

芸香科药用植物ISSR PCR 反应体系的建立及优化

柴素芬, 陈兆贵, 洪彩霞 (惠州学院生命科学系, 广东惠州 516007)

摘要 [目的] 建立和优化芸香科药用植物的品种的ISSR 反应体系, 为芸香科药用植物的资源评价、品种鉴定提供依据。[方法] 以象头山芸香科植物柚、山油柑、3 个品种为研究对象, 从DNA 提取、退火温度、循环次数、引物筛选等方面研究ISSR 反应及优化条件。[结果] 选用的20 个引物中有3 种引物扩增效果较好, 以柚为代表的优化结果表明, 引物826 对芸香科植物扩增的最适退火温度为52.0 , 最佳循环次数为35 个循环。[结论] ISSR 适合于芸香科药用植物的品种的鉴定。

关键词 芸香科; ISSR; 反应体系

中图分类号 S567.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14433-03

Construction and Optimization of ISSR Reaction System of Medicinal Rutaceae Plants

CHAI Su-fen et al (Department of Life Sciences, Huizhou University, Huizhou, Guangdong 516007)

Abstract [Objective] The research aimed to study the construction and optimization of ISSR reaction system of medicinal Rutaceae plant, and provide references for resources evaluation and cultivar identification of Rutaceae plants. [Method] Three varieties of Rutaceae plants including *C. grandis* (L.) Osbeck, *Aronychia pedunculata* (L.) Mq., *Z. avicennae* (Lam.) DC were used as material for study. The ISSR reaction system included the genomic DNA extraction, amplification, cycle time, primers screening. [Result] In the identification of ISSR molecular markers, 3 primers in 20 of being chose had better amplification effect. Optimization results representative of *C. grandis* (L.) Osbeck showed that primers 826 for the optimum temperature of Rutaceae plants amplification was 52.0 , and the best cycle time was 35 cycles. [Conclusion] ISSR reaction system can used to identify the cultivar of Rutaceae plants.

Key words Rutaceae plant; ISSR; Reaction system

芸香科(Rutaceae) 为被子植物门双子叶植物纲的一个科。常绿或落叶乔木、灌木或攀援藤本或草本, 通常含挥发油。叶具透明油腺点, 互生, 少数对生, 单叶、单身复叶或羽状复叶。花两性, 多为辐射对称, 聚伞花序, 少数成总状、穗状花序或单花; 萼片4~5; 花瓣4~5, 离生; 雄蕊4~5 或8~10 或多数; 雌蕊心皮4~5, 分离或合生, 或多个心皮; 具花盘。

果、蒴果、翅果、核果或柑果。芸香科有180 属1 300~1 600 种, 主产于热带和亚热带, 少数温带; 我国29 属150 种, 主产于西南和华南^[1]。

遗传多样性主要是指种内不同居群之间或同一居群不同个体之间的遗传变异的总和^[2]。遗传多样性是植物种质资源研究的主要内容之一, 较为全面地了解现有物种的种质资源的遗传多样性, 是药用植物保存和利用的前提^[2]。近年来, 分子标记技术已广泛应用于药用植物种质资源的鉴定、遗传多态性分析、道地性分析等^[3-6]。简单序列重复区间(Inter-Simple Sequence Repeats, ISSR) 是近年来发展起来的一类新型的分子标记技术, 具有多态性高和重复性好等优点, 已广泛用于药用植物的鉴定和遗传多样性研究^[7-9]。但将ISSR 分子标记用于芸香科植物的鉴定尚没见报道。为此, 笔者对象头山3 种芸香科药用植物的品种进行ISSR 分析, 建立和优化ISSR 反应体系, 旨在为象头山芸香科药用植物的资源评价和品种鉴定提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 选用3 个芸香科药用植物品种, 分别为柚 [*C. grandis* (L.) Osbeck], 山油柑 [*Aronychia pedunculata* (L.) Mq.] 和 [*Z. avicennae* (Lam.) DC], 取自广东象头山国家级自然保护区。采集各品种的幼叶材料, 放入封口塑料袋, 于-80 低温冰箱保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 芸香科植物形态学鉴定。 柚, 单身复叶, 叶片椭圆形, 叶具宽翅(图1a)。山油柑, 灌木, 三出复叶(图1b), 常绿灌木或乔木, 奇数羽状复叶(图1c)。



注: a 为柚, b 为山油柑, c 为。

Note: a, *Citrus grandis*; b, *Aronychia pedunculata*; c, *Zanthoxylum avicennae*.

图1 3 种植物的形态

Fig.1 The morphology of three species of plants

表1 用于PCR 扩增的引物序列

Table 1 The primer sequences for PCR amplification

引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequences
808	5'-TATATATATATATATAC-3'
811	5'-GAGAGAGAGACAGAGAC-3'
817	5'-CACACACACACACACAA-3'
821	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'
822	5'-TCTCTCTCTCTCTCTCA-3'
826	5'-ACACACACACACACACG-3'
827	5'-ACACACACACACACACG-3'
829	5'-TGTTGTGTGTGTGTGTGTG-3'
835	5'-ACAGAGAGAGAGAGAGAGY-3'
845	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTIRG-3'
847	5'-CACACACACACACACARG-3'
851	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTG-3'
853	5'-TCTCTCTCTCTCTCTCTRA-3'
855	5'-ACACACACACACACACYF-3'
859	5'-TGTTGTGTGTGTGTGTGTGRC-3'
860	5'-TGTTGTGTGTGTGTGTGTGRA-3'
862	5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGC-3'
864	5'-ATGATGATGATGATGATG-3'
876	5'-GATAGATAGACAGACA-3'
879	5'-CTTCACTTCACTTCA-3'

1.2.2 DNA 提取及纯度检测。 DNA 提取采用 CTAB 法^[10],

基金项目 惠州市科技计划项目(项目编号:A50-70204)。

作者简介 柴素芬(1964-), 女, 上海人, 副教授, 从事植物分类方面的研究。

收稿日期 2008-09-11

并略有改动,用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测所提取DNA的质量,用紫外分光光度计测定DNA的纯度和含量,并将其稀释到20 ng/μl,备用。

1.2.3 ISSR PCR 扩增。

(1) 引物筛选。选用宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)合成的20个ISSR引物,见表1。

(2) PCR 反应。PCR 扩增反应在PTC200型热循环仪中进行,初始反应条件:10 μl PCR 反应体系,含模板约1 μl,Taq 酶0.2 μl,dNTPs 0.5 μl,引物0.5 μl,10 ×buffer 1 μl,ddH₂O 6.8 μl。

(3) PCR 扩增条件。94 预变性4 min;94 变性1 min,52 复性1 min,72 延伸2 min,35 个循环;72 延伸8 min,12 Forever。扩增后的DNA用1.2%的琼脂糖凝胶进行电泳,紫外检测拍照。

1.2.4 PCR 扩增条件的优化。

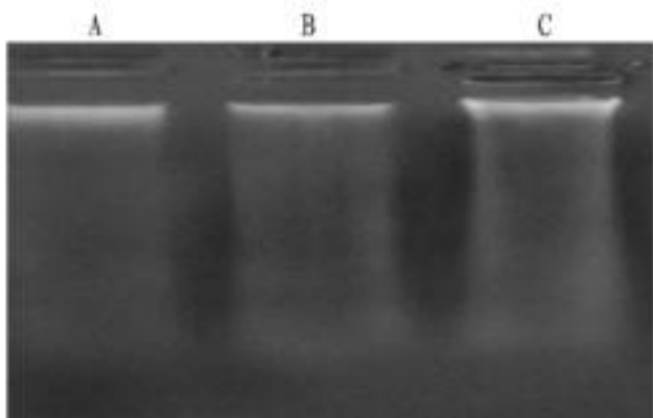
(1) 退火温度的筛选。在确定的最佳反应体系基础上,利用梯度PCR对退火温度进行优化筛选。设定退火温度为:48、52、56、60。

(2) 循环次数的筛选。在确定的最佳反应体系基础上,利用梯度PCR对循环次数进行优化筛选。设定循环次数为:30、35、40、45个。

1.3 数据统计与分析方法 ISSR 是显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,按照相同迁移位置上扩增带记为1、无带为0的方法记录电泳谱带。该研究对电泳结果进行人工读带,仅记录清晰、可重复的并且长度在100~2000 bp的扩增带。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果 将所抽取的DNA样品进行电泳扩增和紫外检测。电泳结果表明,用CTAB法提取的DNA质量较好(图2)。紫外检测结果表明:所抽提出的样品较为纯净,峰面平整,在260 nm附近出现明显的吸收峰(图3)。所提DNA可用于PCR扩增。



注:A、B、C 分别为柚子、山油柑、薊櫟

Note :A, B and C stand for *C. grandis*, *A. pedunculata* and *Z. Aicennae* respectively.

图2 DNA 电泳图

Fig.2 DNA electrophoresis map

2.2 多态性分析 共选用了20条引物对3种材料进行PCR扩增,其中柚能扩增出较多的DNA条带,共有14条引物能扩增出DNA条带(图4~5);引物826、827、864等3条引物能在3个样品中扩增出较多的DNA条带(图6~8)。

分别用826、827和864对3个材料进行多态性分析,在ISSR分析中,每个引物可扩增出10~14条DNA条带,平均12条(图6,表2)。3个引物共扩增出36条条带,其中33条条带

具有多态性,多态性比率为91.7%。这表明ISSR标记能够有效地揭示材料间的多态性。

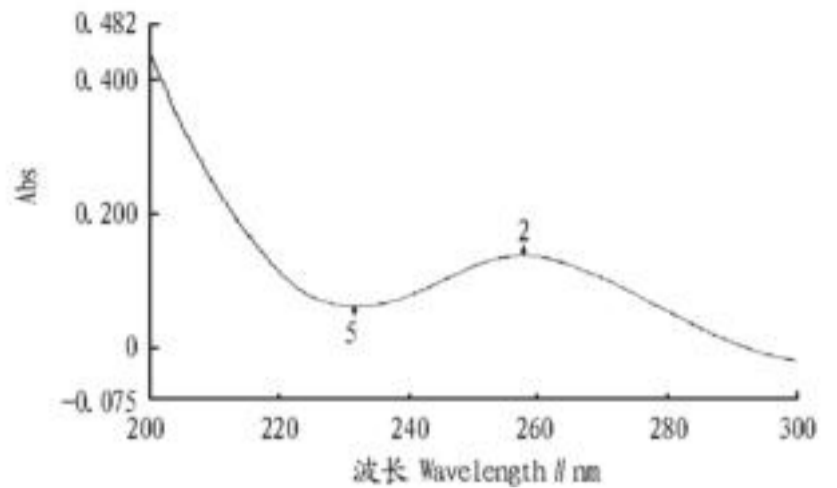
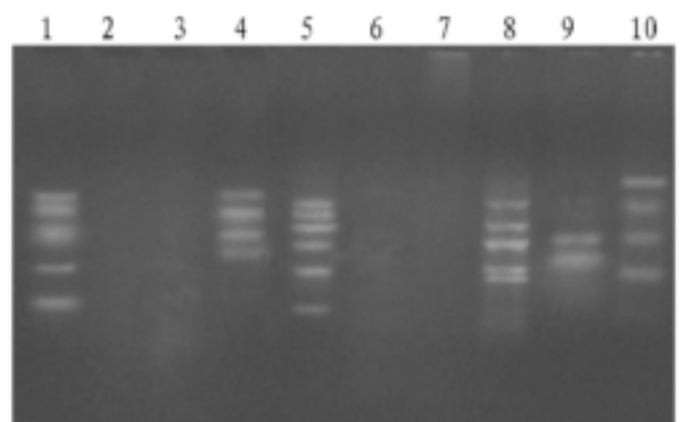


图3 DNA 紫外分光吸收值图谱

Fig.3 The ultraviolet spectrometry spectrum of DNA

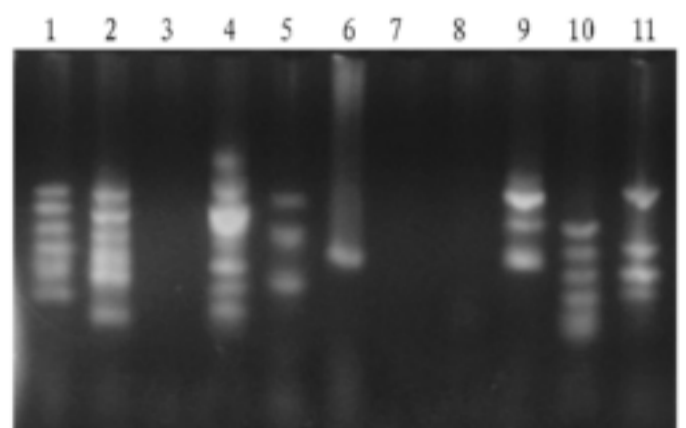


注:1 代表847;2 代表821;3 代表822;4 代表817;5 代表855;6 代表829;7 代表835;8 代表811;9 代表827;10 代表845。

Note :1, Primer 847;2, Primer 821;3, Primer 822;4, Primer 817;5, Primer 855;6, Primer 829;7, Primer 835;8, Primer 811;9, Primer 827;10, Primer 845.

图4 扩增柚子的引物

Fig.4 The amplified primer I of *C. grandis*



注:1 代表876;2 代表862;3 代表808;4 代表826;5 代表864;6 代表853;7 代表860;8 代表879;9 代表851;10 代表859;11 代表845。

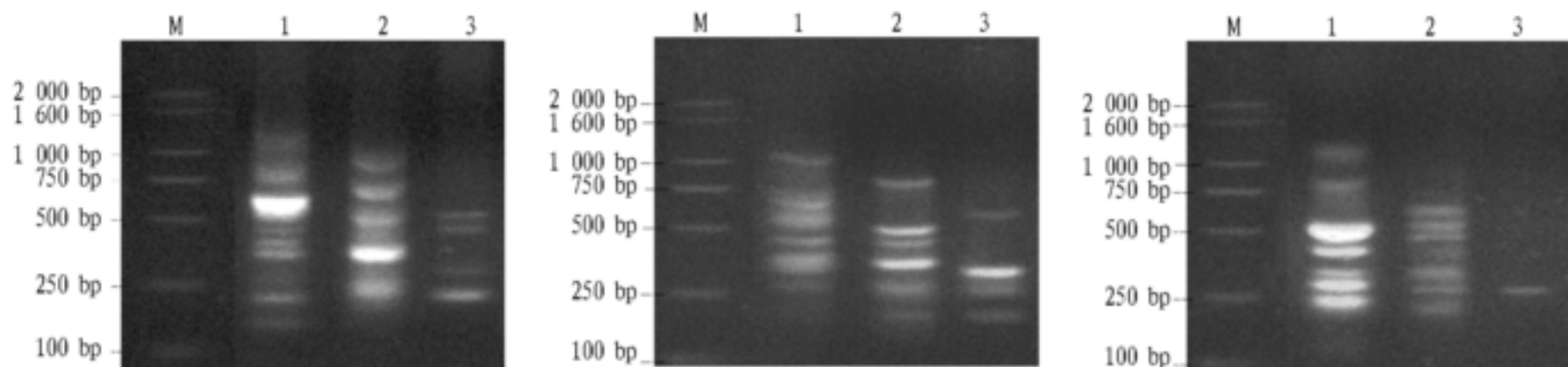
Note :1, Primer 876;2, Primer 862;3, Primer 808;4, Primer 826;5, Primer 864;6, Primer 853;7, Primer 860;8, Primer 879;9, Primer 851;10, Primer 859;11, Primer 845.

图5 扩增柚子的引物

Fig.5 The amplified primer of *C. grandis*

2.3 ISSR 反应体系的优化结果

2.3.1 不同退火温度对ISSR PCR 反应的影响。退火温度对ISSR PCR 扩增有明显的影晌。从图7可以看出,退火温度较低时(48),除主带外,还有杂带;当退火温度较高时,扩增条带减少(56~60);在退火温度为52时条带的稳定性和重复性较好,扩增效果较好,这与理论上的T_m值(52)相一致。因此,选取52为最佳退火温度。



注:1,2,3 分别为柚子、山油柑、藜欏

Note :1 - 3 stand for *C. grandis*, *A. pedunculata* and *Z. Aicennae* respectively.

图6 引物826(a)、827(b)、864(c) 扩增产物

Fig.6 The amplified products of pi ner 826(a), pi ner 827 and Pi ner 864(c)

表2 3 个有效ISSR 引物的扩增结果

Table 2 Amplified results of 3 effective ISSR pi ners

引物编号	扩增带数 条	多态性条带 条	多态性比率 %
No. of pi ners	Amplified bands	Polyorphic bands	Polyorphic ratio
826	14	13	92.9
827	12	11	91.7
864	10	9	90.0

后,循环不会使产物明显增加,反而引起非特异性扩增^[5-7]。该试验进行了30、35、40、45 个循环的尝试,发现30、40、45 个循环时产物不稳定,部分条带缺失且条带模糊,而35 个循环时条带丰富,较清晰稳定(图8)。因此,选取35 个循环为最佳循环次数。

3 结论与讨论

3.1 影响 PCR 结果的因素分析 ISSR 是 Zietkiewicz 等于1994 年提出的一种DNA 分子标记技术,兼有RAPD 操作简单和SSR 多态性好的优点,同时它的重复性和稳定性较高,成本较低^[11]。但由于ISSR 技术也是基于PCR 的一种分子标记技术,所以同其他分子标记一样,其结果容易受多种因素的干扰,如引物反应条件、模板DNA、Taq 酶、dNTPs、引物以及 Mg^{2+} 浓度等,因此在研究时都应先针对这些影响PCR 反应的因子建立起合适的反应体系^[12]。

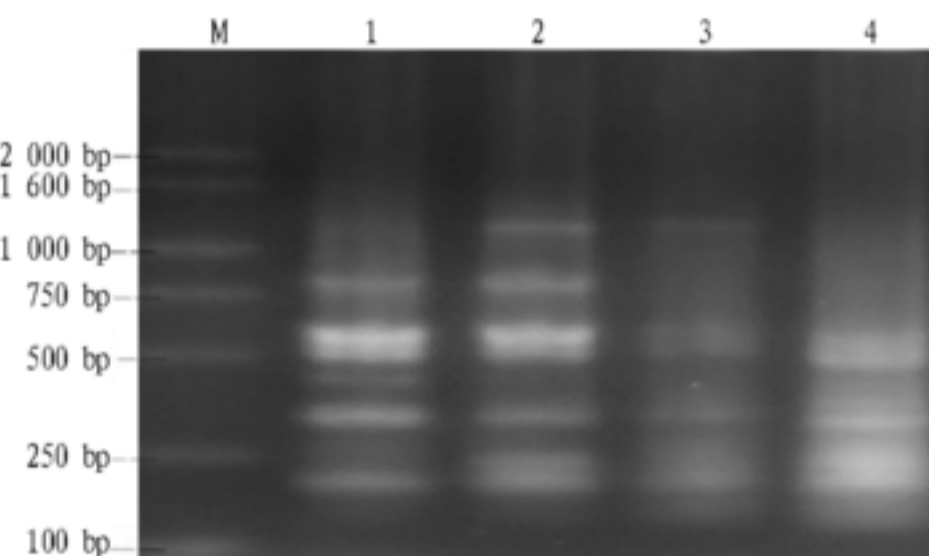
该研究对PCR 扩增的退火温度和循环次数进行了优化,确定最佳退火温度为52℃,这与理论上的 T_m 值(52℃)相一致;对循环次数进行了30、35、40、45 个循环的尝试,选取35 次循环为最佳循环次数。

3.2 ISSR 标记在芸香科植物分类鉴定中的应用 该试验对所采集的芸香科植物品种资源进行ISSR 分析,并建立ISSR 反应优化体系,用3 条引物总共扩增出36 条条带,其中33 条条带具有多态性,多态性比率为91.7%。这表明ISSR 标记能够有效地揭示材料间的多态性。该试验选取的材料较少,无法进一步研究芸香科其他植物材料的遗传多态性。相信,随着材料数的增加,能提供更多有效的信息。

参考文献

- [1] 黄成就. 中国芸香科植物资料[J]. 广西植物,1992(3):215-216.
- [2] 傅荣昭,邵鹏柱,高文远,等. DNA 分子标记技术及其在药用植物研究上的应用前景[J]. 生物工程进展,1998,18(4):14-18.
- [3] 马小军,汪小全,肖培根,等. 人参农家类型的 AFLP 指纹研究[J]. 中国中药杂志,2000,25(12):707-710.
- [4] 陈永久,王文,杨跃雄,等. 冬虫夏草的随机扩增多态DNA 及其遗传分化[J]. 遗传学报,1997,24(5):410-416.
- [5] 任冰如,贺善安,於红,等. 用RAPD 技术评估苍术居群间的亲缘关系[J]. 中草药,2000,31(6):458-461.
- [6] 黄璐琦,王敏,付桂芳,等. 中药白芷种质资源的RAPD 分析[J]. 中国中药杂志,1999,24(8):157-159.
- [7] 关萍,马丹炜,王贵侠,等. 利用ISSR 标记对天麻的贵州种群遗传多样性分析[J]. 北京林业大学学报,2007,29(6):35-40.
- [8] 周俊亚,唐绍清,向悟生. 栽培罗汉果遗传多样性的ISSR 分析[J]. 广西植物,2005,25(5):431-436.
- [9] 李巧明,赵建立. 云南干热河谷地区余甘子居群的遗传多样性研究[J]. 生物多样性,2007,15(1):84-91.

(下转第14512 页)

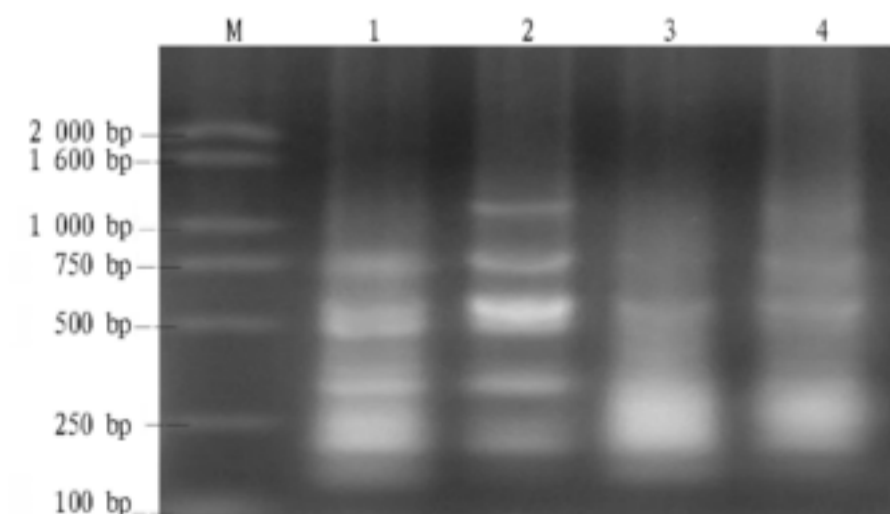


注:1~4 对应温度分别为48、52、56、60.0℃。

Note :The corresponding temperature of 1 - 4 are 48,52,56 and 60.0 resp.

图7 引物826 退火温度对柚子ISSR PCR 反应的影响

Fig.7 Effects of the annealing temperature of pi ner 826 on ISSR PCR reaction of *C. grandis*



注:1~4 对应循环次数分别为30、35、40、45。

Note :The cycle number of 1 - 4 are 30, 35, 40 and 45 resp.

图8 引物826 循环次数对柚子ISSR PCR 反应的影响

Fig.8 Effects of the cycle number of pi ner 826 on ISSR PCR reaction of *C. grandis*

2.3.2 循环次数对ISSR PCR 反应的影响。PCR 的循环次数决定产量,次数太少,产物量极低,次数太多,达到反应平台

表2 不同入棚时间不同品种的见花期出现时间

Table 2 The appearing time of the flowering period of different cultivars with different time of entering the shed

入棚时间	长寿冠	长寿乐	复色海棠	银长寿	世界一
Time of entering the shed	Changshouguan	Changshoule	Fusehitang	Yinchangshou	Shijieyi
第1批 The first batch	第52天	第28天	第40天	第42天	第87天
第2批 The second batch	第27天	第20天	第30天	第35天	第80天
第3批 The third batch	第25天	第17天	第25天	第25天	第72天

表3 不同入棚时间不同品种春节前开花量比较

Table 3 The flower amount comparison among different cultivars with different time of entering the shed before the Spring Festival

入棚时间	长寿冠	长寿乐	复色海棠	银长寿	世界一
Time of entering the shed	Changshouguan	Changshoule	Fusehitang	Yinchangshou	Shijieyi
第1批 The first batch	很少	较多	少	少	无
第2批 The second batch	多	多	多	多	无
第3批 The third batch	较多	多	多	多	无

表4 不同品种催花温度与入棚时间

Table 4 The flower forcing temperature and the time of entering the shed of different cultivars

品种	温度	催花时间	提前入棚时间 d
Cultivas	Temperature	Flower-forcing time	Advanced time of entering the shed
长寿冠	18~25	10月中旬	35
Changshouguan			
长寿乐	10~15	10月下旬	30左右
Changshoule			
复色海棠	18~15	10月下旬	15~20
Fusehitang			
银长寿	18~25	10月中旬	35
Yinchangshou			
世界一	18~25	10月中旬	35
Shijieyi			

2.2 不同品种的最佳催花技术 不同品种的催花温度与入棚时间及最佳催花时间见表4。温室内应经常保持空气湿润,空气湿度不能低于50%,故应经常喷水。应当注意的是,喷水时切不可直接喷于花蕾或花朵上,这样会使健康的花蕾或花朵很快枯萎。

2.3 冬季催花对木瓜海棠花色的影响(表5) 催花试验中发现,冬季经温室催花后,木瓜海棠颜色都有所变化,但无论哪个品种,经催花处理后其花色都更娇嫩,更具观赏价值。

2.4 生长调节剂对促进木瓜海棠开花的影响 试验结果经分析表明,生长调节剂对促进木瓜海棠开花的效果不明显。

表5 不同品种催花后花蕾/花色变化比较

Table 5 The flower bud and color changes comparison among different cultivars after forcing the flowering

条件	长寿冠	长寿乐	复色海棠	银长寿	世界一
Conditions	Changshouguan	Changshoule	Fusehitang	Yinchangshou	Shijieyi
自然条件	深红 鲜色	粉红 红色	粉红 红色	绿白 象牙白	粉红 红色
Natural conditions					
温室催化	红色 亮红	粉白色 黄红色	淡红 粉红	绿色 白色	绿白 象牙白
Forcing in greenhouse					

3 结论与讨论

由试验观察结果可知,催花不仅需一定的温度,每个品种还必须具备经过充分低温处理的条件。早开类需冷量少,所经低温处理时间短;中、晚开类需冷量多,所经低温处理时间也相应长。

木瓜海棠夏季即完成花芽分化,具备在春节提前开花的生理条件。木瓜海棠在入温室前必须在室外接受一定的低温处理才能充分打破休眠,提前开花。品种不同,需冷量多

少也不相同。木瓜海棠在经过充分的低温处理下,温度达到10~25 即能提前开花。在相同温度处理下,品种不同,其提前开花的时间也不同。影响木瓜海棠花期调控的诸多因素中温度是关键。在保持室内空气湿润的情况下,即可在家中,在春节期间,欣赏木瓜海棠娇艳的花姿。

参考文献

[1] 中国树木志编委会. 中国主要树种造林技术(下册)[M]. 北京: 农业出版社, 1978: 677.

通报, 2004, 21(3): 326-331.

[13] YU J F, BAO F, HAN X L, et al. Establishment and optimization of ISSR PCR system in *Tacli derms fasciatus heckel* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(5): 37-39, 95.

[14] 邱长玉, 高国庆, 陈伯伦, 等. 茉莉花ISSR PCR反应体系的建立[J]. *北方园艺*, 2008(2): 214-217.

(上接第14435页)

[10] 彭瑜, 王劲, 胡进耀, 等. 柚ISSR PCR反应体系的建立与优化[J]. *西华师范大学学报*, 2007, 28(3): 225-228.

[11] ZIEICWIEZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.

[12] 冯富娟, 王凤友, 刘彤. 红松ISSR PCR实验系统影响因素[J]. *植物学*