

李守明, 史荣梅, 李辉玲. 西北地区大蒜及其野生蒜 SSR-PCR 体系优化及引物筛选[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(18): 274-279.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.18.042

西北地区大蒜及其野生蒜 SSR-PCR 体系优化及引物筛选

李守明¹, 史荣梅², 李辉玲³

(1. 石河子农业科学研究所, 新疆石河子 832000; 2. 新疆埃乐欣药业有限公司, 新疆乌鲁木齐 830000;

3. 巴音郭楞蒙古自治州农业科学研究所, 新疆库尔勒 841000)

摘要:为探索了解西北地区大蒜及其野生蒜资源之间的亲缘关系及变异特性,以 25 份西北地区及野生大蒜鳞茎和叶片为材料提取模板 DNA,筛选适于简单重复序列(SSR)-PCR 的反应体系。采用 $L_{16}(4^3)$ 正交表设计正交试验并进行单因素试验,对影响大蒜 SSR-PCR 的相关体系参数进行优化。结果表明,适用于大蒜的 SSR 反应体系总体积为 10 μL ;模板 DNA 30.0 ng,正反引物均为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, $2 \times \text{Taq PCR Mix}$ 5.0 μL ,其余用 dd H_2O 补齐。扩增程序:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,不同引物最佳退火温度退火 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 90 s;30 次循环的最后 1 次循环 72 $^\circ\text{C}$ 延伸设为 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 保存扩增产物。最终在上述 PCR 条件下从 50 对 SSR 通用引物中筛选出 13 对多态性好、稳定性高的适用于大蒜 SSR-PCR 多样性分析的候选引物。

关键词:大蒜;SSR-PCR;优化反应;引物筛选;扩增产物

中图分类号:S633.403 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)18-0274-05

大蒜(*Allium sativum* L.)别称胡蒜,属于百合科(Liliaceae)葱属(*Allium*)中重要的蔬菜植物,素有“植物黄金”之称,大蒜精、深加工品已经产业化,走俏欧洲、美国^[1-2]。大蒜栽培历史悠久,最早在地中海沿岸国家栽培,后由张骞从西域引入我国陕西关中地区,随后大面积种植,为适应特殊的地理环境,在长期栽培中形成了不同的生态型地方品种,其中我国四大名蒜之一就是位于天山北坡吉木萨尔的绿嘴白皮蒜。有效利用大蒜种质资源并对其变异性进行精准评价,单靠极易受环境影响的形态特征来评价物种多样性难度极大^[3],不能全面反映大蒜资源的真实状况,加上长期无性繁殖导致品种退化严重、相互引种导致背景资料缺乏等势必造成选育和推广工作滞后等生产问题发生。

近年来,分子标记技术被广泛应用于物种亲缘关系、品种纯度鉴定及遗传多样性分析等辅助育种

领域^[4-5]。基于转录组数据开发的简单重复序列(SSR)标记研究鲜有报道,因此笔者试图建立适宜西北地区大蒜及其野生蒜的 SSR-PCR 分子标记体系,对影响试验结果的主要因素进行优化,以期为后期的种质鉴定、遗传多样性分析及构建图谱等分子标记辅助育种工作提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试 25 份大蒜种质资源分别由巴音郭楞蒙古自治州农业科学研究所特色作物室、新疆维吾尔自治区农业科学研究所园艺所收集、提供(表 1),分别于 2021 年 4 月初种植于巴音郭楞蒙古自治州农业科学研究所试验田内,常规田间管理。每份资源取叶片 200 mg 左右,利用天根生化科技(北京)有限公司生产的新型植物基因组 DNA 提取试剂盒抽提大蒜的 DNA。个别未出苗资源以鳞茎作为材料,利用传统的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)手提法提取 DNA。提取的 25 份大蒜 DNA 在 140 V 恒压下,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 15 min,用凝胶成像系统检测并拍照。另用核酸测定仪(NanoDrop-1000)测定质量及浓度,记录数据后,于 -80 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

收稿日期:2021-10-14

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2021D01B27)。

作者简介:李守明(1976—),男,新疆石河子人,硕士,高级农艺师,主要从事加工番茄新品种选育、农业技术推广及应用。E-mail:41176268@qq.com。

通信作者:李辉玲,硕士,助理研究员,主要从事特色作物的育种与栽培。E-mail:12354399@qq.com。

表 1 25 份大蒜种质资源信息

序号	名称	来源	鳞茎结构
1	酒泉白皮大蒜	甘肃酒泉	多瓣
2	民乐白皮大蒜	甘肃民乐	多瓣
3	民乐红皮大蒜	甘肃民乐	多瓣
4	平凉紫皮大蒜	甘肃平凉	多瓣
5	张掖白皮大蒜	甘肃张掖	多瓣
6	阿克苏紫皮大蒜	新疆阿克苏	多瓣
7	阿克苏白皮大蒜	新疆阿克苏	多瓣
8	皮山县大蒜	新疆皮山	多瓣
9	阿合奇县大蒜	新疆阿合奇	多瓣
10	霍城大蒜	新疆霍城	多瓣
11	塔城大蒜	新疆塔城	多瓣
12	新源大蒜	新疆伊犁	多瓣
13	天水红皮蒜	甘肃天水	多瓣
14	吉木萨尔白皮蒜	新疆吉木萨尔	多瓣
15	且末白皮蒜	新疆且末	多瓣
16	石河子白皮大蒜	新疆石河子	多瓣
17	石河子红皮大蒜	新疆石河子	多瓣
18	昌吉红皮蒜	新疆昌吉	多瓣
19	焉耆蒜	新疆焉耆	多瓣
20	野生蒜 1	新疆乌鲁木齐	独头
21	野生蒜 2	新疆乌鲁木齐	独头
22	野生蒜 3	新疆乌鲁木齐	多瓣
23	野生蒜 4	新疆乌鲁木齐	独头
24	野生蒜 5	新疆乌鲁木齐	多瓣
25	野生蒜 6	新疆乌鲁木齐	多瓣

1.2 引物设计与合成

综合参照 Barboza 等的研究^[6-8],共设计 50 对引物,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

1.3 SSR-PCR 扩增体系正交试验

本着节约成本并获得最佳扩增效果的目的,试验采用总体积为 10 μ L 的体系,引物浓度、模板 DNA 用量和 $2 \times Taq$ PCR Mix 添加量按 $L_{16}(4^3)$ 正交表设计试验(表 2),总计 16 次试验。扩增程序设定为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,不同引物最佳退火温度退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s;30 次循环的最后 1 次循环 72 $^{\circ}$ C 延伸设为 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存扩增产物。

1.4 退火温度和循环数优化

不同引物最适退火温度(T_m)值不同,为提高扩增效果并尽可能考虑到每对引物的最适 T_m ,采取引物报告单的上、下游引物退火温度的平均值设定。以 SSR7 为引物,结合上述扩增效果最优参数配比,对循环数进行单因素试验优化,以 6 份生物学性状

表 2 SSR-PCR 扩增体系正交试验设计

水平	因素		
	模版 DNA 用量 (ng)	引物浓度 (μ mol/L)	$2 \times Taq$ PCR Mix 添加量 (μ L)
1	10	0.20	1
2	20	0.50	3
3	30	0.75	5
4	40	1.00	7

差异较大、亲缘关系较远的大蒜模板 DNA 为小群体,设置梯度为 20、25、30、40 次循环。观察电泳图,选择扩增效果好且条带清晰的循环数。

1.5 电泳检测

采用 6.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶检测扩增结果,电泳仪参数设置:200 V 恒定电压,80 min。结束后小心拆胶,用银染法显色至条带清晰可辨,在医用胶片观察灯下拍照。参考尚小红等对扩增结果的直观分析法^[9]进行打分,打分依据:1~4 分表现为清晰条带少、杂带多、重复性差、背景模糊,5~8 分表现为清晰条带多、有杂带、重复性好、背景比较干净,9~12 分表现为清晰条带多、无杂带、重复性好、背景清晰,13~16 分表现为清晰条带多、亮度强、无杂带、重复性好、背景清晰。通过 Excel 表分析 16 个组合的均值(k_m)和极差(R),从而选择最佳因素配比。

1.6 体系稳定性检测及引物筛选

以 6 份生物学性状差异较大、亲缘关系较远的大蒜材料为模板,利用优化后的最佳 SSR-PCR 反应体系和循环数,对 50 对 SSR 引物进行筛选,最终筛选出条带清晰可辨、稳定性良好的引物作为大蒜材料 SSR 标记多态性分析的候选引物。

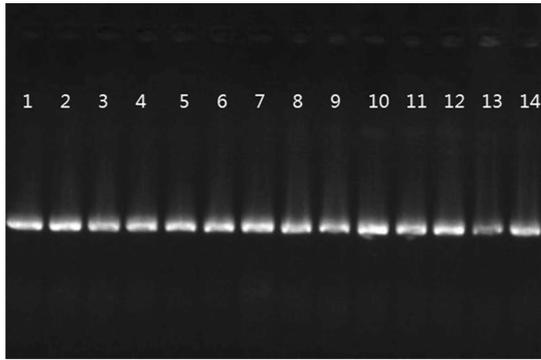
2 结果与分析

2.1 DNA 模板的检测

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其中 14 份大蒜材料 DNA 的质量,具体如图 1 所示,可以看出,条带整齐一致、带型清晰,材料间 DNA 浓度较为均匀。核酸检测仪测定结果显示,所提 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 位于 1.85~2.0 之间,浓度为 61~193 ng/ μ L。

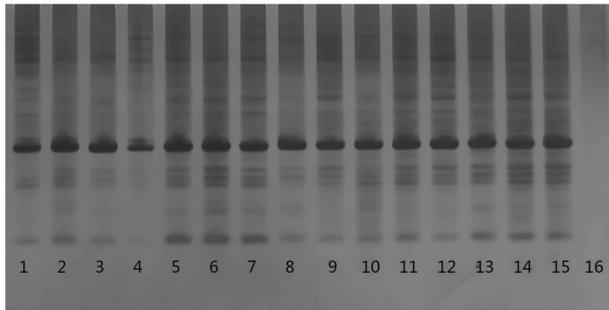
2.2 SSR-PCR 扩增体系的优化

扩增结果是 PCR 体系内各因素相互之间综合作用产生的,正交试验 16 个处理的扩增结果如图 2 所示,可以看出,各个因素的浓度组合不同,扩增效果表现出明显的差异。 R 越大,说明该因素对扩增



1~9 为试剂盒提取, 10~14 为传统 CTAB 法提取, 除 13 号以鳞茎为材料提取外其余均为叶片材料

图1 大蒜基因组 DNA 电泳结果



1~16 为不同处理号

图2 大蒜 DNA 的 SSR-PCR 扩增体系正交试验电泳结果

效果优劣影响越大, k_m 越大, 说明该水平下的扩增效果越好。通过对结果进行评价和数据分析(表3)得出: 各因素对 SSR-PCR 体系扩增结果的影响程度依次为模板 DNA 用量、引物浓度、 $2 \times Taq$ PCR Mix 添加量。模板 DNA 用量为 30 ng 时效果最好, 引物浓度为 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 时效果最好; $2 \times Taq$ PCR Mix 添加量为 3 μL 时最好。但引物浓度的 k_2 与 k_3 相差不大, 且考虑到条带的清晰程度, 10 μL 反应体系以 30 ng 模版 DNA、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物、5 μL 的 $2 \times$

表3 建立 SSR-PCR 反应体系的正交试验设计表及结果

处理号	模版 DNA 用量 (ng)	引物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	$2 \times Taq$ PCR Mix 添加量 (μL)	得分 (分)
1	10	0.20	1	4
2	10	0.50	3	7
3	10	0.75	5	4
4	10	1.00	7	3
5	20	0.20	3	9
6	20	0.50	1	10
7	20	0.75	7	13
8	20	1.00	5	5
9	30	0.20	5	8
10	30	0.50	7	7
11	30	0.75	1	12
12	30	1.00	3	13
13	40	0.20	7	9
14	40	0.50	5	13
15	40	0.75	3	11
16	40	1.00	1	1
k_1	4.50	7.50	6.75	
k_2	9.25	9.25	10.00	
k_3	10.00	10.00	7.50	
k_4	8.50	5.50	8.00	
R	5.50	4.50	3.25	

Taq PCR Mix 添加量为最佳组合。

2.3 循环数的优化

当循环数为 20、25 次时, 扩增结果谱带模糊; 当循环数达到 30、40 次时扩增谱带清晰易辨。综合考虑扩增结果质量及总 PCR 反应时长, 最终设定最佳循环数为 30 次(图3)。

2.4 引物筛选

以 6 份生物学性状差异较大、亲缘关系较远的

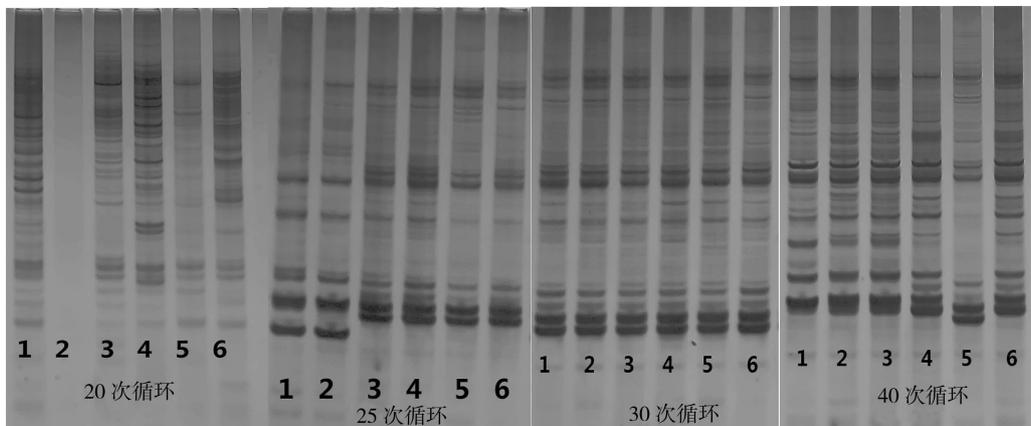


图3 优化循环数的扩增产物电泳结果

大蒜 DNA 基因为模板组成小群体筛选,从 50 对 SSR 通用引物中最终筛选出 13 对有效引物(图 4、

表 4)。图 5 为引物 SSR7 在 25 份大蒜材料中的 SSR 扩增结果。

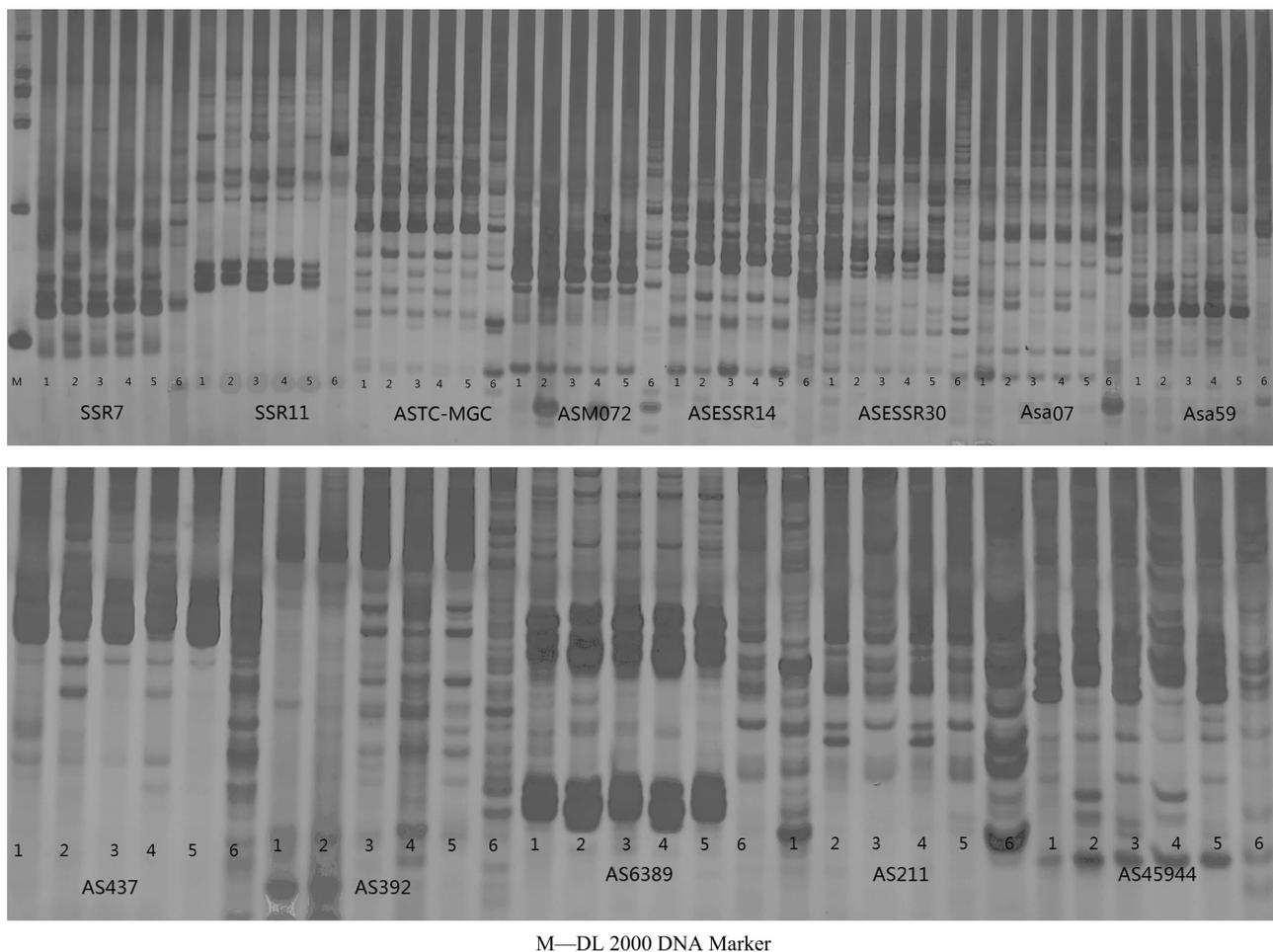
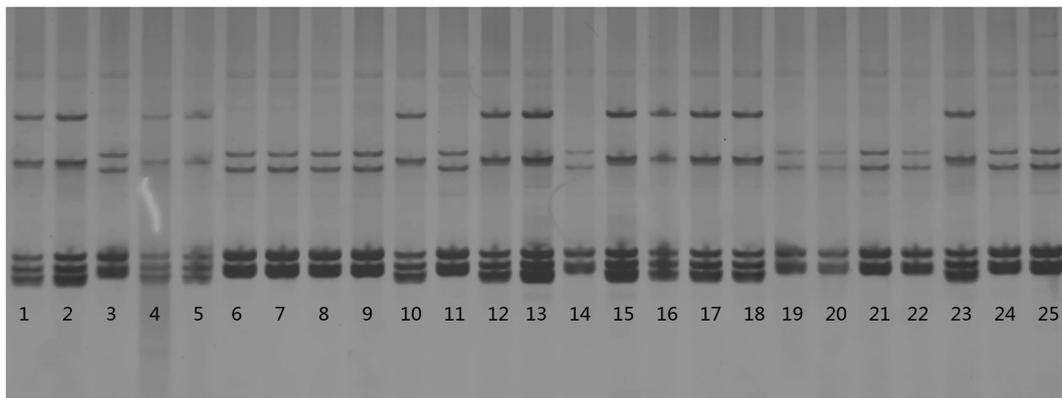


图4 筛选出的 13 对多态性 SSR 引物的扩增产物电泳结果

表 4 筛选出的 13 对多态性 SSR 引物的序列及其最佳退火温度

引物编号	引物位点名称	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)
1	SSR7	ATGCCGCCATTAAGCACTTG	GCAAACAGGATTGGCACCAG	57
2	SSR11	AACCATTGATGCACTGCGG	CTGGCGGTAGAATGCGTTTG	56.9
3	ASTC - MGC	GGTGCCGGAGTACTACGAGG	GGACATCTTTCCATTCATCCTGC	58.3
4	ASM072	CACGCGAATCTTTCTTGG	TGCAAACGAATATGGCAG	50.9
5	ASESSR14	CCCCTTCGGTTGTTTTCTT	CTGGGTACGGTCTGTTATTTGG	54.3
6	ASESSR30	GCAGCAGTAGAAGAACCTGCT	AACCTCTTTTGGTGCCTCCT	57
7	Asa07	CTCGGAACCAACCAGCATA	CCCAAACAAGGTAGGTCAGC	55.5
8	Asa59	CGTTACTATGGGTGTGTGTC	CAAGTGGGAGACTGTTGGAG	55.7
9	AS437	TCGTCTGGCGTTGVATTATC	CGCTTGTAATCGTTGATGACC	54.1
10	AS392	TTTCAACAGCATCAGTTTGTAGA	CCTTCACCATCAACCTACATTG	52.4
11	AS6389	GCGAGAAAACCCGAGAATG	GCTGCTCCCCTTATATCGTTC	54.9
12	AS211	AGAACATGAACCGGGATAGA	GAGGTTGCTGTTGCTGC	53.7
13	AS45944	AGAGGGTTTTTCGATCTGGA	AGTGGCATCAAAGCAAGATG	53



1~25 为表 1 中对应的 25 种试验材料

图5 引物 SSR7 在 25 份大蒜种质的 SSR 扩增结果

3 讨论

3.1 提取 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果

提取高质量的模板 DNA 是进行 SSR-PCR 的前提,近年来最简单的 DNA 提取方法是植物基因组 DNA 提取试剂盒,虽然成本较高,但操作方便快捷、DNA 纯度高、操作过程毒害少,其应用越来越广泛^[10-11]。然而取材不同,细胞内的组成成分如多酚类化合物、多糖等会影响 DNA 的提取质量。大蒜鳞茎中含有比叶片更多的黏液类物质,试剂盒提取效果不如叶片,因此采取传统的 CTAB 法提取,但其操作步骤繁琐费时,所用异丙醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等有很大毒害。相较之下,试剂盒提取的 DNA 纯度高但浓度过低,传统 CTAB 法提取的 DNA 纯度一般但浓度很高。因此,在模板 DNA 试验实际的需求量小时建议使用植物基因组试剂盒提取 DNA,需求量较大或者取材干扰物质多时采用传统的 CTAB 法。

3.2 建立大蒜 SSR-PCR 体系的影响因素

建立稳定的 PCR 反应体系是 SSR 分析应用的基础,体系涉及到的诸多因子对整个反应的敏感性、特异性和产量都有较大影响。因此,筛选适合的 SSR 引物、建立反应体系并进一步优化体系,是前期需要开展的必备工作。有研究表明,模板 DNA 浓度过低会造成反应后条带不完全或者电泳结果中没有扩增产物;浓度过高会增加体系中抑制反应的成分含量,出现非特异性扩增现象^[12]。引物浓度过低时目标扩增产物的浓度过低或者出现扩增不完全现象,浓度过高则电泳后结果会出现大量引物二聚体。循环次数是 SSR-PCR 扩增反应的关键因素;次数设置过少,目标扩增产物量少,电泳结果不

理想;次数设置过多,消耗完反应物后目标扩增产物不再增加,并会出现非特异性扩增现象^[13-14]。

本试验借助正交表的均衡分散性和整齐可比性,通过多因素联合优化的正交试验设计对影响大蒜 DNA SSR 反应的 $2 \times Taq$ PCR Mix 添加量、引物浓度及模板 DNA 用量等因子进行优化试验分析,最终得出适合大蒜 SSR-PCR 的反应体系:总体积 $10 \mu\text{L}$ 、模板 DNA 30.0 ng 、正反引物各 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $2 \times Taq$ PCR Mix $5.0 \mu\text{L}$,用 dd H_2O 补齐。SSR-PCR 扩增程序设定为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s ,不同引物最佳退火温度退火 45 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s ; 30 次循环的最后 1 次循环 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸设为 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存扩增产物。以上述最佳反应体系和扩增程序为基础,进一步在 50 对通用引物中筛选出高多态性、重复性良好的 13 对 SSR 有效引物,可以为大蒜的品种鉴定、遗传多样性等分子辅助研究提供理论和技术支持。

参考文献:

- [1] 都真真,李锡香,宋江萍,等. 228 份引进大蒜资源的表型多样性分析及适应性初步评价[J]. 植物遗传资源学报,2019,20(5): 1186-1196.
- [2] 王薇薇,郭军,梅焱,等. 大蒜种质资源的综合评价与聚类分析[J]. 江苏农业学报,2017,33(2):397-403.
- [3] 严根元. 大蒜栽培技术及综合利用[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,1989.
- [4] 高天翔,蔡宇良,冯瑛,等. 中国樱桃 14 个自然居群遗传多样性和遗传结构的 SSR 评价[J]. 园艺学报,2016,43(6):1148-1156.
- [5] Bordes J, Goudemand E, Duchalais L, et al. Genome-wide association mapping of three important traits using bread wheat elite breeding populations[J]. Molecular Breeding,2014,33(4):755-768.

刘广,黄晓云,徐锦华,等. 西瓜枯萎病抗性分子标记筛选与应用[J]. 江苏农业科学,2022,50(18):279-283.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.18.043

西瓜枯萎病抗性分子标记筛选与应用

刘广¹,黄晓云²,徐锦华¹,张曼¹,姚协丰¹,娄丽娜¹,徐建¹,侯茜¹,朱凌丽¹,羊杏平¹

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014;

2. 苏州农业职业技术学院环境工程学院,江苏苏州 215008)

摘要:西瓜是一种重要的园艺作物,经济效益显著,但枯萎病的发生严重限制了西瓜的生产。为了解决这一难题,利用简单、方便、实用性强的分子标记技术辅助选育抗性强的西瓜品种对于西瓜产业的优质发展具有重要意义。以父本 sugarlee、母本伊选、F₁代、F₂代及 F₃代遗传群体为材料,通过苗期接种鉴定,对父本的抗性遗传规律进行研究,发现父本 sugarlee 对枯萎病生理小种 1 的抗性遗传为单基因显性性状遗传;然后利用 CAPS、InDel、SCAR、dCAPS 和 RAPD 等多种分子标记技术,筛选了 22 个与西瓜枯萎病抗性基因相关的分子标记,获得了与西瓜枯萎病紧密连锁的抗性标记 3 个,分别为 indel04、indel05、indel06,位于抗病基因的一侧,连锁距离分别为 7.5、10.7、13.7 cM,将这 3 个分子标记对 20 份西瓜材料进行分子检测,结果与实验室接种鉴定的结果基本一致。结果表明,分子标记 indel04、indel05、indel06 可应用于西瓜材料枯萎病抗性的分子辅助选择,这对于西瓜的抗性育种具有重要意义。

关键词:西瓜;枯萎病;分子标记;抗性基因;抗性鉴定

中图分类号:S651.035.3

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2022)18-0279-05

西瓜枯萎病,别称萎蔫病、死藤病、枯苗病,是由于西瓜的特异专化型病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)入侵根部感染而引起的可发生在西瓜植株整个生长期的病害,尤其是在西瓜

膨大期更易发生,表现为早期植株出现类似失水的症状,叶子有点萎蔫,慢慢地整株枯死^[1]。枯萎病对西瓜产量的影响很大,会导致减产甚至绝收,给农民带来极大的经济损失。因此西瓜不能在同一地块连作。但是由于土地资源的贫乏及温室、大棚等保护地设施的大面积应用,枯萎病发生日益严重,而针对枯萎病选育抗性强的西瓜新品种是解决这一难题最环保有效的措施之一。

一般采用枯萎病接种及田间检测的方法来鉴定西瓜品种的抗性,耗时长且需要大量的人力、物力。分子标记是一种可以连续遗传且在后代中能检测到的 DNA 序列,可以反映植株个体之间或群体之间基因组差异的特异性 DNA 片段,已成功应用于

收稿日期:2021-10-18

基金项目:国家西甜瓜产业技术体系建设专项(编号:CARS-26);江苏现代农业(西甜瓜)产业技术体系建设项目(编号:JATS[2021]422);江苏省农业重大新品种创制项目(编号:PZCZ201716)。

作者简介:刘广(1982—),女,湖南沅江人,博士,副研究员,主要从事西甜瓜及砧木遗传育种与生物技术研究。E-mail:liuguang_gj@163.com。

通信作者:羊杏平,博士,研究员,主要从事西瓜甜瓜遗传育种研究。E-mail:xingping@jaas.ac.cn。

[6] Barboza K, Salinas M C, Acuña C V, et al. Assessment of genetic diversity and population structure in a garlic (*Allium sativum* L.) germplasm collection varying in bulb content of pyruvate, phenolics, and solids[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 261: 108900.

[7] Barboza K, Beretta V, Kozub P C, et al. Microsatellite analysis and marker development in garlic; distribution in EST sequence, genetic diversity analysis, and marker transferability across Alliaceae[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2018, 293(5): 1091-1106.

[8] Gimenez M D, García Lampasona S. Before-after analysis of genetic and epigenetic markers in garlic; a 13-year experiment[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 240: 23-28.

[9] 尚小红,严华兵,曹升,等. 葛根 SCoT-PCR 反应体系优化及

引物筛选[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(1): 1-7.

[10] 梁玉琴,李芳东,傅建敏,等. 柿属植物基因组 DNA 提取方法比较[J]. *中南林业科技大学学报*, 2012, 32(4): 170-173.

[11] 王茜,廖惠红,黄宏明,等. 柑橘黄龙病病原 DNA 提取方法比较[J]. *南方农业学报*, 2013, 44(2): 225-229.

[12] 郑道君,谢良商,曾建华,等. 海南龙血树 ISSR-PCR 反应体系建立与有效引物筛选[J]. *热带亚热带植物学报*, 2011, 19(2): 177-183.

[13] 王东娜,单长城,冯富娟. 胡桃楸 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. *实验室研究与探索*, 2010, 29(11): 18-22, 37.

[14] 李房英,黄彦晶,吴少华. 三角梅 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. *海峡科学*, 2010(10): 216-219.