

文章编号:1003-8701(2014)06-0021-04

花生 SSR 分子标记技术体系的建立和优化

田 群^{1,3}, 李晓辉², 王佰众¹, 刘红欣¹, 何中国^{1*}, 李玉发^{1*}

(1. 吉林省农业科学院花生研究所, 吉林 公主岭 136100;

2. 吉林省农业科学院作物资源研究所, 吉林 公主岭 136100; 3. 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150025)

摘 要: 本试验以 8 份花生种质资源为试材, 摸索适宜的 DNA 提取方法, 并通过大量文献的调研初步筛选出 4 套反应体系, 并使用不同引物对其进行筛选, 最终确立了适合花生 SSR-PCR 反应体系为 10 μ L, 其中各组分终浓度如下: 25 ng DNA, 1 \times buffer, 0.15 μ mol/L 引物, 200 μ mol/L dNTP, 0.5U Taq 酶。最终确立的扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

关键词: 花生; SSR; 技术体系; 分子标记; 优化

中图分类号: S565.2

文献标识码: A

Establishment and Optimization of SSR Molecular Marker Technology System in Peanut

TIAN Qun^{1,3}, LI Xiao-hui², WANG Bai-zhong¹, LIU Hong-xin¹, HE Zhong-guo^{1*}, LI Yu-fa^{1*}

(1. Peanut Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100;

2. Crop Germplasm Resources Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100;

3. Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: Using eight species of peanut germplasm resources as the experimental materials in this experiment, the appropriate DNA extraction method was explored. 4 sets of reaction system were selected through reading a large amount of papers and preliminary screening. Different primers were screened in the reaction system. SSR-PCR system suitable to peanut was finally established, in which for 10 μ L, 25ng DNA, 1buffer, 0.15 μ mol/L primer, 200 μ mol/L dNTP, and 0.5U Taq. A PCR system was finally established, in which pre-denaturing 5 min at 94 $^{\circ}$ C, denaturing for 1 min at 94 $^{\circ}$ C, annealing for 30 s at 55 $^{\circ}$ C, extending for 1 min at 72 $^{\circ}$ C, 35 cycles, extending for 5 min at 72 $^{\circ}$ C.

Key words: Peanut; SSR; Reaction system; Molecular markers; Optimization

花生作为一种重要的经济作物和油料作物, 既用来榨油, 也可直接食用。在我国, 花生在油料作物中播种面积居于第二位, 年产量居于第一位^[1], 吉林省是全国 10 个 10 万 hm^2 以上花生主产省(区)之一^[2], 其生产的花生常供给周边的省市。吉林省的花生种植面积呈逐年增加的趋势, 目前年均种植面积可达 12 万 hm^2 以上^[3], 已经成为继玉米和水稻之后的第三大作物。因其具有

抗旱、耐瘠薄的特性, 在吉林省干旱风沙土区是一种无可替代的高产、高效作物^[4]。近年来, 随着人们物质生活水平的不断提高, 花生的供给已不能满足需求。因此, 在巩固花生常规育种基础的同时, 分子育种技术的研究日益受到广大研究者的重视。

SSR(Simple Sequence Repeat, SSR)是指简单重复序列标记, 又称微卫星标记, 是以少数几个核苷酸(通常为 2~5 个)为单位串联的 DNA 序列。它广泛分布于真核生物的整个染色体组中, 具有保守的核苷酸序列^[1]。由于 SSR 重复单位的数目存在高度变异, 因而具有多态性好的优势, 并且操作简单, 重复性好, 有利于揭示不同品种之间的遗传多态性。所以 SSR 标记技术目前已广泛应用于遗传作图, 遗传多样性分析, 系谱与进

收稿日期: 2014-06-28

基金项目: 吉林省重大科技攻关专项(20130204040NY); 吉林省农业创新工程项目(2013~2017)

作者简介: 田 群(1990-), 女, 土家族, 在读本科, 从事分子标记研究。

通讯作者: 何中国, 男, 研究员, E-mail: zg_h@163.com

李玉发, 男, 副研究员, E-mail: liyufa2000@163.com

化关系探讨等各领域^[5-11]。

目前,SSR分子标记在花生中的应用得到广泛的发展,已应用于SSR指纹图谱的构建、微核心种质资源SSR标记遗传多样性分析、花生表型分析及品种的鉴定、快速鉴别F₁杂交真伪、花生数量性状位点定位、花生亲缘关系远近的比较、物种进化、遗传育种和分子标记辅助选择育种等方面,成为应用最广的一种分子标记技术^[12],但是相对于其他作物的多态率较低。因此,建立一套适合花生的SSR分子标记体系,具有重要的意义。

吉林省花生常规育种刚开始,分子育种工作也在同时展开,使用分子标记技术辅助常规育种能提高常规育种的效率和水平,所以确立一套适合吉林省花生的SSR分子标记体系是分子育种工作展开的基础。目前,国内已在花生分子标记技术研究上取得了一定的成果,本试验在此基础上摸索一套适用于本土花生的SSR分子标记技术体系,为吉林省花生分子育种的进一步展开提供条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验收集花生材料共计310份,由吉林省农业科学院花生研究所和吉林省农业科学院作物资源研究所提供。选择其中8份花生种质资源(吉花07-2、吉花07-3、吉花07-7、吉花07-8、锦2006、漂油5、粤油45和远杂9847)用于体系筛选,4份花生种质资源(吉花07-8、锦2006、漂油5和粤油45)引物筛选。

本试验使用引物100对,主要来源于中国农业科学院油料作物研究所、广东省农科院作物研究所、山东省花生研究所等对花生核心种质指纹图谱的构建,SSR遗传多样性、多态性分析及利用重组近交系对花生抗性的标记等试验中所用的引物,由北京鼎国公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 花生DNA的提取

花生叶片含有较多的次生代谢产物,如多糖和多酚类,其DNA的提取方法参照相关文献总结主要有3种方法,分别是SDS法、DNA快速提取法和CTAB法。大量的对比试验表明:SDS法提取的DNA含有较多的酚类物质和多糖并且纯度较低;DNA快速提取法虽然操作快捷、简便,但由于沸水加热过程中不好控制,所提取的产物中会有比较多的叶绿素和蛋白质等杂质。另外,市场上销售的大多数种子有农药包衣,快速提取法并不适

用;CTAB法提取DNA质量比较好,OD₂₆₀/OD₂₈₀值介于1.8~2.0之间,符合SSR扩增的要求。使用试剂盒提取得到的DNA纯度较高但浓度较低。

本试验采用改良的CTAB法,具体步骤如下:

(1)称取适量样品,液氮下快速研磨成粉末。

(2)将粉末置入2.0 mL Eppendorf管中,加入750 μL预先加热至65℃的CTAB缓冲液,将其混匀。

(3)65℃水浴加热45 min,轻轻地、不断地倒转摇动。水浴后,取出Eppendorf管,冷却至室温。

(4)通风橱下加入750 μL的氯仿:异戊醇(24:1),轻轻地倒转摇动20 min。

(5)12 000 rpm(室温)离心10 min,用去头枪尖将上清液转至新的2.0 mL Eppendorf管中。

(6)加入10 μL RNA酶溶液(10 mg/mL),37℃下温浴30 min。

(7)重复4~5步骤。

(8)加入100 μL的醋酸钠,再加入-20℃预冷的异丙醇(1倍体积)或无水乙醇(2倍体积)于2.0 mL Eppendorf管中,轻轻混匀。-20℃冰箱静置一段时间后(约10 min),直至DNA凝集,室温下使用移液器枪头挑出絮状的DNA。

(9)76%乙醇洗涤2次(其中1次可过夜)。洗涤完毕后,将DNA晾干。

(10)加入适量的1×TE (pH 8.0)溶解于试管中,4℃下保存备用。

(11)将DNA原液于0.8%琼脂糖凝胶电泳检测质量(DI2000为Marker)。-20℃下保存备用。

1.2.2 PCR体系扩增

扩增反应在Bio-Rad公司MyCycler™PCR仪上进行。

1.2.3 SSR标记片段电泳检测

SSR扩增产物在6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上进行分离,银染显色。

2 结果与分析

2.1 DNA提取

本试验的DNA提取采取了改良的CTAB法,其平均浓度为600 ng/μL,OD₂₆₀/OD₂₈₀值介于1.8~2.0之间。SDS法提取的DNA含有较多的酚类物质和多糖并且纯度较低;试剂盒提取的DNA浓度较低,均为100 ng/μL,且成本较高;DNA快速提取法沸水加热过程中不好控制,所提取的产物中会有比较多的叶绿素和蛋白质等杂质。因此,改良的CTAB法最适合本试验要求。

本试验分别采用了改良的CTAB法和试剂盒提取花生DNA。电泳结果显示改良CTAB法提取DNA和试剂盒提取DNA的质量均适合花生SSR扩增要求(见图1),但DNA试剂盒提取的DNA总量少,后续试验中如花生SSR指纹图谱库构建或遗传分析等都需要大量的DNA,成本较高,因此,本实验室最终使用改良CTAB法提取DNA。

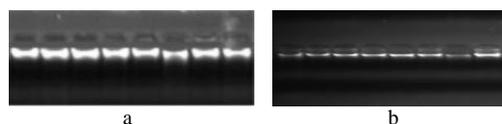


图1 利用不同方法提取DNA的结果比较
a:改良CTAB法;b:试剂盒提取

2.2 SSR体系初筛结果

PCR的基本反应体系包括模板DNA、寡核苷酸引物、4种脱氧核苷三磷酸(dNTP)、Taq DNA聚合酶(DNA polymerase)等,国内外文献做了大量的报道。在SSR-PCR扩增体系中模板DNA浓度在20~80 ng间都能有效扩增,由于花生DNA样品溶液存在着不均质性,在实际的SSR-PCR扩增体系中,模板DNA浓度宜低不宜高,基于以上原因本实验室共收集PCR反应体系及程序24套。

根据各实验室的体系使用情况大致分为3个团队,包括中国农业科学院油料作物研究所(姜慧芳团队)、广东省农科院作物研究所(洪彦彬团队)、山东省花生研究所(苗华荣团队)。体系为10 μ L或20 μ L,其中Buffer均为1 \times ,Taq酶均为1U,dNTP均为150~400 μ mol/L。引物和DNA的使用量有不同梯度,其中以姜慧芳为代表的团队使用引物浓度为10~40 pmol/L,其主要用于SSR

指纹图谱的构建、微核心种质SSR遗传多样性分析等,其他实验室引物使用的浓度为0.15~0.6 μ mol/L;以洪彦彬和苗华荣为代表的两个团队使用DNA浓度为50~100 ng/ μ L,用于花生表型分析及品种的鉴定等方面,其他实验室体系中DNA使用的浓度为10~20 ng/ μ L。基于上述情况本实验室最终筛选整理并确立了4套不同梯度的SSR-PCR反应体系(见表1)。再以8份花生样品为材料,用4对引物分别对4套体系进行扩增,从初筛确定的4套体系中筛选出两套可用的扩增体系。由于体系2和体系3的扩增条带较浅且较窄,不适于实验,故舍弃。复筛最终确定为体系1和体系4(结果见图2)。

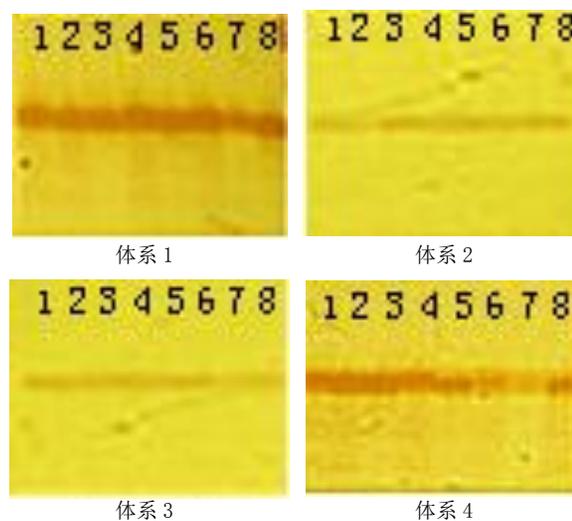


图2 体系复筛结果

注:图中序号表示本试验所筛选用的8种花生种质资源;图中4个体系使用引物为PM53

表1 SSR体系初筛结果

序号	体系	DNA(ng)	Buffer	primer	dNTP(mol L ⁻¹)	Taq酶(U)	参考
1	10	25~50	1	0.15 mol/L	200	0.5	周桂元等,2007
2	10	10~20	1	10~40 pmol/L	300~400	0.8~1.2	唐梅等,2012
3	10	10	1	10 pmol/L	150	1	姜慧芳等,2007
4	10	25~50	1	0.3 mol/L	200	0.5	周桂元等,2007

2.3 SSR体系复筛结果

以8份花生样品,对复筛出来的两套体系进行最终的筛选,体系1引物用量较少,带型清晰,所以最终把体系1作为花生SSR的最终扩增体系(结果见图3)。

2.4 引物筛选结果

基于最终确立的反应体系和反应程序,对100对引物进行扩增和电泳检测,筛选出16对扩增质量好、在染色体上分布均匀、多态性水平高、扩增片段大小适中、易于进行多重PCR的引物(结果见图4)。

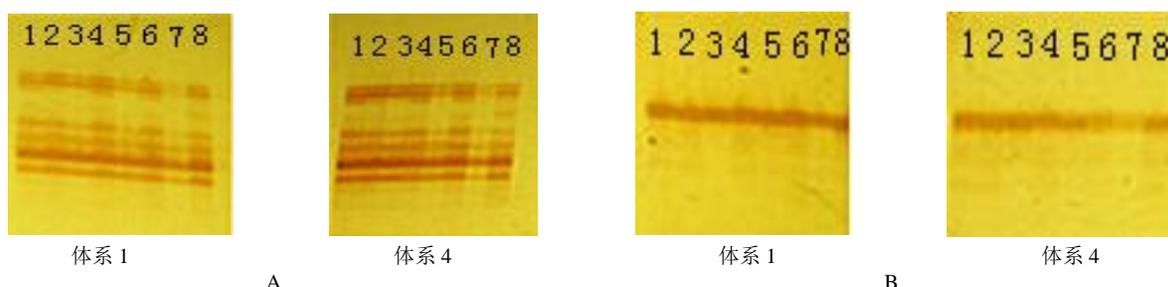


图3 体系终筛结果

A :使用引物 PM41 ;B :使用引物 PM53

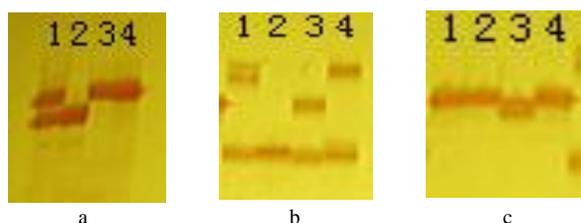


图4 引物筛选结果

a :引物 2D12B ;b :引物 7G2 ;c :引物 PM42

注 :图中序号表示本试验所筛选用的4种花生种质资源

3 结 论

综上所述,本实验室最终确定采用改良CTAB法为合适的花生DNA提取方法,确立了适合本实验室的花生SSR反应体系为10 μL,其中10 ng/μL DNA 2.5 μL,10×buffer 1 μL,10 μmol/L引物0.15 μL,10 mmol/L dNTP 0.2 μL,0.2 U Taq酶 2.5 μL;确立的扩增程序为94℃预变性5 min,94℃变性1 min,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环,72℃延伸5 min。

参考文献:

- [1] 张发,万勇善,刘凤珍.花生SSR-PCR体系的优化[J].中国农学通报,2008,24(4):37-41.
- [2] 董玉兰.吉林省花生产业特点及发展趋势[J].吉林农业,

2013(6):9-10.

- [3] 窦忠玉,梁军,徐晨,等.吉林省花生高产高效栽培技术[J].现代农业科技,2012(11):39-41.
- [4] 高华援,徐宝慧,由宝茹,等.吉林省花生生产现状及发展对策[J].花生学报,2009,38(2):30-34.
- [5] 万平,刘大钧.SSRs标记与植物遗传育种研究[J].安徽农业大学学报,1998,25(1):92-95.
- [6] M C Moretzsohn, L Leoi, K Proite, et al. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005(111): 1060-1071.
- [7] He G, Meng R, Newman M, et al. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2003(3): 3.
- [8] Subramanian V, Gurtu S, Nageswara Rao RC, et al. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay[J]. Genome, 2000, 43(4): 656-660.
- [9] 姜慧芳,任小平,雷永,等.花生青枯病抗性分子标记的初步研究[J].花生学报,2003,32(增刊):319-323.
- [10] 唐荣华,贺梁琼,高国庆,等.多粒型花生的SSR分子标记[J].花生学报,2004,33(2):11-16.
- [11] 唐荣华,庄伟建,高国庆,等.珍珠豆型花生的简单序列重复(SSR)多态性[J].中国油料作物学报,2004,26(2):20-26.
- [12] 江建华,倪皖莉,肖美华,等.花生SSR标记的开发及其应用现状和前景[J].花生学报,2012,41(2):39-45.

(上接第8页)田间持水量的50%以上时,可以考虑不灌,这样可以起到蹲苗促根生长的作用,与其结论相同。

徐世昌^[2]、赵天宏^[3]、康绍忠^[4]等研究表明拔节期水分胁迫绿叶面积减少,光合持续时间缩短,光合速率和呼吸速率下降,导致光合物质生产能力降低,而作物有90%以上的干物质来源于光合生产。本研究结果表明,玉米拔节期植株新陈代谢活动旺盛,拔节期缺水处理既影响营养体生长,又影响内部幼穗的分化,造成营养体生长不良,光合性能受损,物质生产能力下降,最终影响玉米产量,这与前

人研究结果一致,玉米拔节期土壤含水量低于田间持水量的70%应及时补水灌溉。

参考文献:

- [1] 郭相平,康绍忠,索丽生.苗期调亏处理对玉米根系生长影响的试验研究[J].灌溉排水,2001,10(1):25-27.
- [2] 徐世昌,戴俊英,沈秀瑛,等.水分胁迫对玉米光合性能及产量的影响[J].作物学报,1995,21(3):356-363.
- [3] 赵天宏,沈秀瑛,杨德光,等.水分胁迫及复水对玉米叶片叶绿素含量和光合作用的影响[J].杂粮作物,2003,23(1):33-35.
- [4] 康绍忠,史文娟,胡笑涛,等.调亏灌溉对玉米生理指标及水分生产效率的影响[J].农业工程学报,1998,14(2):82-87.