

李会云,程孟雪,李勇慧,等.牡丹的基因组 DNA 提取与 ISSR 引物筛选[J].江苏农业科学,2021,49(15):58-63.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.15.010

牡丹的基因组 DNA 提取与 ISSR 引物筛选

李会云,程孟雪,李勇慧,刘忠艳

(洛阳师范学院生命科学院,河南洛阳 471000)

摘要:为了研究牡丹种质资源的遗传多样性和 DNA 鉴定,采用 ISSR 标记的方法来进行试验,即采用改良的 CTAB 法从成熟干燥的牡丹叶片中提取基因组 DNA,其质量检测采用琼脂糖凝胶电泳法和超微量分光光度计法,用优化的 ISSR-PCR 反应系统,对加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia,UBC)公布的 220 条 ISSR 引物进行筛选。结果表明,从 6 个牡丹品种的叶片中提取的 DNA 浓度范围在 $30 \times 10^{-3} \sim 100 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之间, DNA 样品纯度 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值在 1.7~1.9 之间;从 220 条 ISSR 引物中筛选出了 12 条适合牡丹的扩增结果好的引物,选出的引物扩增条带清晰、多态性高、重复性好。说明提取的 DNA 质量较好,该改良的 CTAB 法适用于从蛋白质和酚类物质含量较高的植物材料中提取基因组 DNA;筛选出的 12 条 ISSR 引物为进一步研究牡丹资源的遗传多样性奠定了基础。

关键词:牡丹;DNA 提取;ISSR 引物筛选;PCR 扩增;改良的 CTAB 法

中图分类号:S685.110.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)15-0058-06

牡丹(*Paeonia suffruticosa*),是芍药科芍药属多年生落叶灌木^[1],是一种传统中国花卉,也是世界著名花卉,姿态万千、色彩丰富,不但在园林和花卉文化中占有重要地位,深受中国人民喜爱,而且在对外传播和交流时受到世界人民喜爱。同时,牡丹也是一种重要的花卉植物和资源植物,其药用、文化和观赏历史已约有 2 000 余年。中国牡丹主要分布在洛阳、兰州、彭州、菏泽、延安、铜陵等地。据调查,不同产地的牡丹共计约有 1 500 个品种^[2-4]。

近年来,RAPD、SSR、ISSR、AFLP 和 SRAP 等分子标记已广泛用于牡丹的遗传多样性分析、核心种质构建、种质资源分类鉴定等方面^[5]。ISSR(inter-simple sequence repeat)标记是由 Zietkiewicz 等开发的分子标记^[6]。SSR(simple sequence repeat)广泛分布在真核植物基因组中,由 1~6 个碱基对组成,其两端序列通常是相对保守的单拷贝序列,因此,可以设计特异的寡核苷酸引物进行 SSR-PCR,根据串联重复序列的数量,通过扩增串联重复序列揭示了 SSR 的长度多态性^[7]。ISSR 是基于 SSR 发展起来的一种新型分子标记技术,它根据基因组内广泛存在的微卫星序列设计单一引物,扩增出 DNA 序

列在 SSR 之间的反向排列,然后对扩增产物进行电泳、染色,根据条带的存在及相对位置来分析不同样品间 ISSR 标记的多态性^[8-9]。ISSR 标记方法由于其高效性、重复性好、操作简单等特点,被广泛应用于种质资源鉴定、遗传多样性分析、杂种后代快速鉴定等领域^[10]。目前,ISSR 标记已经用于湖南、云南香格里拉、福建、四川^[11-14]牡丹的遗传多样性分析,然而,ISSR 标记尚未用于分析洛阳牡丹的遗传多样性。本试验采用优化的 ISSR-PCR 反应体系筛选 ISSR 引物,选出 12 条引物,为研究洛阳牡丹的遗传多样性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验植物材料采自洛阳市牡丹研究院,共有 6 个牡丹品种:鹤顶红、文培紫、海棠争润、银粉金鳞、似荷莲、锦袍江,对这 6 个牡丹品种从 1~6 依次进行编号,干燥处理后保存于自封袋备用。本试验于 2019 年在洛阳师范学院生命科学院生科楼 406 和 509 实验室实施。

1.2 主要仪器设备

YXQ-SC46-280S 型手提式压力蒸汽灭菌器(施都凯仪器设备有限公司);101-1AB 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);SCIENTZ-48 型高通量组织研磨机(宁波新芝生物科技股份有限公司);JA2003A 型电子天平(上海精天电子仪器有

收稿日期:2020-12-21

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:192102110035)。

作者简介:李会云(1982—),女,河南安阳人,博士,讲师,从事植物生理及分子生物学的教学与科研工作。E-mail:30226972@qq.com。

限公司);LX-200 迷你型离心机(海门市其林贝尔仪器);TGL-16B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂制造);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);ChampChemi 610 Plus 型全自动多色荧光及化学发光凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司);THZ-82A 数显恒温振荡器(常州朗越仪器制造有限公司);SEDIG 型梯度 PCR 仪;Eppendorf AG 型 PCR 仪;K5500 Plus 型超微量分光光度计。

1.3 主要试剂

CTAB、EDTA,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Tris-HCl(pH 值=8.0)、三氯甲烷、异戊醇、乙酸钠、冰乙醇、 β -巯基乙醇、GoldView I 型核酸染色剂、 $10\times$ DNA loading buffer,均购自北京索莱宝科技有限公司; $2\times$ Taq MasterMix 混合液(康为, CW0690M)。

1.4 试验方法

1.4.1 牡丹 DNA 的提取 根据改良的 CTAB 磁珠法^[15]提取牡丹基因组 DNA。取少量干燥叶片于 2 mL 的研磨管中,并放入直径 3 mm 的钢珠,再将研磨管放进组织研磨机中进行研磨,60 s 后取出。加入 1 000 μ L 2% CTAB 溶液和 8 μ L β -羟基乙醇,放入水浴锅中 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,每 10 min 倒置 1 次以混均匀。水浴锅中取出后,加入 500 μ L CI(三氯甲烷:异戊醇=24:1),摇床 10 min(强度约 160 r/min 左右)。然后在室温下 1 200 r/min 离心 10 min,取上清液 650 μ L(视具体情况而定)于 1.5 mL 离心管中(弃去有机相)。再加入 500 μ L CI 于 1.5 mL 的离心管中,摇床摇 10 min。然后在室温下 1 200 r/min 离心 10 min,取上清液 500 μ L(视情况而定)于 1.5 mL 离心管中(吸取时小心仔细)。加入 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠和 2 倍体积冰乙醇(体积与吸取的上清液相比)低温静置 24 h(-20°C)。保留白色球状物,倒去溶液(可先离心)。加入 500 μ L 75% 乙醇清洗 2 次,倒去溶液(根据情况离心,尽量第 1 次不离心,第 2 次离心。1 200 r/min 离心 2~3 min)。将离心管倒扣在吸水纸或卫生纸上,约 5~10 min,常温下干燥 DNA,之后再开盖放在烘干机中,50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 20 min 左右。加入适量无菌水(50~100 μ L)溶解 DNA。

1.4.2 DNA 浓度测定 通过超微量分光光度计测定 DNA 的浓度,通过测定 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比确定 DNA 的纯度和完整程度。最后将适用牡丹 DNA 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.4.3 PCR 扩增反应 牡丹 PCR 反应体系见表 1(DNA 模板是从 35 种牡丹中随机选取的 6 个牡丹基因组 DNA)。PCR 扩增程序见表 2。

表 1 PCR 反应体系

组分	加样体积(μL)
$2\times$ PCR Mixture	7.50
引物	0.75
DNA 模板	1.25
H_2O	5.50
共计	15

表 2 PCR 扩增程序

步骤	温度($^{\circ}\text{C}$)	扩增时间	循环数
预变性	94	3 min	1
变性	94	30 s	36
退火	50/55	30 s	36
延伸	72	1.5 min	36
延伸	72	10 min	1

1.4.4 琼脂糖凝胶电泳 在锥形瓶中称取 0.3 g 的琼脂糖,加入 30 mL $1\times$ TAE 缓冲液,配制成溶液,加热混匀,向溶液中加入 2 μ L GoldView I 型核酸染色剂,混合,倒入模具中(注意不能有气泡,否则会影响跑胶结果),冷却 10 min。等琼脂糖胶凝固后,将梳子垂直拔出。在电泳槽内加入 $1\times$ TAE 缓冲液,将配好的胶放入电泳槽中,准备点样。从冰箱拿出扩增好的产物,第 1 个孔内加入 1 μ L $10\times$ Loading buffer 和 4 μ L Marker,之后每个孔内加入 5 μ L 扩增好的产物。按照顺序依次迅速精准点样,以防止样品扩散,导致跑胶条带不清晰。加样完毕后,设置电压为 120~130 V,电流为 110 mA,电泳时间 30~45 min。电泳结束后,轻轻取出凝胶并放入凝胶成像系统中观察成像结果。

1.4.5 引物筛选及退火温度的确定 本试验根据已优化的 ISSR-PCR 反应体系,用鹤顶红、文培紫、海棠争润、银粉金鳞、似荷莲、锦袍江 6 个牡丹 DNA 样品,对 UBC 公布的 220 条 ISSR 引物(表 3)进行初筛和复筛,使用温度梯度模式选择合适的退火温度。温度设定为 45、50、55、59 $^{\circ}\text{C}$ 4 个温度梯度。

1.4.6 数据处理 各个 DNA 样品的浓度和 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值采用 K5500 Plus 型超微量分光光度计进行测定,各组引物的 ISSR-PCR 扩增图通过 Microsoft PowerPoint 2013 和 Adobe Photoshop CS5 软件进行制作。

表 3 ISSR 引物序列

引物编号	序列 (5'→3')	引物编号	序列 (5'→3')
ISSR - 1	ATATATATATATATATT	ISSR - 76	GTGTGTGTGTGTGTGTTA
ISSR - 2	ATATATATATATATATG	ISSR - 77	GTGTGTGTGTGTGTGTGA
ISSR - 3	ATATATATATATATATC	ISSR - 78	GTGTGTGTGTGTGTGTCA
ISSR - 4	TATATATATATATATAA	ISSR - 79	GTGTGTGTGTGTGTGTTC
ISSR - 5	TATATATATATATATAC	ISSR - 80	GTGTGTGTGTGTGTGTGC
ISSR - 6	TATATATATATATATAG	ISSR - 81	GTGTGTGTGTGTGTGTCC
ISSR - 7	AGAGAGAGAGAGAGAGT	ISSR - 82	GTGTGTGTGTGTGTGTTC
ISSR - 8	AGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR - 83	GTGTGTGTGTGTGTGTGG
ISSR - 9	AGAGAGAGAGAGAGAGG	ISSR - 84	GTGTGTGTGTGTGTGTCC
ISSR - 10	GAGAGAGAGAGAGAGAT	ISSR - 85	TCTCTCTCTCTCTCTCAA
ISSR - 11	GAGAGAGAGAGAGAGAC	ISSR - 86	TCTCTCTCTCTCTCTCGA
ISSR - 12	GAGAGAGAGAGAGAGAA	ISSR - 87	TCTCTCTCTCTCTCTCAT
ISSR - 13	CTCTCTCTCTCTCTCTT	ISSR - 88	TCTCTCTCTCTCTCTCGT
ISSR - 14	CTCTCTCTCTCTCTCTA	ISSR - 89	TCTCTCTCTCTCTCTCAG
ISSR - 15	CTCTCTCTCTCTCTCTG	ISSR - 90	TCTCTCTCTCTCTCTCGG
ISSR - 16	CACACACACACACACAT	ISSR - 91	ACACACACACACACACTT
ISSR - 17	CACACACACACACACAA	ISSR - 92	ACACACACACACACACGT
ISSR - 18	CACACACACACACACAG	ISSR - 93	ACACACACACACACACCT
ISSR - 19	GTGTGTGTGTGTGTGTA	ISSR - 94	ACACACACACACACACTA
ISSR - 20	GTGTGTGTGTGTGTGTC	ISSR - 95	ACACACACACACACACGA
ISSR - 21	GTGTGTGTGTGTGTGTT	ISSR - 96	ACACACACACACACACCA
ISSR - 22	TCTCTCTCTCTCTCTCA	ISSR - 97	ACACACACACACACACTG
ISSR - 23	TCTCTCTCTCTCTCTCC	ISSR - 98	ACACACACACACACACGG
ISSR - 24	TCTCTCTCTCTCTCTCG	ISSR - 99	ACACACACACACACACCG
ISSR - 25	ACACACACACACACACT	ISSR - 100	TGTGTGTGTGTGTGTGAT
ISSR - 26	ACACACACACACACACC	ISSR - 101	TGTGTGTGTGTGTGTGCT
ISSR - 27	ACACACACACACACACG	ISSR - 102	TGTGTGTGTGTGTGTGAC
ISSR - 28	TGTGTGTGTGTGTGTGA	ISSR - 103	TGTGTGTGTGTGTGTGGC
ISSR - 29	TGTGTGTGTGTGTGTGC	ISSR - 104	TGTGTGTGTGTGTGTGAA
ISSR - 30	TGTGTGTGTGTGTGTGG	ISSR - 105	TGTGTGTGTGTGTGTGGA
ISSR - 31	ATATATATATATATATTA	ISSR - 106	ACCACCACCACCACCACC
ISSR - 32	ATATATATATATATATGA	ISSR - 107	AGCAGCAGCAGCAGCAGC
ISSR - 33	ATATATATATATATATCA	ISSR - 108	AGTAGTAGTAGTAGTAGT
ISSR - 34	ATATATATATATATATTC	ISSR - 109	ATGATGATGATGATGATG
ISSR - 35	ATATATATATATATATGC	ISSR - 110	CCGCCGCCGCCGCCGCCG
ISSR - 36	ATATATATATATATATCC	ISSR - 111	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
ISSR - 37	ATATATATATATATATTG	ISSR - 112	GGCGCGCGCGCGCGCGGC
ISSR - 38	ATATATATATATATATGG	ISSR - 113	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
ISSR - 39	ATATATATATATATATCG	ISSR - 114	GTGTGTGTGTGTGTGTGT
ISSR - 40	AGAGAGAGAGAGAGAGTT	ISSR - 115	TGCTGCTGCTGCTGCTGC
ISSR - 41	AGAGAGAGAGAGAGAGGT	ISSR - 116	TATTATTATTATTATTAT
ISSR - 42	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	ISSR - 117	GATAGATAGATAGATA
ISSR - 43	AGAGAGAGAGAGAGAGTC	ISSR - 118	GACAGACAGACAGACA
ISSR - 44	AGAGAGAGAGAGAGAGGC	ISSR - 119	CCCTCCCTCCCTCCCT
ISSR - 45	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	ISSR - 120	CTAGCTAGCTAGCTAG

表 1(续)

引物编号	序列 (5'→3')	引物编号	序列 (5'→3')
ISSR -46	AGAGAGAGAGAGAGCTA	ISSR -121	GATAGATAGACAGACA
ISSR -47	AGAGAGAGAGAGAGGA	ISSR -122	TGCATGCATGCATGCA
ISSR -48	AGAGAGAGAGAGAGCA	ISSR -123	GGATGGATGGATGGAT
ISSR -49	TATATATATATATAAT	ISSR -124	CTTCACTTCACTTCA
ISSR -50	TATATATATATATAGT	ISSR -125	GGAGAGGAGAGGAGA
ISSR -51	TATATATATATATAAC	ISSR -126	GGGTGGGGTGGGGTG
ISSR -52	TATATATATATATAGC	ISSR -127	ACAATATATATATATAT
ISSR -53	TATATATATATATAAG	ISSR -128	CCCATATATATATATAT
ISSR -54	TATATATATATATAGG	ISSR -129	GCGATATATATATATAT
ISSR -55	GAGAGAGAGAGAGATT	ISSR -130	AGAATATATATATATAT
ISSR -56	GAGAGAGAGAGAGAGT	ISSR -131	CGCATATATATATATAT
ISSR -57	GAGAGAGAGAGAGACT	ISSR -132	CTCATATATATATATAT
ISSR -58	GAGAGAGAGAGAGATC	ISSR -133	GCGATATATATATATAT
ISSR -59	GAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR -134	GGGATATATATATATAT
ISSR -60	GAGAGAGAGAGAGACC	ISSR -135	GTGATATATATATATAT
ISSR -61	GAGAGAGAGAGAGATG	ISSR -136	CACTATATATATATATA
ISSR -62	GAGAGAGAGAGAGAGG	ISSR -137	CCCTATATATATATATA
ISSR -63	GAGAGAGAGAGAGACG	ISSR -138	CGCTATATATATATATA
ISSR -64	CTCTCTCTCTCTCTAA	ISSR -139	GAGTATATATATATATA
ISSR -65	CTCTCTCTCTCTCTGA	ISSR -140	GCGTATATATATATATA
ISSR -66	CTCTCTCTCTCTCTAC	ISSR -141	GGGTATATATATATATA
ISSR -67	CTCTCTCTCTCTCTGC	ISSR -142	TATTATATATATATATA
ISSR -68	CTCTCTCTCTCTCTAG	ISSR -143	TCTTATATATATATATA
ISSR -69	CTCTCTCTCTCTCTGG	ISSR -144	TGTTATATATATATATA
ISSR -70	CACACACACACACAAT	ISSR -145	ACAAGAGAGAGAGAGAG
ISSR -71	CACACACACACACAGT	ISSR -146	AGAAGAGAGAGAGAGAG
ISSR -72	CACACACACACACAAC	ISSR -147	ATAAGAGAGAGAGAGAG
ISSR -73	CACACACACACACAGC	ISSR -148	CCCAGAGAGAGAGAGAG
ISSR -74	CACACACACACACAAG	ISSR -149	CGCAGAGAGAGAGAGAG
ISSR -75	CACACACACACACAGG	ISSR -150	CTCAGAGAGAGAGAGAG

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取质量检测结果

通过改良的 CTAB 法提取牡丹 DNA,用超微量分光光度计测 DNA 浓度。测得 DNA 浓度范围在 30 ~ 100 ng/μL, DNA 样品纯度 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值范围在 1.7 ~ 1.9 之间,提取的 DNA 质量较好,无蛋白质、酚类的污染。

2.2 ISSR 引物筛选结果及退火温度的确定

如果退火温度太低,可能会发生非特异性扩增,并降低重复率;但是,如果温度过高又会使条带减少,导致一些可能反应多态性的条带消失^[16]。因此确定合适的退火温度十分必要。本研究将温度设

定为 45、50、55、59 ℃ 4 个温度梯度,选择最佳退火温度。最后选出 2 个退火温度:50、55 ℃。用优化的 PCR 反应体系对 220 条引物进行扩增、筛选。根据 PCR 产物的凝胶成像,最终从 220 条引物中共筛选出 12 条扩增条带清晰、多态性好的 ISSR 引物,引物筛选结果和退火温度的确定(表 4、图 1、图 2 和图 3)。

3 讨论与结论

牡丹不仅具有较好的观赏价值,同时还有很高的药用价值。为了筛选出适合牡丹遗传多样性分析的 ISSR 引物,本试验利用改良的 CTAB 法从牡丹成熟干燥的叶片中提取 DNA,与 Rawat 等的 ISSR - PCR 反应体系优化研究中同样是选用成熟干叶的

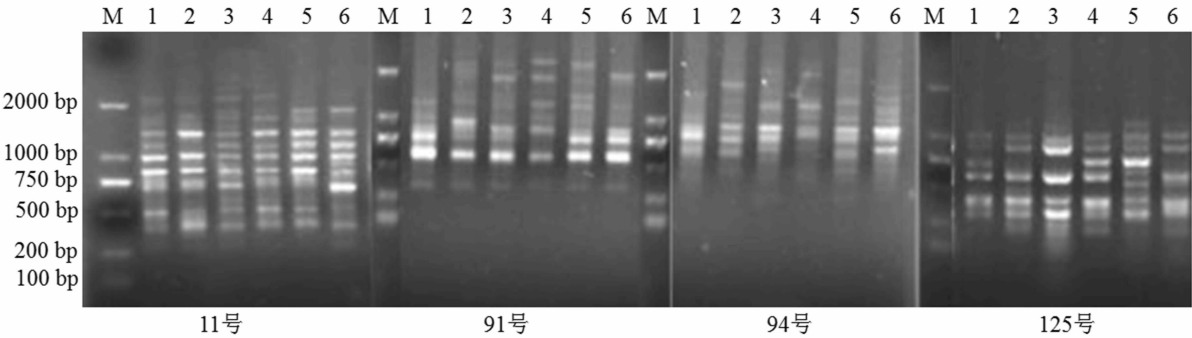
表 4 引物筛选结果

引物编号	序列(5'→3')	引物名称	退火温度(℃)
ISSR-11	GAGAGAGAGAGAGAGAC	811	50
ISSR-44	AGAGAGAGAGAGAGAGGC	835G	55
ISSR-45	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	835C	55
ISSR-48	AGAGAGAGAGAGAGAGCA	836C	55
ISSR-59	GAGAGAGAGAGAGAGAGC	841G	55
ISSR-60	GAGAGAGAGAGAGAGACC	841C	55
ISSR-81	GTGTGTGTGTGTGTGTCC	850C	50
ISSR-91	ACACACACACACACACTT	855T	50
ISSR-93	ACACACACACACACACCT	855C	55
ISSR-94	ACACACACACACACACTA	856T	50
ISSR-97	ACACACACACACACACTG	857T	55
ISSR-125	GGAGAGGAGAGGAGA	880	50

试验材料^[17]相一致。

利用 ISSR 分子标记技术研究牡丹遗传多样性和品种鉴定,可以获得 DNA 水平上的遗传信息,不受外界环境的影响^[18]。ISSR 分子标记受多种内在因素的影响,测定的可靠性、稳定性与 PCR 反应条件密切相关^[19-21]。退火温度决定着 PCR 的特异性,它是引物和模板组合时的一个温度参数,过高或过低都会影响 ISSR-PCR 扩增的清晰度及条带的多少^[22]。因此,在本试验中采用温度梯度 PCR 模式,将温度设定为 45、50、55、59 ℃4 个温度梯度,寻找合适的退火温度。

为了能够获得所需的扩增产物,在该试验中优化了 ISSR-PCR 反应体系。PCR 反应体系中 5 种成分(*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物与模板 DNA)的浓度与反应结果有很大的关系。*Taq* DNA



1~6—鹤顶红、文培紫、海棠争润、银粉金鳞、似荷莲、锦袍江 6 个牡丹品种的 DNA 样品; M—DL-2000 Marker。图 2、图 3 同

图1 11、91、94、125 号引物的 ISSR-PCR 扩增

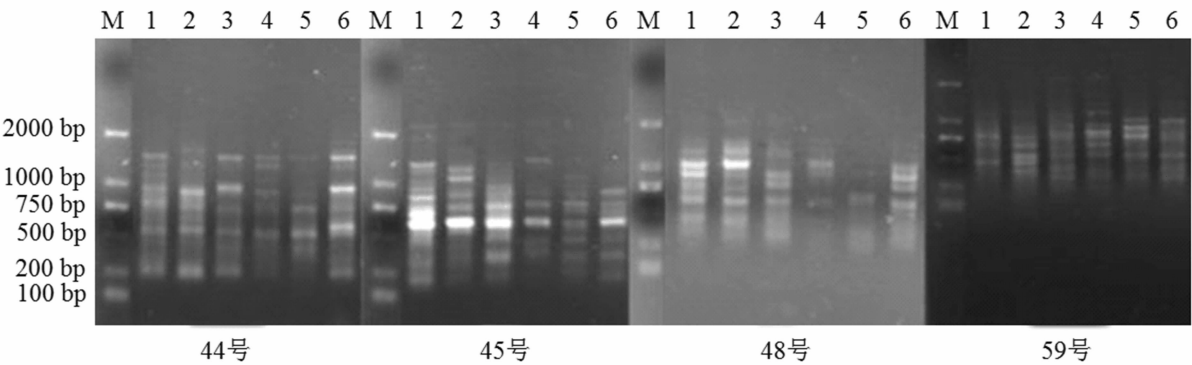


图2 44、45、48、59 号引物的 ISSR-PCR 扩增

聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶,其活性会受到 Mg^{2+} 浓度变化的影响,对 Mg^{2+} 浓度比较敏感。*Taq* DNA 聚合酶用量过多时,不仅会造成成本的浪费,而且会出现非特异性扩增的条带,产生弥散现象,用量过低时会降低扩增效率^[23]。本试验刚开始采用 10 μ L 的体系,包括引物 0.4 μ L,10 \times Buffer 1 μ L,dNTP 0.8 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L,双蒸水 5.6 μ L,模

板 DNA 2 μ L。凝胶成像显示其扩增结果并不理想。之后用 2 \times *Taq* MasterMix 混合液来代替 10 \times Buffer、dNTP 和 *Taq* DNA 聚合酶,换为 15 μ L 反应体系:2 \times *Taq* MasterMix 7.50 μ L,引物 0.75 μ L,模板 DNA 1.25 μ L,双蒸水 5.50 μ L。凝胶成像显示其扩增条带清晰、多态性高、重复性好。利用此体系对所有引物进行引物筛选,最终获得 ISSR-11、ISSR-44、

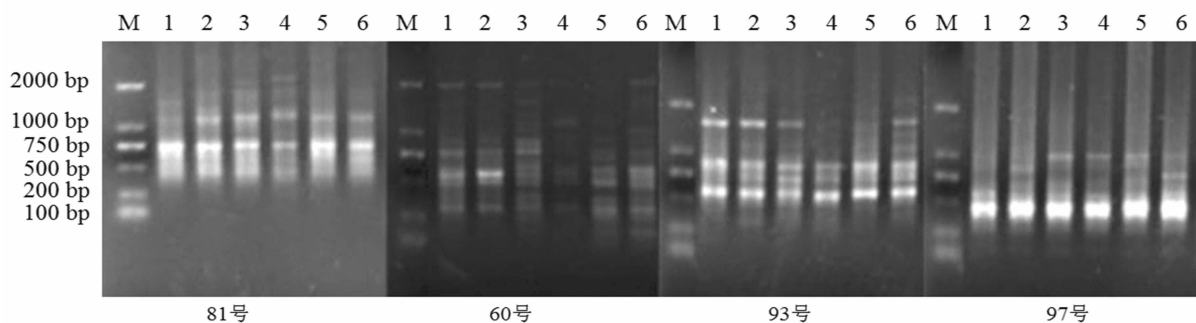


图3 81、60、93、97号引物的 ISSR-PCR 扩增

ISSR-45、ISSR-48、ISSR-59、ISSR-60、ISSR-81、ISSR-91、ISSR-93、ISSR-94、ISSR-97、ISSR-125 共 12 条 ISSR 引物。本试验用 $2 \times Taq$ MasterMix 混合液来代替 $10 \times Buffer$ 、dNTP 和 Taq DNA 聚合酶,不仅可以有效解决它们之间的浓度配比问题,还可以节省操作时间、避免污染,与李振山在枣研究中使用的 ISSR-PCR 反应体系和试验结果^[24]相似。

本研究结果表明,从鹤顶红、文培紫、海棠争润、银粉金鳞、似荷莲和锦袍江 6 个牡丹品种的叶片中提取的基因组 DNA 浓度范围在 $30 \sim 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 之间, DNA 样品纯度 $D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}}$ 比值在 $1.7 \sim 1.9$ 之间,表明所提取的 6 个样品的 DNA 质量较好,没有蛋白质和酚类物质的污染,证实了该改良的 CTAB 法适用于从蛋白质和酚类物质含量较高的植物材料中提取基因组 DNA。从 220 条 ISSR 引物中筛选出了 12 条引物,以 6 个牡丹品种的基因组 DNA 为模板,通过优化的 ISSR-PCR 反应体系进行扩增,凝胶成像结果显示,扩增条带清晰、多态性高、重复性好,共筛选出了 12 条引物,为研究牡丹遗传多样性分析奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张琳,王佩佩,韩雅祯,等. 油用牡丹主要相关性状与 SSR 分子标记的关联分析[J]. 东北林业大学学报,2019,47(3):31-37.
- [2] 史倩倩. 中原牡丹传统品种遗传多样性研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2012.
- [3] 李保印. 中原牡丹品种遗传多样性与核心种质构建研究[D]. 北京:北京林业大学,2007.
- [4] 陈富慧,索志立,赵孝庆,等. 中国牡丹品种的花期[J]. 东北林业大学学报,2005,33(6):55-61.
- [5] 韩丽晓,王莹. 牡丹分子标记研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(16):8850-8851,8996.
- [6] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
- [7] 方治伟,李论. SSR 分型技术研究进展[J]. 生物化工,2018,4(1):118-121.
- [8] Godwin I D, Aitken E A, Smith L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics [J]. Electrophoresis,1997,18(9):1524-1528.
- [9] Condit R, Hubbell S P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes[J]. Genome,1991,34(1):66-71.
- [10] 谢佳燕,张知彬. ISSR 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用[J]. 兽类学报,2004,24(1):71-77.
- [11] 钟丽凡,吕长平,许文婷,等. 湖南本土牡丹遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):34-37.
- [12] 刘通,冯丹,陈少瑜,等. 4 个滇牡丹天然居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西部林业科学,2014,43(3):31-36.
- [13] 郑涛,陈振东,林秀香,等. 福建省野牡丹属种质资源的 ISSR 分析[J]. 热带亚热带植物学报,2013,21(5):406-413.
- [14] 童芬,谢登峰,曾心美,等. 四川牡丹和圆裂四川牡丹遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2016,36(10):1968-1976.
- [15] 白凤虎,谢晓美,李德芳,等. 改良 CTAB 法用于提取红麻成熟叶片高质量 DNA 的研究[J]. 中国麻业科学,2007,29(3):158-161,165.
- [16] 罗登花,刘军民,韩正洲,等. 三桠苦 ISSR 反应体系的优化与引物筛选[J]. 时珍国医国药,2017,28(8):1988-1991.
- [17] Rawat S, Joshi G, Annapurna D, et al. Standardization of DNA extraction method from mature dried leaves and ISSR-PCR conditions for *Melia dubia* Cav. — A fast growing multipurpose tree species [J]. American Journal of Plant Sciences,2016,7(3):437-445.
- [18] 李勇慧,于相丽,马会萍,等. 不同品种牡丹 ISSR 遗传多样性分析[J]. 生物技术通报,2020,36(4):78-83.
- [19] 徐君,李静会,李欣,等. 荷花 ISSR 引物筛选及反应体系优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):42-44.
- [20] 胡凤荣,王斐,王志强,等. 风信子 ISSR-PCR 体系的优化及引物筛选[J]. 分子植物育种,2013,11(1):139-144.
- [21] 陆秀娟,潘虹,李祥栋,等. 薏苡种质资源 ISSR 分子标记筛选及亲缘关系分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):32-36.
- [22] 吴敏,贺晓,贺一鸣,等. 蒙古高原特有植物蒙古莜 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种,2019,17(5):1583-1588.
- [23] 黄丽华,陈秋婷,肖雨沙,等. 半枫荷 ISSR-PCR 体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种,2020:1-18.
- [24] 李振山. 枣 ISSR 反应体系的建立及其在新郑枣区优良单株早期鉴定上的应用[D]. 郑州:河南农业大学,2008:1-54.