

濒危药用植物厚朴 ISSR 引物筛选及反应条件的优化*

于华会¹ 杨志玲^{1*} 杨旭¹ 谭梓峰¹ 舒泉²

(¹ 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400; ² 云南农业大学, 昆明 650201)

摘要 以厚朴 DNA 为模板, 利用正交试验分别对影响厚朴 ISSR-PCR 反应的 *Taq* 酶浓度、dNTP 浓度、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 浓度进行了优化, 并通过梯度 PCR 确定不同引物的最佳退火温度和循环次数, 最终确定厚朴最佳反应体系及扩增条件为: 25 μ l 体系, 其中包括 1.5 mmol \cdot L⁻¹ $MgCl_2$, 0.3 μ mol \cdot L⁻¹ 引物, 0.04 U \cdot μ l⁻¹ *Taq* 酶, 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 4 ng \cdot μ l⁻¹ 模板 DNA, 1 \times Buffer, 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C (退火温度随引物不同而定) 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 40 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。此外, 还利用优化的反应体系成功筛选出 21 条 ISSR 引物, 并利用部分引物对厚朴个体进行了遗传多样性分析。

关键词 厚朴; 正交设计; 引物筛选; ISSR

中图分类号 S718.46 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2009)12-2444-08

Primer screening and optimization of ISSR reaction condition for endangered medicinal plant *Magnolia officinalis*. YU Hua-hui¹, YANG Zhi-ling¹, YANG Xu¹, TAN Zi-feng¹, SHU Xiao² (¹ Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China; ² Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China). *Chinese Journal of Ecology* 2009 28(12) 2444-2451.

Abstract: To optimize the inter simple sequence repeat (ISSR) reaction condition for *Magnolia officinalis* genomic DNA, the concentrations of Mg^{2+} , *Taq* polymerase, primers, deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), and template DNA were studied with an orthogonal experimental design, and the optimal anneal temperature of different primers and cycles were determined through gradient PCR. The optimal PCR system for ISSR analysis was 1.5 mmol $MgCl_2 \cdot L^{-1}$, 0.3 μ mol primer $\cdot L^{-1}$, 0.04 U *Taq* polymerase $\cdot \mu$ l⁻¹, 0.2 mmol dNTP $\cdot L^{-1}$, 4 ng DNA template $\cdot \mu$ l⁻¹, and 1 \times Buffer in 25 μ l reaction solution, and the augmentation procedure was pre-denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 5 min, denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at 50 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C for 45 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 90 s, reaction with 40 cycles, and extension at 72 $^{\circ}$ C for 8 min. Twenty-one ISSR primers were screened by using the optimal reaction system, and the genetic diversity was analyzed with some primers.

Key words: *Magnolia officinalis*; orthogonal design; primer screening; ISSR.

ISSR (inter-simple sequence repeat) 是 Zietkiewicz 等 (1994) 于 1994 年创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记。由于其具有引物通用性、显性标记、符合孟德尔遗传规律及多态性高等特点 (Prevost & Wilkinson, 1999; 钱韦等, 2000; Michael 2006), 已在物种的遗传结构与遗传多样性分

析 (Barth *et al.*, 2002; 葛永奇等, 2003; Galvanm *et al.*, 2003)、品种鉴定 (邱英雄等, 2002; 宿红艳等, 2008)、基因定位及植物基因组作图 (Devey *et al.*, 2002; 朱元娣等, 2003) 等研究领域发挥了重要作用。

厚朴 (*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils) 为木兰科 (Magnoliaceae) 木兰属落叶乔木, 是我国特有的药用植物, 被列为国家二级保护濒危种 (傅立国, 1991)。以往关于厚朴的研究主要集中在其栽培技

* 国家科技部公益性林业专项资助项目 (200704022)。

** 通讯作者 E-mail: zlyang0002@126.com

收稿日期: 2009-03-19 接受日期: 2009-08-05

术(伍四奎等 2005;何世龙等 2007)、厚朴酚(Park *et al.* 2003)及和厚朴酚(Matsuda *et al.* 2001;Pyo *et al.* 2002;Park *et al.* 2004)的药理作用方面。近年来,随着分子生物学技术的发展,建立在 PCR 基础上的各种分子标记技术在濒危动植物保护中得到越来越广泛的应用(徐莉和赵桂仿 2002),其中, RAPD(random amplified polymorphic DNA)技术(郭宝林等 2001)、任意引物 PCR(arbitrarily primed PCR, AP-PCR)技术(苏应娟等 2002)及 AFLP(amplified fragment length polymorphism)技术(王有为等 2007)也已在厚朴的研究中被应用,但至今未见 ISSR 技术在厚朴研究中的相关报道。

虽然进行 ISSR 标记研究的原理十分简单,只要获得不同物种的适用引物和 PCR 反应条件就可进行,但对于未开展过 ISSR 研究的物种来讲,所选的 ISSR 引物并不一定适合,并且反应体系不同也可产生不同的结果(姜静等 2003)。可见,开展 ISSR 相关研究之前,对 ISSR-PCR 反应条件优化和引物的筛选是非常必要的。鉴于此,本文通过 5 因素 4 水平的正交试验,对厚朴 ISSR-PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 、引物、dNTPs、*Taq* 酶和模板 DNA 等因素进行梯度优化,并利用优化体系筛选可用于厚朴扩增的 ISSR 引物,旨在建立适合厚朴的 ISSR-PCR 反应体系并筛选其特异 ISSR 引物,以期为濒危物种厚朴遗传多样性的分析和分子鉴定的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

厚朴样品取自中国林科院亚热带林业研究所内的中亚苗业基地。厚朴叶片采摘后,用冰盒迅速带回实验室置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 厚朴叶片总 DNA 的提取 根据黄绍辉和方炎明(2007)的 SDS-CTAB 结合法,并加以改进,提取基因组 DNA,利用紫外可见分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.2.2 厚朴 ISSR-PCR 原初扩增体系及扩增程序

ISSR 引物设计参照加拿大哥伦比亚大学网站公布的序列(University of British Columbia, Set No. 9, No. 801-900),由上海生工生物工程技术有限公司合成。原初的扩增反应体系为 $25\text{ }\mu\text{l}$,包括 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$, $0.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, $0.04\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ *Taq* 酶, $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, $3\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 模板

DNA, $1\times$ Buffer, 扩增程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $50\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (退火温度随引物不同而定)退火 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s , 共 40 个循环,然后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min 。扩增产物经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB(溴化乙锭, $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)染色, Bio-Rad 凝胶成像仪拍照、观察;通过 BandScan 5.0 软件对凝胶电泳图进行泳道校正、数据提取,然后用凝胶分析软件 Gel-Pro 4.5 分析并统计目的条带长度及其他相关信息。

1.2.3 厚朴 ISSR-PCR 反应体系的正交优化设计

采用 $L_{16}(4^5)$ 的正交设计,在 4 个水平上进行优化试验。所用引物为 UBC810,扩增体系及扩增程序同 1.2.2,退火温度根据其 T_m 值初步确定为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。以 DL2000 Marker(宝生物有限公司)作为分子量标记。因素水平见表 1, $L_{16}(4^5)$ 正交设计方案见表 2。

1.2.4 温度梯度 PCR 采用温度梯度 PCR 模式,将温度设定为 $47\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 57\text{ }^{\circ}\text{C}$,自动生成 8 个温度梯度,由高到低分别为 57.0 、 56.2 、 54.9 、 53.0 、 50.7 、

表 1 PCR 反应因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of PCR reaction

水平	Mg^{2+} ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	dNTP ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> 酶 ($\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	引物 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	模板 DNA ($\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
1	1	0.1	0.02	0.2	2
2	1.5	0.15	0.03	0.3	3
3	2	0.2	0.04	0.4	4
4	2.5	0.25	0.05	0.5	5

表 2 ISSR-PCR 反应正交试验设计 $L_{16}(4^5)$

Tab. 2 Orthogonal design for ISSR-PCR reaction $L_{16}(4^5)$

编号	Mg^{2+} ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	dNTP ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> 酶 ($\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	引物 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	模板 DNA ($\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
1	1	0.1	0.02	0.2	2
2	1	0.15	0.03	0.3	3
3	1	0.2	0.04	0.4	4
4	1	0.25	0.05	0.5	5
5	1.5	0.1	0.03	0.4	5
6	1.5	0.15	0.02	0.5	4
7	1.5	0.2	0.05	0.2	3
8	1.5	0.25	0.04	0.3	2
9	2	0.1	0.04	0.5	3
10	2	0.15	0.05	0.4	2
11	2	0.2	0.02	0.3	5
12	2	0.25	0.03	0.2	4
13	2.5	0.1	0.05	0.3	4
14	2.5	0.15	0.04	0.2	5
15	2.5	0.2	0.03	0.5	2
16	2.5	0.25	0.02	0.4	3

48.9、47.7 和 47.0, PCR 体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、*Taq* 酶浓度、引物浓度和模板 DNA 浓度根据优化试验的结果而定, PCR 扩增程序同 1.2.2, 以确定此引物最合适的退火温度。

1.2.5 厚朴 ISSR 引物筛选及遗传多样性 利用优化的反应体系从哥伦比亚大学公布的 100 个 ISSR 引物中筛选出能够应用于厚朴相关研究的 ISSR 引物, 并利用筛选到的部分 ISSR 引物对其遗传多样性进行分析。

1.3 数据处理

1.3.1 正交试验数据 对每个因素处理产生的可识别的条带数进行计数, 计算每个因素同一水平下的试验值之和 $K_i (i=1, 2, 3, 4)$ 极差 $R (K_{max} - K_{min})$ (R 值反映了影响因素对 ISSR-PCR 反应体系的影响程度, R 值越大, 说明该因素对试验结果影响越显著) 对不同因素在不同水平下产生的条带数进行多因素方差分析。

文中所涉及的数据处理及差异性分析均在软件 SPSS 11.5 和 Excel 中进行, $P \leq 0.05$ 为显著差异, $P \leq 0.01$ 为极显著差异, $P > 0.05$ 为差异不显著。

1.3.2 遗传数据分析 将 ISSR 琼脂糖凝胶电泳图谱记录后进行人工读带, 以 DNA Marker DL2000 作为相对分子量标准, 对照反应产物在凝胶上的对应位置, 有带记为 1, 无带记为 0, 得到 ISSR 分析的原始数据矩阵(金则新等, 2007)。用 POPGENE 软件(Yeh & Boyle, 1997)对所选厚朴个体进行遗传参数分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量

高质量的 DNA 是进行 ISSR-PCR 反应的基础。

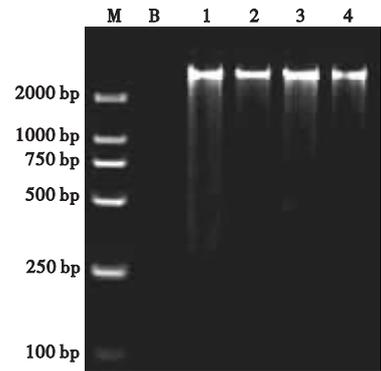


图 1 部分厚朴样品基因组 DNA

Fig. 1 Genomic DNA of *Magnolia officinalis*

M: DL2000 DNA 分子量标准; B: 阴性对照; 1~4: 厚朴样品编号。

经紫外可见分光光度计检测, 所提取的厚朴 DNA 的 OD 值 260 nm/280 nm 介于 1.80 ~ 1.85, 平均值为 1.832, 表明所提取的 DNA 纯度较好。琼脂糖凝胶电泳结束后在点样孔附近都有单一的高分子量条带(图 1), 利用凝胶分析软件 Gel-Pro Analyzer 4.5 对提取的基因组 DNA 条带长度进行计算判读, 发现条带长度在 20 kb 左右, 所提 DNA 较完整, 质量高, 可用于后续 ISSR-PCR 反应。

2.2 ISSR-PCR 正交试验的直观分析

厚朴 ISSR-PCR 正交试验的电泳结果见图 2, 数据统计结果见表 3。经软件 Gel-Pro Analyzer 4.5 分析电泳结果, 确定条带数。发现, 处理 2、3、4、6、8、9、10 和 15 扩增条带数较多, 相比之下, 处理 3、4、9 的主带更为明显, 且条带明亮清晰。因此, 这 3 个处理在厚朴 ISSR-PCR 扩增中效果较好。

2.3 各因素对厚朴 ISSR-PCR 反应的影响

在正交试验结果分析中, 常根据电泳条带数、亮度和背景对每个处理进行打分, 然后再计算分析(周凌瑜等, 2008), 然而这种主观的打分方法会直

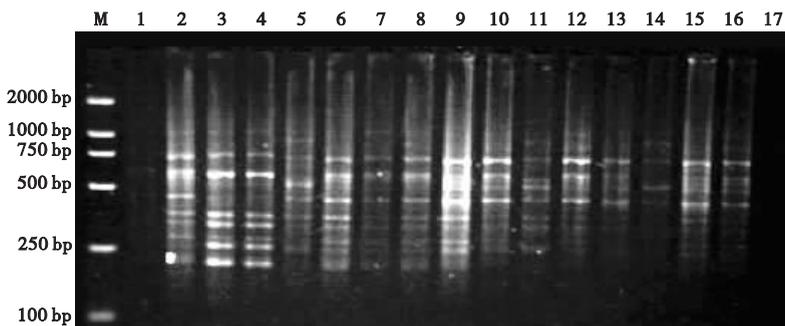


图 2 正交试验 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis map of PCR products of the orthogonal tests

M: DL2000 DNA 分子量标准; 1~16 为正交试验中的 16 个处理; 17 为阴性对照。

表 3 正交试验数据分析

Tab.3 Data analysis of orthogonal tests

编号	Mg ²⁺ (mmol·L ⁻¹)	dNTP (mmol·L ⁻¹)	Taq 酶 (U·μl ⁻¹)	引物 (μmol·L ⁻¹)	模板 DNA (ng·μl ⁻¹)	扩增 片断
1	1	1	1	1	1	3
2	1	2	2	2	2	8
3	1	3	3	3	3	8
4	1	4	4	4	4	9
5	2	1	2	3	4	7
6	2	2	1	4	3	9
7	2	3	4	1	2	7
8	2	4	3	2	1	8
9	3	1	3	4	2	9
10	3	2	4	3	1	8
11	3	3	1	2	4	7
12	3	4	2	1	3	6
13	4	1	4	2	3	6
14	4	2	3	1	4	4
15	4	3	2	4	1	9
16	4	4	1	3	2	5

接影响最终的分析结果(穆立蕃等 2006)。为使结果更加客观,可根据每个处理产生的可识别的条带数进行极差分析(表 4)。由表 4 可知,引物浓度对厚朴 ISSR-PCR 反应的影响最大,其次为 Mg²⁺,而 Taq 酶和 dNTP 作用相当,DNA 模板对厚朴 ISSR 扩增影响最小。

由于极差分析不能估计实验误差,因此降低了实验结果的精度,为了准确判断各因素对厚朴 ISSR-PCR 反应的影响是否显著,进一步进行方差分析(表 5),发现,除 DNA 浓度对试验结果的影响未达到显著水平($F = 0.5556, P > 0.05$)外,其他因素均达到极显著水平($P < 0.01$),由大到小依次为:引物、Mg²⁺、Taq 酶、dNTP 和 DNA 模板。这一结果与极差分析的结果相同。

2.4 各因素的不同水平对厚朴 ISSR-PCR 扩增的影响

2.4.1 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

表 4 扩增片断数总和及极差分析

Tab.4 Sum of the amplified bands and range analysis

项目	Mg ²⁺ (mmol·L ⁻¹)	dNTP (mmol·L ⁻¹)	Taq 酶 (U·μl ⁻¹)	引物 (μmol·L ⁻¹)	模板 DNA (ng·μl ⁻¹)
K ₁	28	25	24	20	28
K ₂	31	29	30	29	29
K ₃	30	31	29	28	29
K ₄	24	28	30	36	27
R	7	6	6	16	2

K_i 表示每个因素在同一水平下的试验值之和($i = 1, 2, 3, 4$);R 表示极差。

表 5 ISSR-PCR 正交试验各因素间的方差分析

Tab.5 Variance analysis for factors of orthogonal tests of ISSR-PCR

变异来源	方差 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F
Mg ²⁺	19.25	3	6.4167	8.5556**
dNTP	13.00	3	4.3333	5.7778**
Taq 酶	18.75	3	6.2500	8.3333**
引物	61.75	3	20.5833	27.4444**
DNA	1.25	3	0.4167	0.5556
误差	12.00	16	0.7500	
总和	126.00	31		

** 表示在 0.01 水平差异极显著。

浓度对 ISSR-PCR 的带型和背景会产生明显的影响(周凌瑜等 2008),极差分析(表 4)和方差分析(表 5)都表明引物浓度不但能够显著影响试验结果,而且是所有因素中影响最明显的。从图 3A 可以看出,随引物浓度的增加,扩增条带数呈先增后减再增的趋势,当浓度为 0.5 μmol·L⁻¹时,扩增条带数达到最大值。虽然引物浓度在 0.5 μmol·L⁻¹产生的条带数最多,但在图 2 中 0.5 μmol·L⁻¹下条带背景相对较差,并且稍微出现非特异性扩增条带,因此,在本实验条件下,引物浓度确定为 0.3 μmol·L⁻¹。

2.4.2 Mg²⁺ 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 Mg²⁺ 的作用主要是与反应液中的 dNTP、引物及模板相结合,影响引物与模板的结合效率,同时对 Taq 酶的活性产生影响(席嘉宾等,2004)。图 3B 表明,4 个 Mg²⁺ 浓度下,产生的条带数呈先增加,然后趋于平缓,最后减少的趋势,由于 Mg²⁺ 浓度过高易产生非特异性扩增,所以在 Mg²⁺ 浓度 1.5 与 2.0 mmol·L⁻¹ 扩增效果相当的情况下,选择 1.5 mmol·L⁻¹ 较为适宜。

2.4.3 Taq 酶浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 在 PCR 反应体系中,Taq 酶用量过高不仅增加成本,还会产生非特异性扩增,过低则会降低产物合成效率甚至不能扩增。从图 3C 可以看出,Taq 酶浓度在 0.02~0.03 U·μl⁻¹ 所产生的条带数是一个明显增加的趋势,当达到 0.03 U·μl⁻¹ 后,条带数便不再增加,变化范围也相对较小,图 2 显示 Taq 酶浓度在 0.04 U·μl⁻¹ 产物的稳定性明显好于 0.03 和 0.05 U·μl⁻¹,因此,综合考虑确定厚朴 ISSR-PCR 反应体系中酶的浓度为 0.04 U·μl⁻¹。

2.4.4 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 dNTP 是 Taq 酶的底物,其浓度直接影响到扩增反应的效率。由图 3D 可知,在 0.1~0.25 mmol·L⁻¹,扩增

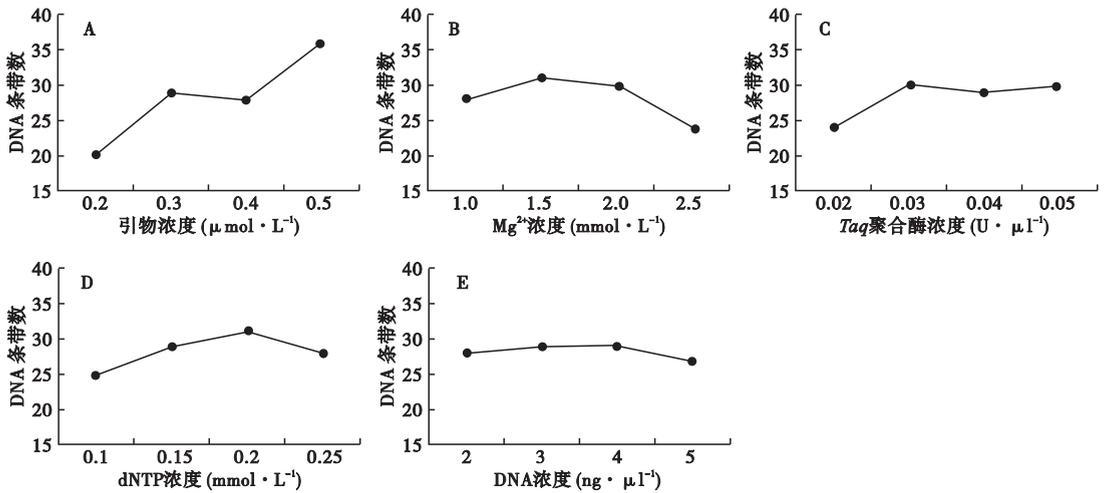


图 3 各因素不同水平对 ISSR-PCR 的影响
 Fig. 3 Influence of different levels of the factors on ISSR-PCR reaction

条带数随引物浓度增大而先增加再减少。当 dNTP 浓度达到 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,条带数目最多,同时,图 2 也显示此浓度下扩增产物的亮度及其稳定性最高,背景颜色相对较浅,因此,确定 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为厚朴扩增的最适 dNTP 浓度。

2.4.5 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

从图 3E 可以看出,虽然模板 DNA 浓度不同,但是扩增产生的条带数相差不大 ($P > 0.05$) (表 5),且极差值(表 4)也是所有因素中最低。可见,DNA 浓度在 $2 \sim 5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 对试验结果影响不显著。这也与谢运海等(2005)及曹福亮等(2008)的研究结果一致。

2.5 最适退火温度的确定

PCR 反应中,引物序列和物种的不同都会对退火温度产生影响(Zeng et al., 2002),这也使退火温度成为影响 ISSR-PCR 稳定扩增的重要因素。由图 4 可以看出,第 4 和第 5 泳道背景清晰,扩增条带数最多,且主带明显,因此退火温度以 $54.9 \text{ }^\circ\text{C} \sim 53.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 最佳。由于较高的退火温度可降低非特异性扩增,

因此选取 $54.9 \text{ }^\circ\text{C}$ 为最适宜的退火温度。

2.6 循环次数对 ISSR-PCR 的影响

选择适宜的循环次数将会获得良好的扩增图谱(穆立蕾等 2006)。从理论上说,循环次数越多,扩增产物产率越高,但实际上会受到各反应成分的用量限制。在原来的反应程序的基础上,其他条件不变,分别试验了 30、35、40、45 个循环对扩增结果的影响(图 5)。发现随着循环次数的增加,扩增产物的量也增多,但是非特异性条带和涂带也开始较为严重,因此,相比之下 40 个循环得到的条带强弱合适,清晰可辨,为最佳循环次数。

2.7 厚朴特异 ISSR 引物筛选及遗传多样性

通过厚朴模板 DNA 进行反复试验,最终确定厚朴 ISSR-PCR 反应的适宜体系及扩增条件。其 $25 \mu\text{L}$ 反应体系为: $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, $0.04 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ Taq}$ 酶, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, $4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA, $1 \times \text{Buffer}$, 扩增程序为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$

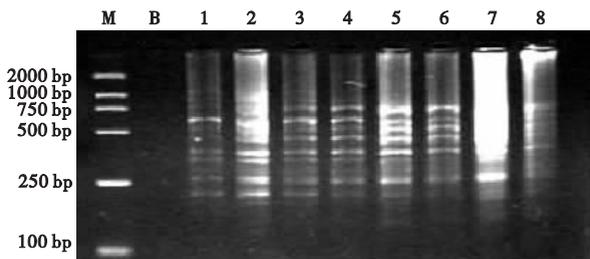


图 4 梯度 PCR 电泳图
 Fig. 4 Electrophoresis patterns of gradient PCR
 M: DL2000 DNA 分子量标准; B: 阴性对照; 1~8 退火温度分别为 57.0 、 56.2 、 54.9 、 53.0 、 50.7 、 48.9 、 47.7 和 $47.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

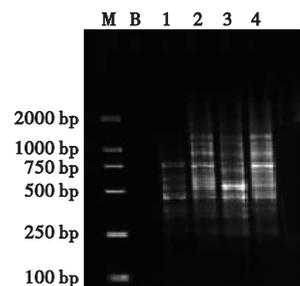


图 5 不同循环次数电泳图
 Fig. 5 Gel electrophoresis patterns in different cycles
 M: DL2000 DNA 分子量标准; B: 阴性对照; 1~4 循环次数分别为: 30、35、40、45。

预变性 5 min 94 °C 变性 30 s 50 °C ~ 60 °C(退火温度随引物不同而定) 退火 45 s 72 °C 延伸 90 s 共 40 个循环 , 然后 72 °C 延伸 8 min 4 °C 终止反应。利用此反应体系 , 对 100 条哥伦比亚大学网站公布的 ISSR 引物进行筛选 , 成功筛选到 21 条可用于厚朴 PCR 扩增的 ISSR 引物(表 7)。

随机选取引物 UBC810、UBC827、UBC835、UBC836、UBC842、UBC848、UBC857 对 12 个厚朴个体进行扩增 , 7 个 ISSR 引物对厚朴 12 个个体共扩增出 56 条带 , 其中 39 条是多态带 , 多态带百分率为 69.64%。有效等位基因数(N_e) 为 1.2610 ~ 1.6004 , 平均为 1.4355 ; Nei 基因多样性指数(H) 为 0.1530 ~ 0.3603 , 平均为 0.2557 ; Shannon 多样性指数介于 0.2330 ~ 0.5415 , 平均为 0.3809(表 8)。

表 8 由 ISSR 检测的厚朴 12 个个体的遗传变异

Tab.8 Genetic diversity detected by ISSR in 12 *Magnolia officinalis* individuals

引物名称	观测等位基因 N_a	有效等位基因 N_e	Nei 基因多样性 H	Shannon 指数 I
UBC810	1.7500 ± 0.1637	1.5934 ± 0.1384	0.3283 ± 0.0733	0.4715 ± 0.1042
UBC827	2.0000 ± 0.0000	1.6004 ± 0.0938	0.3603 ± 0.0364	0.5415 ± 0.0407
UBC835	1.8889 ± 0.1111	1.5522 ± 0.1114	0.3250 ± 0.0548	0.4846 ± 0.0741
UBC836	1.5000 ± 0.1890	1.2610 ± 0.1363	0.1530 ± 0.0721	0.2330 ± 0.1029
UBC842	1.5000 ± 0.1890	1.2996 ± 0.1172	0.1857 ± 0.0713	0.2786 ± 0.1062
UBC848	1.6250 ± 0.1830	1.3567 ± 0.1369	0.2122 ± 0.0728	0.3210 ± 0.1039
UBC857	1.5714 ± 0.2020	1.3610 ± 0.1530	0.2111 ± 0.0816	0.3146 ± 0.1172
平均	1.6964 ± 0.0620	1.4355 ± 0.0488	0.2557 ± 0.0259	0.3809 ± 0.0369

3 讨论

目前 , 对 ISSR-PCR 扩增体系的优化主要采用单因素试验或正交试验 2 种方法。但与单因素试验相比 , 正交试验可减小试验规模 , 又不使信息损失太多 , 从而可以快速找到最佳水平组合 , 并可分析各因素的主次顺序 , 为进一步试验明确方向 , 克服盲目性(盖钧镒 , 2000) ; 并且 , 正交试验设计具有均衡分散、综合可比及可伸可缩、效应明确的特点 , 可以了解各因素之间的内在规律 , 较快地找到最优的水平组合(续九如和黄智慧 , 1998)。

本研究参照周凌瑜等(2008)的方法 , 设计了 5 因素 4 水平的正交试验 , 同时 , 为了获得重复性和可靠性较高的 ISSR 带谱 , 也对各因素浓度的选取进行了综合的考虑 , 参考了永瓣藤(*Monimopetalum chinense*)(谢国文等 , 2007)、紫椴(*Tilia amurensis*)(穆立蕾等 , 2006)、银杏(*Ginkgo biloba*)(曹福亮等 , 2008)、乐昌含笑(*Michelia tsoi* Dandy)(邱英雄等 , 2002)以及三尖杉(*Cephalotaxus fortunei*)(李因刚

表 7 ISSR 引物名称及序列

Tab.7 Sequences and name of primers

引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 (°C)	引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 (°C)
UBC807	(AG) ₈ T	53.0	UBC836	(AG) ₈ YA	51.9
UBC810	(GA) ₈ T	54.9	UBC841	(GA) ₈ YC	53.7
UBC811	(GA) ₈ C	51.9	UBC842	(GA) ₈ YG	56.1
UBC812	(GA) ₈ A	47.7	UBC844	(CT) ₈ RC	53.7
UBC815	(CT) ₈ G	53.7	UBC846	(CA) ₈ RT	53.7
UBC817	(CA) ₈ A	55.0	UBC848	(CA) ₈ RG	53.7
UBC818	(CA) ₈ G	59.2	UBC856	(AC) ₈ YA	53.7
UBC824	(TC) ₈ G	51.9	UBC857	(AC) ₈ YG	53.7
UBC827	(AC) ₈ G	51.9	UBC864	(ATG) ₆	45.7
UBC829	(TG) ₈ C	58.0	UBC868	(GAA) ₆	46.9
UBC835	(AG) ₈ YC	56.1			

R 代表 A、G、Y 代表 C、T。

等 2008)等 ISSR 反应体系。总体来看 , 引物是本研究中影响最为明显的一个因素。由于引物浓度不宜偏高或过低 , 过高的引物浓度易引起错配和产生非特异性扩增 , 过低则会无法进行有效扩增(宣继萍和章镇 , 2002 ; 张志红等 , 2004) , 针对这种情况 , 本试验确定 0.3 μmol · L⁻¹ 为最佳引物浓度 ; 其次是 Mg²⁺、dNTP 和 Taq 酶。Mg²⁺ 是 Taq 酶的激活剂 , 其浓度不仅影响酶的活性及合成的可靠性 , 而且还影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度 , dNTP 分子中的磷酸基团能定量地与 Mg²⁺ 结合 , 使游离的 Mg²⁺ 浓度降低 , 这二者之间具有相互制约的作用 , 通过比较扩增条带数 , 以及扩增条带的背景 , 最终确定 Mg²⁺ 与 dNTP 浓度分别为 1.5 和 0.2 mmol · L⁻¹ 对本实验较为适宜 , Taq 酶最佳反应浓度为 0.04 U · μl⁻¹ , 与冯夏连等(2006)最佳的 Taq 酶浓度结论相同 , 在这个浓度下 , 既保证了实验结果的可靠性 , 又节省试验成本 ; 而模板 DNA 浓度在 2 ~ 5 ng · μl⁻¹ 对试验结果影响不显著 , 但是过高

或过低的模板 DNA 浓度都不利于扩增反应,故而厚朴 ISSR-PCR 体系中 DNA 模板浓度最终确定为 $4 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 。

另外,引物不同,物种不同,其退火温度亦不相同。如余艳等(2003)用 ISSR 技术检测沙冬青(*Amomopiptanthu smongolicus*)时,引物 880 和 889 的退火温度分别为 $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $50 \text{ }^\circ\text{C}$,而席嘉宾等(2004)在运用 ISSR 引物检测地毯草(*Axonopus compressus*)样品时发现这 2 个引物的最佳退火温度分别是 $62 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $59 \text{ }^\circ\text{C}$ 。本实验也证实了这一点。以引物 UBC835 和 UBC856 为例,在华木莲(*Manglietia decidua*)中(廖文芳等 2004),退火温度分别为 $49 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $48 \text{ }^\circ\text{C}$,但在本研究中其退火温度分别为 $56.1 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $58.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。因此,对于不同引物,必须各自筛选其退火温度,不能统一而论。

本文利用最终确定的 ISSR-PCR 反应体系成功筛选到 21 条可以在厚朴中稳定扩增的 ISSR 引物,并利用其中的 7 条引物对 12 个厚朴个体进行扩增,简单分析了其遗传多样性,所产生的 ISSR 标记位点清晰,反应稳定,检测多态性能力较强,并且不同引物显示的遗传多样性指标各不相同。可见,所筛选的 ISSR 引物可以用于厚朴遗传多样性的相关研究,为今后厚朴 ISSR 分子标记研究提供参考。

总之,ISSR-PCR 反应体系的建立既要保证扩增产物足量,条带清晰,重复性好,又要兼顾节约成本和尽量缩短试验周期的原则。

参考文献

曹福亮,王国霞,李广平,等. 2008. 银杏 ISSR-PCR 扩增反应体系的优化. 浙江林学院学报, **25**(2):186-190.

冯夏连,何承忠,张志毅,等. 2006. 毛白杨 ISSR 反应体系的建立及优化. 北京林业大学学报, **28**(3):61-65.

傅立国. 1991. 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第 1 册). 北京:科学出版社.

姜静,杨传平,刘桂丰,等. 2003. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化. 生态学杂志, **22**(3):91-93.

金则新,李钧敏,蔡琰琳. 2007. 不同海拔高度木荷种群遗传多样性的 ISSR 分析. 生态学杂志, **26**(8):1143-1147.

盖钧镒. 2000. 试验统计方法. 北京:中国农业出版社.

葛永奇,邱英雄,丁炳扬,等. 2003. 子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析. 生物多样性, **11**(4):276-287.

郭宝林,吴勳,斯金平,等. 2001. 厚朴 DNA 分子标记的研究——正品的 RAPD 研究. 药学学报, **36**(5):

386-389.

何世龙,何世文,李家容. 2007. 厚朴速生丰产栽培技术. 中国林业, (10):40

黄绍辉,方炎明. 2007. 改进的 SDS-CTAB 法提取濒危植物连香树总 DNA. 武汉植物学研究, **25**(1):98-101.

李因刚,周志春,金国庆. 2008. 三尖杉种源遗传多样性. 林业科学, **44**(2):64-69.

廖文芳,夏念和,邓云飞,等. 2004. 华木莲的遗传多样性研究. 云南植物研究, **26**(1):58-64.

穆立蓄,刘赢男,冯富娟,等. 2006. 紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化. 林业科学, **42**(6):26-31.

钱韦,葛颂,洪德元. 2000. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性. 植物学报, **42**(7):741-750.

邱英雄,傅承新,何云芳. 2002. 乐昌含笑不同类型鉴定的 ISSR-PCR 分析. 林业科学, **38**(6):49-53.

苏应娟,朱建明,王艇,等. 2002. 厚朴的任意引物 PCR 指纹图谱分析. 中草药, **33**(6):545-548.

王有为,何敬胜,黄博,等. 2007. 凹叶厚朴野生与栽培居群的遗传结构及遗传多样性. 第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集, 286-290.

伍四奎,何乾峰,刘宗林. 2005. 厚朴栽植密度的探讨. 湖南林业科技, **32**(3):87-88.

席嘉宾,郑玉忠,杨中艺. 2004. 地毯草 ISSR 反应体系的建立与优化. 中山大学学报(自然科学版), **43**(3):80-84.

谢国文,张金杏,郑燕玲,等. 2007. 珍稀濒危植物永瓣藤 DNA 提取与 ISSR 条件优化. 广西植物, **27**(6):817-820.

谢运海,夏德安,姜静,等. 2005. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系. 分子植物育种, **3**(3):445-450.

徐莉,赵桂仿. 2002. 微卫星 DNA 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用. 西北植物学报, **22**(3):714-722.

续九如,黄智慧. 1998. 林业试验设计. 北京:中国林业出版社.

宿红艳,王磊,明永飞,等. 2008. ISSR 分子标记技术在金针菇菌株鉴别中的应用. 生态学杂志, **27**(10):1725-1728.

宣继萍,章镇. 2002. 适合于苹果的 ISSR 反应体系的建立. 植物生理学通讯, **38**(6):549-550.

余艳,陈海山,葛学军. 2003. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选. 热带亚热带植物学报, **11**(1):15-19.

张志红,谈风笑,何航航,等. 2004. 红树植物海漆 ISSR 条件的优化. 中山大学学报(自然科学版), **43**(2):63-66.

周凌瑜,吴晨炜,唐东芹,等. 2008. 利用正交设计优化小

- 苍兰 ISSR-PCR 反应体系. 植物研究, **28**(4):402-407.
- 朱元娣, 李光晨, 李春雨, 等. 2003. 苹果柱型基因的 ISSR 分子标记研究. 园艺学报, **30**(5):505-510.
- Barth S, Meichinger AE, Lubberstedt Th. 2002. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, **11**:494-505.
- Devey ME, Bell JC, Uren TL, et al. 2002. A set of microsatellite markers for fingerprinting and breeding applications in *Pinus radiata*. *Genome*, **45**:984-989.
- Galvanm Z, Bornet B, Balatti PA, et al. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, **132**:297-301.
- Matsuda H, Kageura T, Oda M, et al. 2001. Effects of constituents from the bark of *Magnolia obovata* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **49**:716-720.
- Michael W. 2006. Use of DNA markers to study bird migration. *Journal of Ornithology*, **147**:234-244.
- Park EJ, Zhao YZ, Na M, et al. 2003. Protective effects of honokiol and magnolol on tertiary butyl hydroperoxide- or D-galactosamine-induced toxicity in rat primary hepatocytes. *Planta Medica*, **69**:33-37.
- Park J, Lee J, Jung E, et al. 2004. In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp. *European Journal of Pharmacology*, **496**:189-195.
- Prevost A, Wilkinson MJ. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**:107-112.
- Pyo MK, Lee Y, Yun-Choi HS. 2002. Anti-platelet effect of the constituents isolated from the barks and fruits of *Magnolia obovata*. *Archives of Pharmacal Research*, **25**:325-328.
- Yeh FC, Boyle TJB. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, **129**:157.
- Zeng J, Zou YP, Bai JY, et al. 2002. Preparation of total DNA from "Recalcitrant Plant Taxa". *Acta Botanica Sinica*, **44**:694-697.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**:176-183.

作者简介 于华会,女,1983年生,硕士研究生。主要从事药用植物分子方面的研究。E-mail:yuhuahui1217@163.com
责任编辑 王伟
