

刘玲,陈祥平,范小敏,等. 桑树 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):45-49,58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.010

桑树 SSR-PCR 反应体系的优化

刘玲¹,陈祥平¹,范小敏¹,傅晓²,柯皓天²,吕银²

(1. 四川省丝绸科学研究院,四川成都 610031; 2. 四川省丝绸工程技术研究中心,四川成都 610031)

摘要:为了建立经济稳定的桑树简单重复序列(SSR)-PCR 反应体系,为 SSR 分子标记在桑树研究中更广泛地应用提供试验基础,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计和单因素试验,对桑树 SSR-PCR 反应体系中的模板 DNA 浓度、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和 *rTaq* 酶用量 5 个因素的 4 个水平进行优化分析,并比较这 5 个因素的不同浓度对扩增效果的影响。结果表明,各因素水平变化对反应体系的影响大小依次为 Mg^{2+} 、dNTPs > 引物 > 模板 DNA > *rTaq* 酶。研究最终确立了最佳反应体系,即在 10 μ L 反应体系中,含有 1.5 μ L 10~20 ng/ μ L DNA 模板,0.4 μ L 25 mmol/L Mg^{2+} 、0.5 μ L 2 mmol/L dNTPs、各 0.15 μ L 20 μ mol/L 正反向引物,0.1 μ L 5 U/ μ L *rTaq* 酶和 1 μ L 10 \times loading buffer。通过稳定性检测,表明该体系能够用于桑树的 SSR 分析。

关键词:桑树;正交试验设计;单因素试验;SSR-PCR 反应体系优化

中图分类号:S888.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)14-0045-05

桑树是桑科(Moraceae)桑属(*Morus* L.)的多年生木本植物,是重要的经济植物,桑叶是家蚕的主要饲料。我国地域辽阔,生态环境各异,经过长期的自然选择和人工选育,形成了非常丰富的桑树种质资源。因此,研究桑树的遗传多样性及其亲缘关系对桑树的栽培育种、良种选育等有重要意义。

简单重复序列(simple sequence repeats,简称 SSR)DNA,又称微卫星 DNA(microsatellite DNA),是由 Moore 和 Terer 等于 1991 年提出的,它是以 1~6 bp 核苷酸为重复单位而多次串联重复组成的 DNA 序列。SSR 具有多态性高、试验操作简单、共显性等优点,被广泛应用于植物的分子连锁图谱构建、基因定位、品种遗传多样性和群体结构分析、纯度鉴定、杂种优势的预测等^[1]。

SSR 是一种基于 PCR 技术的分子标记,试验结果易受反应组分的影响,为了确保试验结果的准确性和重复性,建立和优化 SSR-PCR 反应体系是非常必要的。目前,应用 SSR 分子标记研究桑树种质资源遗传多样性等方面的报道较少,关于桑树 SSR-PCR 反应体系优化的研究仅见罗义维等报道的采用正交设计试验的优化过程^[2]。本研究参考已有的桑树 SSR 研究^[2-7],采用正交试验和单因素优化试验结合的方法,对桑树 SSR-PCR 反应体系中的模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs 和 *rTaq* 酶 5 个因素的 4 个水平进行优化分析,以期建立经济、实用、稳定的反应体系,为 SSR 分子标记在桑树研究中更广泛地应用提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2018-04-28

基金项目:四川省科技计划(编号:2017JY0277);四川省科技创新产业链项目(编号:2016NZ0004)。

作者简介:刘玲(1989—),女,山西大同人,硕士,助理工程师,主要从事桑树的分子标记工作。E-mail:liuling1022@yeah.net。

本试验材料采自四川省丝绸科学研究院桑树种质资源圃,详见表 1。选择桑树品种丰台作为体系优化用的 DNA 模板。引物序列参照 Aggarwal 等的研究^[8-10],由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详见表 2。PCR 反应所用的 Mg^{2+} 、dNTPs、*rTaq* 酶、DNA marker 和 10 \times loading buffer 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 桑树总 DNA 提取及质量检测 桑叶总 DNA 采用 2 种方法从用 0.15 g 硅胶干燥的桑叶中提取,一种是稍加改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[11],另一种是在用 4 \times CTAB 提取前,先用去糖缓冲液抽提。取 3 μ L 提取的 DNA 样品,在 1% 琼脂糖凝胶中电泳 20 min,电泳完毕后在 WFH-201B 紫外反射透射仪中观察 DNA 条带。利用 KAIAO K5500 微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度,之后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 PCR 扩增及产物的电泳检测 PCR 反应在 Thermal Cycler(上海山富科学仪器有限公司生产)上进行。PCR 反应体系总体积为 10 μ L,包括 Mg^{2+} 、dNTPs、*rTaq* 聚合酶、正反向引物、模板 DNA 和 10 \times loading buffer。PCR 反应程序参照赵卫国的报道^[12],采用降落 PCR:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,63 $^{\circ}$ C 退火 1 min,每个循环降低 0.5 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,16 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,24 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应结束后控制温度在 10 $^{\circ}$ C。

将扩增产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上检测。进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时,在 DYY-6C 型稳压稳流电泳仪上,于 200~220 V 预电泳 10~20 min。预电泳完毕,垂直平稳地拔出凝胶中的梳子,上样 10 μ L(3 μ L ddH₂O, 3 μ L 6 \times loading buffer,4 μ L PCR 产物),上样完毕后,在 120 V 电压下电泳,待溴酚蓝指示剂跑到下层琼脂糖封口处时停止电泳,用时大约为 1 h 40 min。采用银染法(1.0 g/L AgNO₃)染色,并在显色液(在 200 mL 蒸馏水中加 4 g NaOH、0.08 g Na₂CO₃ 和 0.8 mL 甲醛)中显色 3~5 min 至电泳条带

表 1 用于本研究的 10 份桑树材料

编号	材料名称	所属桑树品种	来源	类型	材料用途
1	丰台	白桑(<i>Morus alba</i>)	四川绵阳	选育品种	反应体系优化
2	嘉陵 16 号	鲁桑(<i>Morus multicaulis</i>)	西南大学	育成品种	稳定性检验
3	乐山花桑	白桑(<i>Morus alba</i>)	乐山	地方品种	稳定性检验
4	南一号	鲁桑(<i>Morus multicaulis</i>)	三台	地方品种	反应体系应用
5	荣经鸡桑	鸡桑(<i>Morus australis</i>)	荣经	野生种	反应体系应用
6	宁南鬼桑	鬼桑(<i>Morus mongolica</i> var. <i>diabolica</i>)	宁南	野生种	反应体系应用
7	荣经川桑	川桑(<i>M. notabilis</i>)	荣经	野生种	反应体系应用
8	充场桑	瑞穗桑(<i>Morus mizuho</i>)	南研所	育成品种	反应体系应用
9	石棉华桑	华桑(<i>Morus cathayana</i>)	石棉	野生种	反应体系应用
10	小冠桑	白桑(<i>Morus alba</i>)	合川	地方品种	反应体系应用

注:南研所指四川省农业科学院蚕业研究所。

表 2 用于本研究的 5 对引物

编号	引物名称	引物序列 (5'→3')	用途	GenBank 登录号
1	Mulstr-1	F:GCCGTGTACCACTGGAGTTTGCA;R:TGACCGTTTCTTCCACTTTACCTAATG	反应体系优化、 稳定性检验	AY326440
2	MulSTR5	F:CCCCCTGCAATGCCCTCTTTC;R:TGGGCGAGGCAGGGAAGATTC	稳定性检验	AY326444
3	MulSTR4	F:GGTCAAGCGCTCCAGAGAAAAG;R:GGTGCAGAGGATGAAAGATGAGGT	反应体系应用	AY326443
4	Mul3SSR197	F:GGTGAAAGTTTCGTGTGACTCC;R:TCAGCAACTAGACTGACTTTG	反应体系应用	JX465674
5	Mul3SSR184	F:CATTCTGCTGTCAGCCT;R:CAGATCGGCACCAATAGT	反应体系应用	JX258830

清晰可见,用数码相机拍照并保存图片。

1.2.3 SSR-PCR 反应体系的建立及优化 对于 PCR 反应体系中的 5 个因素(模板 DNA 浓度、引物浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度和 *rTaq* 酶用量),每个因素分别设置 4 个水平,详见表 3。

表 3 PCR 反应体系的因素和水平

水平	因素				
	模板 DNA 浓度 (ng/μL)	引物浓度 (μmol/L)	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	<i>rTaq</i> 酶用量 (U/μL)
1	1.0	0.20	1.0	0.10	0.05
2	1.5	0.30	1.5	0.15	0.10
3	2.0	0.40	2.0	0.20	0.15
4	2.5	0.50	2.5	0.25	0.20

1.2.3.1 正交试验 采用 L₁₆(4⁵) 正交设计,共 16 个反应体系(表 4)。除表 4 中的变化因素外,每管还含有 1 μL 10 × buffer,引物为 Mulstr-1,每个反应体系设 2 次重复。

1.2.3.2 单因素试验 根据正交试验确定的最佳反应体系,依次优化 Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、*rTaq* 酶用量和模板 DNA 浓度 5 个单因素,每个水平设 2 次重复。当其中 1 个因素水平变化时,体系中其他成分的水平保持不变。

1.2.4 退火温度的优化 以确定的最佳反应体系为基础,以提取的丰台 DNA 作为模板,对引物 Mulstr-1 的退火温度进行优化筛选,设定退火温度范围为(55 ± 63) °C,根据 PCR 仪自动生成的 12 个温度梯度进行 PCR 扩增,扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

1.2.5 最佳反应体系稳定性检测及应用 选择 2 个桑树材料嘉陵 16 号、乐山花桑,选择 2 对引物,对优化出的反应体系进行稳定性检测,每个样品、每对引物设 4 个重复。选择 4 对引物,用优化得到的反应体系,以 7 份桑树 DNA 为模板进行 SSR 扩增。

2 结果与分析

2.1 桑树基因组 DNA 的提取结果

如图 1 所示,采用 4 × CTAB 法提取桑树总 DNA 的结果显示,点样孔明亮,说明有糖类杂质,并且部分材料拖尾比较严重;而在加入提取液之前加入去糖缓冲液得到的 DNA,点样孔没有杂质污染,只有轻微拖尾,说明去糖缓冲液能够有效去除桑叶中的多糖等杂质,提取得到的 DNA 更纯,能够满足 SSR 试验要求。

2.2 SSR-PCR 优化反应体系的直观分析

由 SSR-PCR 正交试验结果(图 2)可以看出,16 个反应体系的扩增结果差异明显。第 1、6、14、15 组合存在非特异性扩增条带,且目的条带扩增不完全;第 2、9、11、16 组合的扩增结果不稳定,2 次重复扩增出的条带不一致,且有非特异性扩增条带;第 5 组合条带清晰,但是目的条带扩增不完全;第 4、7、8、10、12、13 组合的目的条带扩增完全,但是第 8、12 组合的背景较深,第 10、13 组合 2 个重复中 1 个重复的目的条带

表 4 桑树 SSR-PCR 反应的正交试验设计[$L_{16}(4^5)$]

组合编号	模板 DNA 浓度 (ng/ μ L)	引物浓度 (μ mol/L)	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	rTaq 酶用量 (U/ μ L)
1	1.0	0.20	1.0	0.10	0.05
2	1.0	0.30	1.5	0.15	0.10
3	1.0	0.40	2.0	0.20	0.15
4	1.0	0.50	2.5	0.25	0.20
5	1.5	0.20	1.5	0.20	0.20
6	1.5	0.30	1.0	0.25	0.15
7	1.5	0.40	2.5	0.10	0.10
8	1.5	0.50	2.0	0.15	0.05
9	2.0	0.20	2.0	0.25	0.10
10	2.0	0.30	2.5	0.20	0.05
11	2.0	0.40	1.0	0.15	0.20
12	2.0	0.50	1.5	0.10	0.15
13	2.5	0.20	2.5	0.15	0.15
14	2.5	0.30	2.0	0.10	0.20
15	2.5	0.40	1.5	0.25	0.05
16	2.5	0.50	1.0	0.20	0.10

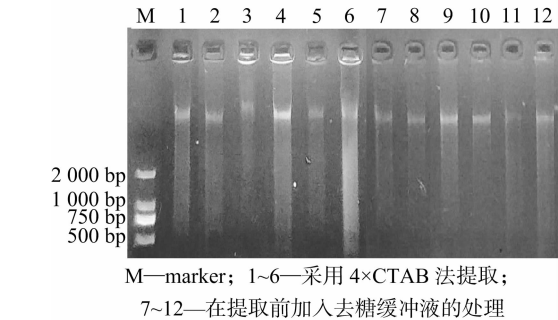


图1 琼脂糖凝胶电泳检测 2 种方法提取的 DNA 结果

较浅;第 4、7 组合的目的条带扩增完全、清晰、重复性好。综合每组的 2 个重复,以及从经济节约的角度考虑,选择第 7 组合为最优体系,即 10 μ L 反应体系中,含有 1.5 μ L 10 ~ 20 ng/ μ L DNA 模板,各 0.20 μ L 20 μ mol/L 正反向引物,

1.0 μ L 25 mmol/L Mg²⁺, 0.5 μ L 2 mmol/L dNTPs, 0.20 μ L 5 U/ μ L rTaq 酶和 1 μ L 10 × loading buffer,用 ddH₂O 补至 10 μ L。

为了进一步证明对试验结果初步判断的准确性,根据李志勇等的方法^[13]对正交设计试验中的各组分浓度组合进行分析,结果见表 5,其中 k 值代表某因子在某水平下参与反应所产生的扩增条带数的平均值。在本研究中,5 个因素在设定的 4 个水平下对结果的影响由大到小依次为 Mg²⁺、dNTPs 浓度 > 引物浓度 > 模板 DNA 浓度 > rTaq 酶用量。

k 值反映了影响因素各水平对反应体系的影响情况, k 值越大,反应水平越好。模板 DNA 浓度以 1 水平最好,引物浓度以 4 水平最好,Mg²⁺ 浓度以 3 水平最好,dNTPs 浓度以 1、2 水平最好,rTaq 酶用量以 3、4 水平最好。因此可见,桑树 SSR-PCR 的最佳反应体系为 1 ng/ μ L 模板 DNA + 0.5 μ mol/L 引物 + 2 mmol/L Mg²⁺ + 0.10 或 0.15 mmol/L

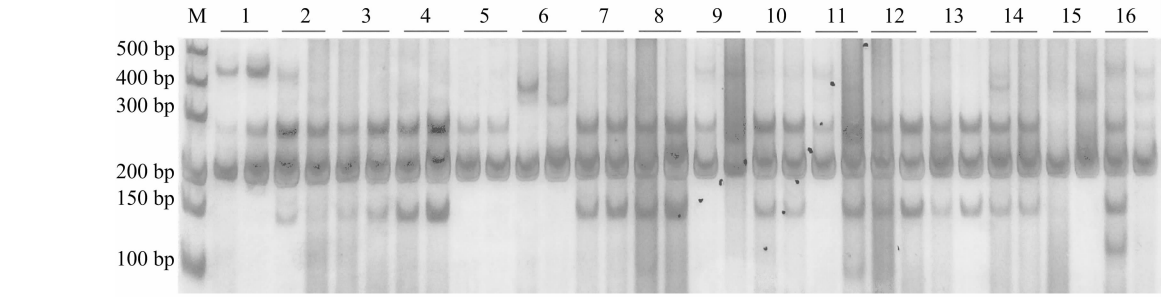


图2 正交设计 SSR-PCR 反应体系扩增(非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测)结果(引物为 Mulstr-1)

表 5 桑树 SSR-PCR 反应正交试验的各处理统计分析结果

项目	扩增条带数(条)				
	模板 DNA 浓度	引物浓度	Mg ²⁺ 浓度	dNTPs 浓度	rTaq 酶用量
k_1	4.875	4.000	4.250	5.125	5.000
k_2	3.875	4.375	3.875	5.125	4.500
k_3	4.750	4.750	5.125	4.125	4.375
k_4	4.750	5.125	5.000	3.875	4.375
R 值	1.000	1.125	1.250	1.250	0.625

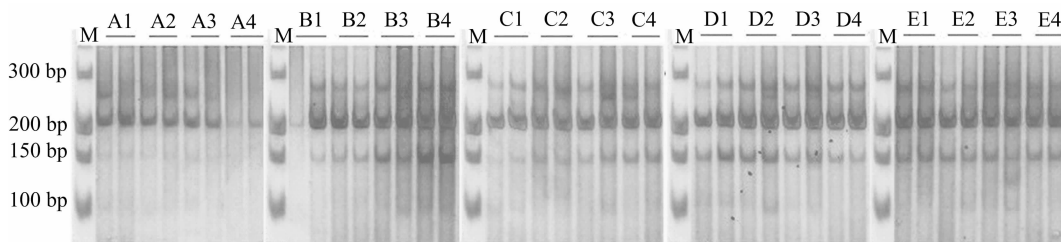
dNTPs + 0.15 或 0.2 U/ μ L *rTaq* 酶。综合分析第 4、7、8、12 组合试验设计中每个因素的水平 and 实际扩增效果,认为第 8 组合每个因素的水平与理论值最接近,因此,分别以第 7、8 组合反应体系为基础进行单因素优化试验。

2.3 单因素优化的结果分析

以第 8 组合为基础进行单因素优化试验,结果显示,电泳图背景深,主带不明显,无法读带(图略)。说明理论得出的最佳体系的效果需要进一步检验优化,同时也反映理论与实际存在一定的差距。

以第 7 组合为基础,进行单因素优化。如图 3 所示,当模板 DNA 浓度为 2.5 ng/ μ L 时,目的条带扩增不完全;当模板 DNA 浓度为 1.0、2.0 ng/ μ L 时,2 个重复的扩增结果不稳定。综合 4 种浓度的电泳结果,选择 1.5 ng/ μ L 作为模板 DNA 的

最佳浓度。当引物浓度为 0.2、0.4 μ mol/L 时,扩增结果不稳定;当引物浓度为 0.5 μ mol/L 时,电泳背景较深;当引物浓度为 0.3 μ mol/L 时,有清晰的目的条带。因此,确定引物的最佳浓度为 0.3 μ mol/L。当 Mg^{2+} 浓度大于 1.5 mmol/L 时,扩增不稳定;当 Mg^{2+} 浓度为 1.0、1.5 mmol/L 时,都能扩增出明显的条带;但当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时的背景较深,所以选择 1.0 mmol/L 为 Mg^{2+} 的最佳浓度。当 dNTPs 浓度为 0.15、0.20 mmol/L 时,条带扩增不稳定;当 dNTPs 浓度为 0.10、0.25 mmol/L 时,都有清晰的目的条带。从经济节约角度考虑,选择 0.1 mmol/L 为 dNTPs 的最佳浓度。当 *rTaq* 酶用量为 0.15、0.2 U/ μ L 时,存在非特异性扩增;当 *rTaq* 酶用量为 0.05 U/ μ L 时,目的条带清晰且重复性好,因此确定 *rTaq* 酶的最佳用量为 0.05 U/ μ L。



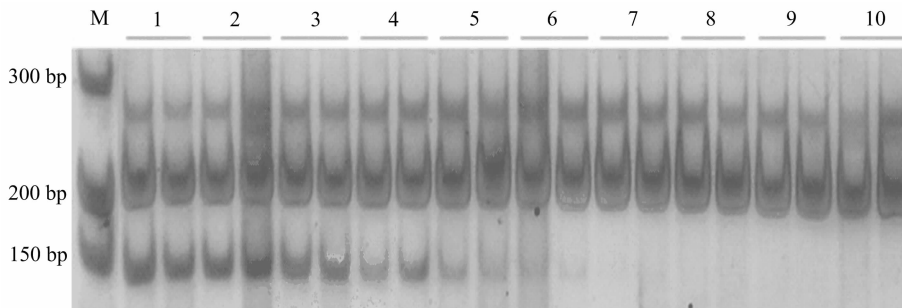
M—marker; A、B、C、D、E—模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs 和 *rTaq* 酶。A1~A4—模板 DNA 的浓度依次为 1.0、1.5、2.0、2.5 ng/ μ L; B1~B4—引物浓度依次为 0.2、0.3、0.4、0.5 μ mol/L; C1~C4— Mg^{2+} 浓度依次为 1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L; D1~D4—dNTPs 浓度依次为 0.10、0.15、0.20、0.25 mmol/L; E1~E4—*rTaq* 酶浓度依次为 0.05、0.10、0.15、0.20 U/ μ L

图3 单因素优化结果

以上结果表明,正交设计能够考虑各因素间的交互作用,单因素试验可以对反应体系中每个因素的不同水平进行直观分析^[14]。与正交试验相比,在单因素试验中,除了模板 DNA 浓度、dNTPs 浓度相同外,引物浓度、 Mg^{2+} 浓度和酶用量都有所降低。综合 2 种试验结果,确定在 10 μ L 桑树 SSR-PCR 反应体系中,5 个因素分别为 1.5 ng/ μ L 模板 DNA,各 0.3 μ mol/L 正、反向引物,1.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.1 mmol/L dNTPs, 0.05 U/ μ L *rTaq* 酶。

2.4 最适退火温度的确定

如图 4 所示,在不同退火温度下,扩增效果存在差异。退火温度为 55.0、56.6、57.5 $^{\circ}$ C 时,都能扩增出目的条带;退火温度为 55.8 $^{\circ}$ C 时,2 个重复出现扩增不稳定的情况;退火温度高于 58.5 $^{\circ}$ C 时,扩增的条带数减少,PCR 产物量较低。从主带清晰度及背景深浅来考虑,引物 Mulstr-1 的退火温度选择 56.6 $^{\circ}$ C 为宜。因此,引物 Mulstr-1 优化后的 PCR 反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,56.6 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,37 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,反应结束后保存在 10 $^{\circ}$ C。



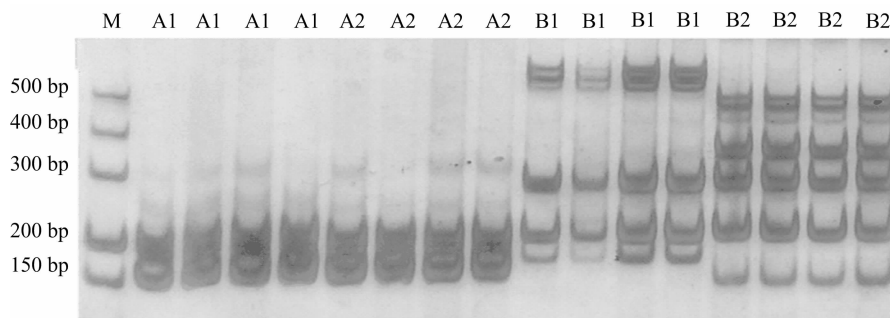
M—marker; 1~10—退火温度依次为 55.0、55.8、56.6、57.5、58.5、59.4、60.4、61.4、62.2、63.0 $^{\circ}$ C

图4 退火温度优化的电泳检测结果

2.5 最佳反应体系的稳定性检验及其应用

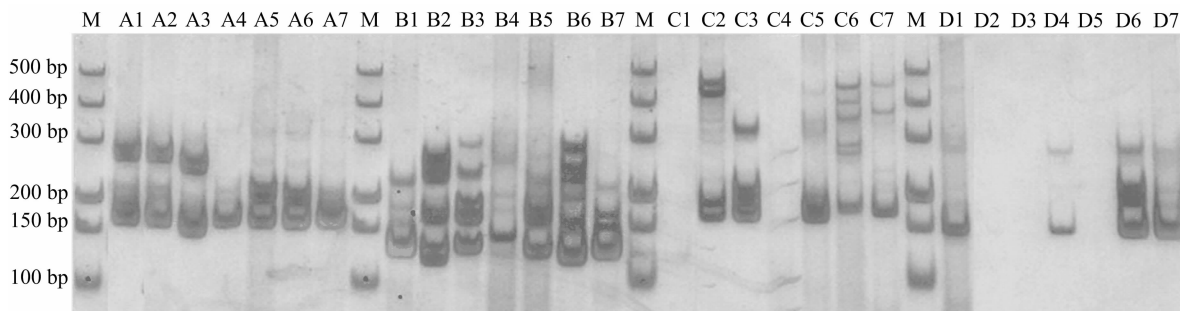
用 2 个桑树材料嘉陵 16 号、乐山花桑,选择 MulSTR5、Mulstr-1 这 2 对引物,对优化出的反应体系进行稳定性检验,每个样品、每对引物设 4 次重复。由图 5 可以看出,2 个样品的 4 次重复都能够稳定地扩增出明显的条带,说明该优化体系稳定可靠。

采用 MulSTR5、MulSTR4、Mul3SSR197 和 Mul3SSR183 这 4 对引物,利用优化后的 SSR-PCR 反应体系,对 7 份桑树种质进行扩增。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果显示,这 4 对引物都获得了清晰的条带(图 6),表明该反应体系的特异性、可重复操作性和稳定性较好。



M—marker; A、B—引物 MulSTR5、Mulstr-I; 1、2—桑树材料嘉陵16号、乐山花桑

图5 最佳反应体系的稳定性检验结果



M—marker; A、B、C、D—引物 MulSTR5、引物 MulSTR4、引物 Mul3SSR197、引物 Mul3SSR183;

1~7—南一号、荣经鸡桑、宁南鬼桑、荣经川桑、充场桑、石棉华桑和小冠桑等7个桑树样品

图6 4对引物对7份桑树种质的扩增结果

3 讨论与结论

桑树是我国重要的经济作物,优化并建立适合桑树的 SSR-PCR 反应体系,是 SSR 标记在桑树中应用的重要基础。目前对 SSR-PCR 体系优化的方法有单因素设计和正交设计等。正交设计能够分析因素间的交互作用,但是由于其试验体系较小,受到的试验操作误差较大,而且也不能顾及个别因素的影响,而单因素试验正好能够弥补正交试验的不足^[15]。本研究通过综合考虑正交试验和单因素优化试验的方法,对 PCR 反应中的 5 个因素进行优化,得到桑树 SSR-PCR 最优反应体系,即 10 μL 反应体系中,含有 1.5 μL 10~20 ng/ μL 模板 DNA,0.4 μL 25 mmol/L Mg^{2+} ,0.5 μL 2 mmol/L dNTPs,各 0.15 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物,0.1 μL 5 U/ μL *rTaq* 酶和 1 μL 10 \times loading buffer。通过稳定性检验,证明该反应体系稳定、可靠,为今后 SSR 在桑树领域更广泛的应用提供了相应支持。

PCR 反应体系中各组分的浓度会对扩增效果产生影响。 Mg^{2+} 浓度过低时,会降低 DNA 聚合酶的活性; Mg^{2+} 浓度过高时,会降低扩增的特异性。dNTPs 浓度过低时,产物条带模糊不清;dNTPs 浓度过高时,会出现非特异性扩增。引物用量过少时,产物量过低;用量过多时,会产生非特异性产物和引物二聚体。DNA 聚合酶的用量直接决定 PCR 反应的结果,用量过高时,容易产生非特异性扩增产物;用量过低时,则会导致目的条带合成量减少。模板 DNA 浓度也会影响扩增效果,在彭波等的研究中,模板浓度达到了 2.5 ng/ μL ^[3-4],而本试验结果表明,模板 DNA 的量并非越大,扩增效果越好,在设定的 4 个浓度中,前 2 个浓度 1.0、1.5 ng/ μL 的扩增效果较后 2

个浓度的好。罗义维等的研究表明,模板 DNA 的浓度与本研究结果相当,可见适当降低模板的浓度能得到相对清晰的条带^[2,6]。在本研究得到的最佳反应体系中,每个因素的浓度与罗义维等的研究结果^[2]相比,除了模板 DNA 的浓度差异不大外,其余 4 个因素的浓度均低于后者,出现这种现象的原因可能是研究方法、目的、试验材料、引物、技术要求不同造成的。

除了以上 5 种因素会影响 PCR 扩增效果外,引物退火温度也是 1 个关键因素。退火温度过高时,模板与引物退火反应缓慢而不准确;退火温度过低时,则会产生引物二聚体和杂带^[16]。不同引物的退火温度需要摸索才能确定,本研究只优化筛选了引物 Mulstr-1 的退火温度,为 56.6 $^{\circ}\text{C}$ 。当采用多个引物同时扩增时,反应程序可采用降落 PCR 方法。降落 PCR 能够有效避免或有效降低由反应体系内主要组分浓度过高或过低、引物序列较短、退火温度过高或过低、模板 DNA 复杂等因素引起的非特异性产物的产生^[17],并且省去了摸索引物退火温度的繁琐步骤,从而大大缩短了试验时间。

综上所述,在 SSR-PCR 扩增中,应综合考虑各反应组分的浓度和引物退火温度,才能得到有效的扩增条带,从而增强结果的真实性。

参考文献:

- [1] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:131-143.
- [2] 罗义维,亓希武,帅琴,等. 桑树杂交组合亲本的 SSR 标记多态性及遗传背景分析[J]. 蚕业科学,2014,40(4):576-581.

殖诱导率整体呈下降趋势,芽增殖系数呈先增大后减小趋势,NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,芽增殖诱导率、芽增殖系数相对最大,分别为 93.75%、3.38;当 TDZ 浓度为 2.0 mg/L 时,随 NAA 浓度的增加,芽增殖诱导率基本无变化,芽增殖系数逐渐增大,NAA 浓度为 1.0 mg/L 时芽增殖诱导率、芽增殖系数相对最大,分别为 87.50%、3.25。

综上可见,TDZ 浓度为 0.1 mg/L、NAA 浓度为 0.5 mg/L 配合使用时,珊瑚姜芽的增殖诱导率相对最好,芽增殖系数也相对最大,分别为 100.00%、5.47,可作为珊瑚姜芽增殖培养基中最佳的生长调节剂组合,其次为 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,珊瑚姜芽的增殖诱导率、芽增殖系数可分别达到 100.00%、4.47。

3 结论与讨论

植物生长调节剂是组培快繁的重要影响因子,不同种类的植物生长调节剂对外植体生长分化的作用效果不同,同种植物生长调节剂不同浓度的作用效果也存在差异,因此,不同植物生长调节剂的合适配比是外植体快速繁殖体系建立的关键。在植物不定芽的诱导增殖研究中,添加的生长调节剂主要为 6-BA、NAA、TDZ 等,TDZ 具有很强的分裂素活性,6-BA 是性价比比较高的细胞分裂素,热稳定性较好。细胞分裂素的生理作用主要是引起细胞分裂、分化,以及诱导芽的形成,促进芽的生长^[4-5]。

有研究发现,生长素在低浓度时可促进生长,浓度高时则抑制生长,如果浓度更高则会使植物受伤^[6-7];在芽诱导增殖过程中,高浓度 TDZ 会使外植体褐化死亡率提高^[8-10]。本研究结果表明,光果姜适宜的生长调节剂组合为 6-BA 5.0 mg/L + TDZ 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L,相应丛生芽增殖系数相对最大,为 3.44,芽增殖时期在 20 d 左右,平均每株新生幼苗株高为 1.53 cm,新叶展开数为 1.80 张,珊瑚姜增殖诱导的最佳生长调节剂组合为 TDZ 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L,相应芽增殖系数为 5.47,较佳组合为 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,芽增殖系数为 4.47,合适的 6-BA、TDZ 浓度可有

利于促进芽增殖诱导,加入一定浓度的 NAA 能进一步提高其增殖系数,与戴水莲等的研究结果^[11]一致,这可能与 NAA 促进芽的生长和生根,有利于充分吸收培养基中的营养物质有关^[12];如继续提高 6-BA、TDZ 浓度反而会使芽增殖诱导率降低,高浓度细胞分裂素反而会抑制芽的增殖诱导。

参考文献:

- [1] 王 俊. 三种姜科花卉离体快繁体系的建立[D]. 广州:仲恺农业工程学院,2017.
 - [2] 路国辉,王英强. 姜科植物花卉应用现状及开发前景[J]. 北方园艺,2011(10):82-86.
 - [3] 李 芳. 生姜组织培养快速繁殖及移栽技术的研究[J]. 辽宁农业职业技术学院学报,2016,18(2):13-14,20.
 - [4] 侯 俊,王彩云,张翔宇,等. 驼峰藤组织培养及快速繁殖[J]. 湖北农业科学,2017,56(17):3345-3348.
 - [5] 金美芳,曹 智,蔡俊杰,等. 红花草莓的组织培养与快繁技术研究[J]. 广西植物,2017,37(11):1395-1405.
 - [6] 林碧英,魏郑珍,陈燕华. 生姜茎尖组织培养和快速繁殖研究[J]. 亚热带植物科学,2002,31(4):13-16.
 - [7] 彭 琼,荆风雪,周小毛,等. 四倍体稗草的组织培养与快速繁殖[J]. 激光生物学报,2017,26(5):475-480.
 - [8] 张月婷,桂大萍,叶小文,等. TDZ 在花生离体扩繁中的应用研究[J]. 江苏农业科学,2011(1):65-68.
 - [9] Archana C P, Geetha S P, Indira B. Effect of ammonium nitrate and photoperiod on *in vitro* microrhizome induction in three high yielding cultivars of *Curcuma longa* L. and their comparative phytochemical analysis [J]. Asian Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2015, 5(1):45-49.
 - [10] 吴 凡,赵蓓蓓,王 浩,等. 植物生长调节剂对紫霞黄栌组织培养的影响[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(15):2942-2946,2958.
 - [11] 戴水莲,谢绍辉,李 涛. 生姜芽的组培快繁[J]. 安徽农业科学,2008,36(28):12112-12113.
 - [12] 刘 果,陈少雄,高丽琼,等. 两种优良巴西杂交桉树的组织培养和快速繁殖[J]. 桉树科技,2017,34(4):10-16.
- (上接第 49 页)
- [3] 彭 波,胡兴明,邓 文,等. SSR 标记与桑树发芽率、节间距性状的相关性研究[J]. 蚕业科学,2010,36(2):201-208.
 - [4] 彭 波,胡兴明,邓 文,等. 桑树种质资源 SSR 标记的遗传多样性分析[J]. 湖北农业科学,2010,49(4):779-784.
 - [5] 高丽霞. 桑树 EST-SSR 引物开发[J]. 南方农业学报,2013,44(8):1254-1257.
 - [6] 楚 渠,彭云武. 利用 SSR 标记对陕西地方桑树品种的遗传多样性分析[J]. 陕西农业科学,2015,61(6):17-20.
 - [7] 楚 渠,孟 刚. 桑树 SSR 引物的开发及其多态性分析[J]. 湖北农业科学,2016(11):2824-2828,2884.
 - [8] Aggarwal R K, Udaykumar D, Hendre P S, et al. Isolation and characterization of six novel microsatellite markers for mulberry (*Morus indica*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3):477-479.
 - [9] Zhao W G, Mia X X, Jia S H, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. [J]. Plant Science, 2005, 168(2):519-525.
 - [10] Mathithumilan B, Kadam N N, Biradar J, et al. Development and characterization of microsatellite markers for *Morus* spp. and assessment of their transferability to other closely related species [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1):194.
 - [11] Weising K H, Wolff K, Meyer W. DNA fingerprinting in plants and fungi [M]. Boca Raton: CRC Press, 1995:50-54.
 - [12] 赵卫国. 桑种质资源的遗传多样性及分子系统学研究[D]. 北京:中国农业科学院,2005:28.
 - [13] 李志勇,李鸿雁,孙启忠,等. 正交设计优化扁蓐豆 ISSR 反应体系的研究[J]. 华北农学报,2010,25(6):97-103.
 - [14] 郭 敏,李 毅,马彦军. 山生柳 SSR-PCR 反应体系优化[J]. 草业科学,2012,29(5):741-747.
 - [15] 胡小利,马 庆,包海柱,等. 食用向日葵 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 华北农学报,2015,30(2):161-165.
 - [16] 张 龙,丁西朋,严琳玲,等. 8 种柱花草属牧草 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 草业科学,2014,31(2):232-242.
 - [17] 杨绍林,王先宏,李苏洁,等. 应用降落 PCR 和正交设计优化甘蔗“割手密”SSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种,2016(2):431-436.