物	退火温度/°C	重复单元	片段长度/bp	位点数
108	52	(ct) ₉ (ct) ₅	149~174	4
157	54	(ct) ₄₇	119~297	7
262	51	(ag) ₁₅	190~297	6
Rubus12 a	52	(ct) ₇ (at) ₆ (gt) ₁₀	130~150	7
Rubus107 a	52	(ag) ₈	155~160	4
Rubus110 a	53	(tc) ₈	157~180	6
Rubus145 a	52	(gt) ₇	131~142	5
Rubus233 a	50	(ct) ₁₁	190~200	4
Rubus237 b	51	(ttt ₃ tc) ₃	134~147	5
Rubus251 a	52	(ga) ₁₀	157~183	6



1 为 Reveille; 2 为 Talor; 3 为 Tulameen; 4 为 Boyne; 5 为 Nova;
6 为 Polana; 7 为 Honey Queen; 8 为 Kiwigold; 9 为 Royalty;
10 为 986; 11 为 Bristol Polana; 12 为 Mac Black; 13 为 Arapaho;
14 为 Shawnee; 15 为 Waldo; 16 为 Kiowa。

图4 引物 Rubus153a 在 16 个树莓品种中的扩增结果

Fig. 4 Amplified results of primer Rubus153a
in 16 bramble cultivars

3 讨论

国外有关树莓 SSR 分子标记研究已近 10 年, Graham 等^[12,15]首次提出了适用于研究野生树莓基因流与抗根腐病基因的 SSR 分子标记,并用 SSR 等标记构建了树莓的遗传连锁图。随后 Eric 等^[16]开发了微卫星标记用于研究构建红树莓和黑树莓遗传连锁图。Woodhead 等^[17]从红树莓根和芽中开发了 25 个 EST-SSR 标记用于遗传连锁图谱的研究。国内有关树莓 SSR 分子标记方面的研究还很少见。目前国内有很多树莓野生种,有着大量的基因资源尚待开发和利用。如能在分子水平上对野生种和栽培品种进行遗传背景研究,指导育种的亲本选配,提高杂交结实率,将会推动我国树莓育种工作的进程。

由于 SSR 反应涉及诸多因素,每个因素对整个反应体系都有较大影响,而且不同植物具有不同的最适宜体系,因此建立稳定和可重复性的反应体系

是 SSR 多态性标记的基础。通常对 SSR 反应体系的优化多是采用正交试验设计或单因素随机试验,本研究在查阅相关文献的基础上,采用正交试验设计和两因素完全随机试验优化树莓 SSR 反应体系。PCR 扩增正交优化设计在实践上可行,但对试验结果本身的优劣判断依据却带有主观上的成分。孙伟^[18]利用正交设计研究 SSR-PCR 扩增条件时提出,由于试验的影响因素多,在一次正交试验中不可能研究全部因素,可先找出主次先后矛盾,分批进行。本试验中,首先利用正交设计确定了影响体系的关键因素及适宜用量,并初步建立了 SSR 反应体系,再结合两因素完全随机试验依次筛选出其他影响因素的最佳浓度。

本试验所优化的体系与 Graham 等^[15]从 *R. idaeus* ‘Glen Moy’ 中开发的引物用于树莓基因组 SSR 分析时所用的体系(25 μ L 反应体系中,引物 2 μ mol/L, dNTP 0.20 mmol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U)相比,引物浓度大大降低,减少了试验成本。应用该体系采用 10 对引物对 16 个树莓品种进行扩增,获得片断大小为 130~300 bp,证实该体系稳定可靠,可用于进一步的树莓种质资源鉴定和遗传多样性及亲缘关系分析的研究。

致谢 中国林业科学院张清华研究员为本试验提供的部分材料,在此表示感谢。

参 考 文 献

[1] 俞德浚,陆玲娣,谷粹芝,等. 中国植物志(第 37 卷)[M]. 北京:

- 科学出版社,1985,10-18
- [2] 陆玲娣. 我国悬钩子属植物的研究[J]. 植物分类学报,1983,21(1):305-310
- [3] Li W L, Wu W L, Zhang Z D. The utilization value and potential of Chinese bramble (*Rubus L.*) [J]. Acta Horticulturae,2002,585:133-138
- [4] 高志红,章镇,韩振海. SSR 技术及其在果树上的应用[J]. 果树学报,2002,19(5):281-285
- [5] 王爱德,李天忠,许雪峰,等. 苹果品种的 SSR 分析[J]. 园艺学报,2005,32(5):875-877
- [6] 曹玉芬,刘凤之,高原,等. 梨栽培品种 SSR 鉴定及遗传多样性[J]. 园艺学报,2007,34(2):305-310
- [7] 李银霞,李天红. 桃 SSR 反应体系的优化[J]. 中国农业大学学报,2005,10(6):57-61
- [8] 刘闯萍,王军. SSR 标记及其在葡萄上的应用[J]. 果树学报,2008,25(1):93-101
- [9] 刘晓丽,何天明,张美勇,等. 核桃 SSR 反应体系的优化[J]. 果树学报,2007,24(2):140-145
- [10] 王同坤,董超华,马艳,等. 板栗 SSR 和 RAPD 技术体系的建立[J]. 果树学报,2006,23(6):825-829
- [11] 高志红,章镇,韩振海,等. 果梅 SSR 反应体系的优化[J]. 南京农业大学学报,2002,25(4):19-22
- [12] Graham J, Smith K, Woodhead M, et al. Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species[J]. Molecular Ecology Notes,2002(2):250-252
- [13] 张玉平,金万梅,许奕华,等. 适于 SSR 分析的树莓基因组 DNA 的快速提取[J]. 北方园艺,2009(10):68-70
- [14] 张春华,周永志,阎隐,等. 数理统计方法[M]. 济南:山东大学出版社,1992:151
- [15] Graham J, Smith K, MacKenzie K, et al. Construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers [J]. Theor Appl Genet,2004(109):740-749
- [16] Eric T, Stafne J, Clark R, et al. Simple sequence repeat (SSR) markers for genetic mapping of raspberry and blackberry[J]. J Amer Soc Hort Sci,2005(130):722-728
- [17] Woodhead M, McCallum S, Smith K, et al. Identification, characterization and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs[J]. Mlo Breeding, 2008(22):555-563
- [18] 孙伟. 正交设计微卫星 PCR 扩增条件的探讨[J]. 草食家畜, 2001(2):4-5

(责任编辑:王燕华)