

新思路、新技术、新方法  
Novel Thinking & Technology

## 柑桔 SRAP 和 ISSR 分子标记技术体系的建立与优化

吴鑫<sup>1,2,3</sup> 雷天刚<sup>2,3</sup> 何永睿<sup>2,3</sup> 刘小丰<sup>2,3</sup> 许兰珍<sup>2,3</sup> 彭爱红<sup>2,3</sup> 陈善春<sup>2,3\*</sup>

1 西南大学园艺园林学院, 重庆, 400716; 2 西南大学柑桔研究所, 重庆, 400712; 3 国家柑桔品种改良中心, 重庆, 400712

\* 通讯作者, scchen2004@vip.sina.com

**摘要** 通过对 PCR 反应程序、反应体系(DNA 模板量、PCR 反应体积、Mg<sup>2+</sup> 浓度、dNTP 浓度、Taq 酶用量、引物量)、电泳检测方法的系统优化,建立了柑桔 SRAP-PCR 和 ISSR-PCR 体系;以此进行大规模引物筛选,从而建立了柑桔 SRAP 和 ISSR 分子标记技术体系。SRAP-PCR 25 μL 体系 模板 DNA 25 ng, Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Mg<sup>2+</sup> 1.2 mmol/L, dNTP 120 μmol/L, Taq 酶 1.5 U, 引物 0.4 μmol/L, 反应程序为 94 预变性 5 min, 35 个循环(94 30 s, 47 1 min, 72 1 min), 72 延伸 10 min; ISSR-PCR 25 μL 体系 模板 DNA 25 ng, Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Mg<sup>2+</sup> 1.6 mmol/L, dNTP 200 μmol/L, Taq 酶 1 U, 引物 0.8 μmol/L。筛选出稳定性好、多态性高的 24 对 SRAP 引物和 13 条 ISSR 引物。

**关键词** 柑桔, SRAP, ISSR, 建立, 优化

## Establishment and Optimization of SRAP and ISSR Marker System in Citrus

Wu Xin<sup>1,2,3</sup> Lei Tiangang<sup>2,3</sup> He Yongrui<sup>2,3</sup> Liu Xiaofeng<sup>2,3</sup> Xu Lanzhen<sup>2,3</sup> Peng Aihong<sup>2,3</sup> Chen Shanchun<sup>2,3\*</sup>

1 College of Horticulture & Landscape Designing, Southwest University, Chongqing, 400716; 2 Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing, 400712; 3 National Citrus Cultivar Improvement Center of China, Chongqing, 400712

\* Corresponding author, scchen2004@vip.sina.com

**Abstract** Here we have established SRAP-PCR and ISSR-PCR system in Citrus by optimization of PCR reaction program, reaction system (template DNA, reaction volume, Mg<sup>2+</sup>, dNTP, Taq DNA polymerase and primer) and electrophoresis detection experiments. Based on these reaction systems, a mass of primers have been screened. In the end, we got optimum SRAP and ISSR marker systems in Citrus. SRAP-PCR system: template DNA 25 ng, Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Mg<sup>2+</sup> 1.2 mmol/L, dNTP 120 μmol/L, Taq DNA polymerase 1.5 U, primer 0.4 μmol/L in 25 μL system, reaction program: initial denaturation step for 5 min at 94, followed by 35 cycles at 94 for 30 s, 47 for 1 min and 72 for 1 min, followed by a final extension step at 72 for 10 min; ISSR-PCR system: template DNA 25 ng, Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Mg<sup>2+</sup> 2.0 mmol/L, dNTP 200 μmol/L, Taq DNA polymerase 1 U, primer 0.8 μmol/L in 25 μL system. 24 pairs of SRAP primers and 13 ISSR primers, with high stability and polymorphism, has been obtained.

**Keywords** Citrus, SRAP, ISSR, Establishment, Optimization

分子标记技术已在作物遗传多样性分析、分类、品种鉴定和遗传图谱构建等方面得到广泛应用。SRAP 标记(sequence-related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性)和 ISSR 标记(inter-simple sequence repeat, 简单重复序列间扩增多态性)是两种常用的分子标记技术。SRAP 是美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros (2001)提出的,它利用开放阅读框

(ORFs)外显子富含 GC、内含子和启动子富含 AT 的序列,设计正反两个引物,扩增出基于内含子和外显子的多态性。该技术具有简单、稳定、在基因组中分布均匀等特点,已广泛应用于棉花(林忠旭等, 2003)、水稻(胡铁柱等, 2003)、番茄(Ruiz et al., 2005)、油菜(Riza et al., 2001)、桃(Ahmad et al., 2004)、芹菜(Li and Quiros, 2001)、辣椒(任羽等, 2004)等植物的研究

基金项目:本研究由科技部科研院所社会公益研究专项(2004DIB45147);重庆市科技攻关重点项目(CSTC, 2006AB1009);国家 863 项目(2006AA100108-4-12-4)资助

中,但在柑桔类果树中尚未见相关报道。

ISSR 是由加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等(1994)提出,其基本原理是在 SSR 的 3' 或 5' 末端加锚 1~4 个嘌呤或嘧啶碱基,然后以此为引物,对两侧具有反向排列 SSR 的一段序列进行扩增,得到两个 SSR 间序列的多态性。ISSR 标记简便快速、多态性好、可信度较高,现已广泛地应用于小麦(Nagaoka and Ogihara, 1997)、马铃薯(Prevost and Wilkinson, 1998)、桃(Dirlwanger et al., 1998)、苹果(宣继萍等, 2002)、葡萄(吴子龙等, 2006)等植物的研究中;Fang 和 Roose(1997)以及 Fang 等(1998)用 ISSR 标记分析了 35 个种之间的亲缘关系,并认为其可应用于柑桔遗传图谱的构建;Sankar 和 Moore(2001)利用 ISSR 标记对柚与枳的回交群体进行作图分析,与 RFLP、RADP 及同工酶标记构建的遗传图谱进行整合,构建了新的遗传图谱;吴兴恩等(2006)利用 ISSR 标记对 22 份柑桔资源进行亲缘分析,根据遗传距离划分为 6 个不同的类群;Shahsavari 等(2006)通过 ISSR 分析了 33 个柑桔资源的进化关系,其中包括一些未知的区域品种。

本研究以柑桔为材料,针对 SRAP 和 ISSR 的特点,对其反应程序、反应体系(模板量、反应体积、 $Mg^{2+}$ 、dNTP Mixture、Taq 酶、引物的浓度)和扩增产物电泳检测方法进行优化,并利用优化后的 SRAP-PCR 和 ISSR-PCR 体系进行大规模引物筛选,最终建立了适合于柑桔指纹图谱构建、遗传连锁图谱构建、遗传多样性分析和分子标记辅助育种等的标准化 SRAP 和 ISSR 分子标记技术体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为纽荷尔脐橙(*C. sinensis* Osbeck cv. Newhall)、德尔塔夏橙(*C. sinensis* Osbeck cv. Delta)、福桔(*C. reticulata* Blanco cv. Tangerina)、本地早桔(*C. reticulata* Blanco cv. Succosa)、宫本温州蜜柑(*C. reticulata* Blanco cv. Miyamoto)、大浦温州蜜柑(*C. reticulata* Blanco cv. Oura)、岩溪晚芦(*C. reticulata* Blanco cv. Yanxiwanlu)和椪柑新生系 3 号(*C. reticulata* Blanco cv. Ponkan varieties nucellar line No.3)均来自中国农业科学院柑桔研究所“国家果树种质(重庆)柑桔圃”。

### 1.2 柑桔基因组 DNA 提取

取幼嫩叶片,用本实验室改进的 CTAB 法(雷天

刚等, 2007)提取 DNA。

### 1.3 PCR 反应程序

SRAP 扩增程序: 94 预变性 5 min, 5 个循环(94 30 s, 35 1 min, 72 1 min), 35 个循环(94 30 s, 50 1 min, 72 1 min), 72 延伸 10 min; 94 预变性 5 min, 35 个循环(94 30 s, 47 1 min, 72 1 min), 72 延伸 10 min。扩增反应在德国 Biometra 公司 T1 Thermocycler 型 PCR 扩增仪上进行。

ISSR 扩增程序: 94 预变性 5 min, 35 个扩增循环(94 30 s, 45 ~55 1 min, 72 1 min), 72 延伸 10 min。比较不同退火温度和循环数对扩增结果的影响。扩增反应在德国 Biometra 公司 T-GRADIENT 型梯度 PCR 扩增仪上进行。

### 1.4 PCR 基本反应体系

以岩溪晚芦 DNA 为模板, SRAP 引物为 DN04 和 UP05, ISSR 引物为 IS01。设置 6 个模板 DNA 量, 分别为 10 ng、20 ng、30 ng、40 ng、50 ng、60 ng 进行 PCR 扩增, 选择最优模板量。然后设置 5 个反应体积, 分别为 10  $\mu$ L、15  $\mu$ L、20  $\mu$ L、25  $\mu$ L、30  $\mu$ L, 选择最优反应体积。在最优模板量和最优反应体积的基础上, 确立基本反应体系: Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L,  $Mg^{2+}$  1.6 mmol/L, dNTP 200  $\mu$ mol/L, DNA 聚合酶 1 U, 引物 0.8  $\mu$ mol/L。

### 1.5 PCR 反应体系优化

在基本反应体系中进行单因素梯度优化实验, 包括  $Mg^{2+}$  浓度(1.2 mmol/L、1.6 mmol/L、2.0 mmol/L、2.4 mmol/L)、dNTP 浓度(120  $\mu$ mol/L、160  $\mu$ mol/L、200  $\mu$ mol/L、240  $\mu$ mol/L)、Taq 酶用量(0.5 U、1.0 U、1.5 U、2.0 U)和引物浓度(0.4  $\mu$ mol/L、0.8  $\mu$ mol/L、1.2  $\mu$ mol/L、1.6  $\mu$ mol/L)。所用试剂均购自上海生物工程技术服务公司。

### 1.6 电泳检测方法

PCR 产物每管加入 2  $\mu$ L 上样缓冲液(40%蔗糖, 0.25%二甲苯青, 0.25%溴酚蓝), 分别于 10%、8%、6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(非变性 PAGE)中电泳。参照雷天刚等(2007)的方法银染显色。

### 1.7 大规模引物筛选

参照已有的报道, 选择 SRAP 引物 20 条(其中上游引物 10 条、下游引物 10 条, 序列见表 1), 随机设计 64 个 SRAP 引物组合用于引物筛选。ISSR 引物方

面,用 perl5 脚本程序 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa>) 搜索 NCBI 的 EST 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) 中柑桔 EST-SSR 序列,根据 EST-SSR 序列在柑桔中的丰度用 Primer 5.0 设计部分引物,并根据 EST-SSR 序列在柑桔中

的丰度从加拿大哥伦比亚大学公布的 ISSR 系列引物中选择部分引物,共 40 对 ISSR 引物用于筛选(表 1)。所有引物均由上海生工生物工程技术服务公司合成,PAGE 纯化。应用上述已建立优化的 SRAP-PCR 和 ISSR-PCR 体系进行大规模引物筛选。

表 1 SRAP 和 ISSR 引物序列

Table 1 Sequences of SRAP and ISSR primers

SRAP primers		ISSR primers			
No.	Sequence	No.	Sequence	No.	Sequence
DN01	TGAGTCCAAACCGGATA	IS01	(CT) <sub>8</sub> GC	IS21	(CCG) <sub>5</sub>
DN02	TGAGTCCAAACCGGAGC	IS02	(TA) <sub>8</sub> C	IS22	(CA) <sub>8</sub> RC
DN03	TGAGTCCAAACCGGAAT	IS03	(AC) <sub>8</sub> GA	IS23	(GGAT) <sub>4</sub>
DN04	TGAGTCCAAACCGGACC	IS04	(TA) <sub>8</sub> G	IS24	(GA) <sub>8</sub> YG
DN05	TGAGTCCAAACCGGAAG	IS05	(AG) <sub>8</sub> YT	IS25	(GA) <sub>8</sub> T
DN06	TGAGTCCAAACCGGTAA	IS06	(AG) <sub>8</sub> S	IS26	(TG) <sub>8</sub> G
DN07	TGAGTCCAAACCGGTCC	IS07	(CA) <sub>8</sub> T	IS27	(AT) <sub>8</sub> G
DN08	TGAGTCCAAACCGGTGC	IS08	(GA) <sub>8</sub> G	IS28	(TA) <sub>8</sub> G
DN09	TGAGTCCAAACCGGTCA	IS09	(CTGC) <sub>4</sub>	IS29	(GT) <sub>8</sub> T
DN10	TGAGTCCAAACCGGGCT	IS10	(GTC) <sub>6</sub>	IS30	(GA) <sub>8</sub> G
		IS11	(GT) <sub>8</sub> A	IS31	(TG) <sub>8</sub> A
UP01	GACTGCGATCGAATTAAT	IS12	(CT) <sub>8</sub> C	IS32	(CA) <sub>8</sub> A
UP02	GACTGCGATCGAATTTGC	IS13	CCA(GTG) <sub>4</sub>	IS33	(TC) <sub>8</sub> RG
UP03	GACTGCGATCGAATTGAC	IS14	(TG) <sub>8</sub> A	IS34	(CT) <sub>8</sub> RG
UP04	GACTGCGATCGAATTTGA	IS15	(CT) <sub>8</sub> T	IS35	(AGT) <sub>5</sub>
UP05	GACTGCGATCGAATTAAC	IS16	(CTC) <sub>5</sub>	IS36	(TGC) <sub>5</sub>
UP06	GACTGCGATCGAATTGCA	IS17	GSG(GT) <sub>6</sub>	IS37	(AG) <sub>8</sub> G
UP07	GACTGCGATCGAATTCAA	IS18	(TC) <sub>8</sub> C	IS38	(TG) <sub>8</sub> C
UP08	GACTGCGATCGAATTCTG	IS19	(CT) <sub>8</sub> RT	IS39	(TG) <sub>8</sub> RC
UP09	GACTGCGATCGAATTCGA	IS20	(AC) <sub>8</sub> T	IS40	(CA) <sub>8</sub> G
UP10	GACTGCGATCGAATTCAG		Note: Y=(C,T); R=(A,G); S=(C,G)		

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 反应程序

两套 SRAP 扩增程序都能得到较清晰的谱带(图 1),主带清晰,谱带数较多,重复性较好,程序 2 扩增的条带比程序 1 的明亮,主带和弱带之间的差异更明显,因此本研究以后的 SRAP 扩增反应均采用程序 2。

ISSR 梯度 PCR 实验表明,退火温度 45 ~50 时,扩增产物电泳谱带拖尾严重,退火温度 52 ~55 时的扩增结果较好,谱带比较清晰,无明显拖带现象,没有明显的背景影响。PCR 扩增不同循环数的比较结果表明,35 个扩增循环电泳图谱的背景噪音明显小于 40 个循环;此后本研究 ISSR-PCR 扩增的退火温度 52 ~55,35 个扩增循环。

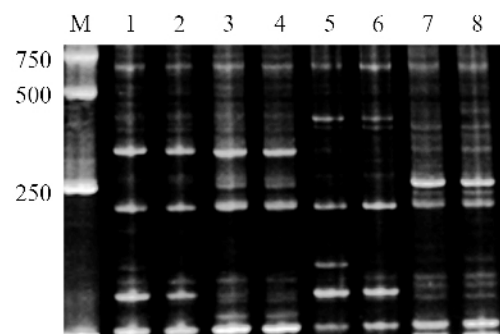


图 1 2 套 SRAP 程序对 4 个柑桔品种的扩增结果

注: M: DL2000 DNA Marker; 1,5: 福桔; 2,6: 本地早; 3,7: 宫本; 4,8: 大浦; 1~4: 程序 1; 5~8: 程序 2; 引物: DN07/UP09

Figure 1 Results of 2 different SRAP program among 4 citrus cultivars

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1,5: Tangerina; 2,6: Succosa; 3,7: Miyamoto; 4,8: Oura, 1~4: program 1; 5~8: program 2; Primer: DN07/UP09

## 2.2 PCR 基本反应体系

总体来看,模板 DNA 量和反应体积对 SRAP-PCR 和 ISSR-PCR 结果影响不大。供试 6 个不同的 DNA 模板量所得到的结果基本相同,无明显差异,说明在这个浓度区间均能得到较好的扩增结果,此后本研究的模板 DNA 量均为 25 ng。5 个反应体积均得到较好的扩增结果,20  $\mu\text{L}$  和 25  $\mu\text{L}$  得到的带型稍优,多态性更好,本研究选择常用的 25  $\mu\text{L}$  反应体系。

## 2.3 PCR 反应体系优化

SRAP-PCR 实验结果(图 2)  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 1.2 mmol/L 和 1.6 mmol/L 时扩增谱带较好,主弱带差异明显,浓度为 2.0 mmol/L 和 2.4 mmol/L 时,扩增谱带比较

少,因此确定  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 1.2 mmol/L。dNTP 浓度为 120  $\mu\text{mol/L}$  时,谱带清晰,主弱带之间差异明显,浓度为 160  $\mu\text{mol/L}$  时,主带不明显,浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  和 240  $\mu\text{mol/L}$  时,带少且不清晰,因此确定 dNTP 浓度为 120  $\mu\text{mol/L}$ 。Taq 酶量为 0.5 U 和 1.0 U 时,扩增的带少,1.5 U 和 2.0 U 时,扩增的谱带较多,2.0 U 时背景模糊,可能与产物浓度较高有关,因此以后的实验采用 1.5 U 的 Taq 酶。引物浓度为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  时,谱带多且清晰,引物浓度越高,谱带逐渐减少,因此之后引物浓度均为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ 。综合上述结果,优化后的 SRAP-PCR 反应体系为:反应体积 25  $\mu\text{L}$ ,其中模板 DNA 25 ng,Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L,  $\text{Mg}^{2+}$  1.2 mmol/L, dNTP 120  $\mu\text{mol/L}$ , Taq 酶 1.5 U, 引物 0.4  $\mu\text{mol/L}$ 。

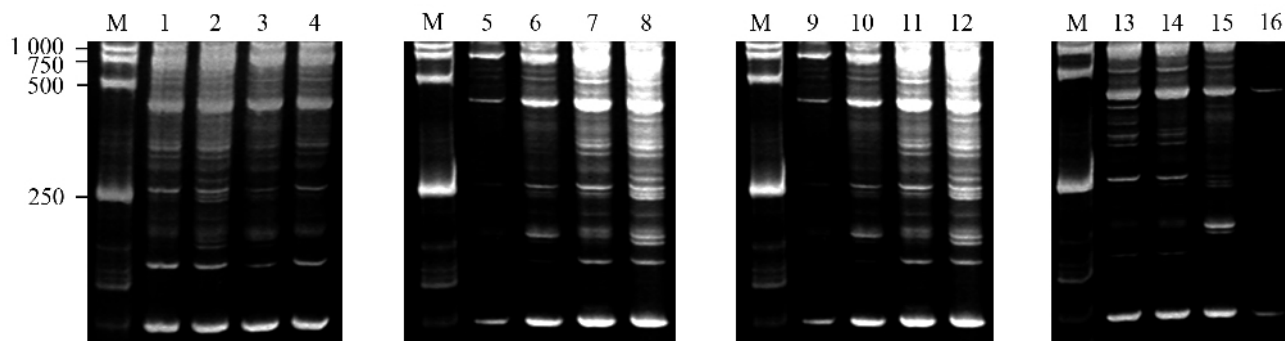


图 2 基本反应体系中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、Taq 酶浓度和引物浓度对 SRAP 反应的影响

注:品种:岩溪晚芦;引物:DN04/UP05;M:DL2000 DNA Marker;1~4:  $\text{Mg}^{2+}$  浓度分别为 1.2 mmol/L、1.6 mmol/L、2.0 mmol/L、2.4 mmol/L;5~8: dNTP 浓度分别为 120  $\mu\text{mol/L}$ 、160  $\mu\text{mol/L}$ 、200  $\mu\text{mol/L}$ 、240  $\mu\text{mol/L}$ ;9~12: Taq 酶浓度分别为 0.5 U、1.0 U、1.5 U、2.0 U;13~16: 引物浓度分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ 、0.8  $\mu\text{mol/L}$ 、1.2  $\mu\text{mol/L}$ 、1.6  $\mu\text{mol/L}$

Figure 2 Effect of  $\text{Mg}^{2+}$ , dNTP, Taq DNA polymerase and primers concentrations on SRAP patterns in basic system

Note: Cultivar: Yanxiwanlu; Primer: DN04/UP05; M: DL2000 DNA Marker; 1~4:  $\text{Mg}^{2+}$  concentration is 1.2 mmol/L, 1.6 mmol/L, 2.0 mmol/L, 2.4 mmol/L, respectively; 5~8: dNTP concentration is 120  $\mu\text{mol/L}$ , 160  $\mu\text{mol/L}$ , 200  $\mu\text{mol/L}$ , 240  $\mu\text{mol/L}$ , respectively; 9~12: Taq DNA polymerase concentration is 0.5 U, 1.0 U, 1.5 U, 2.0 U, respectively; 13~16: Primers concentration is 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , 0.8  $\mu\text{mol/L}$ , 1.2  $\mu\text{mol/L}$ , 1.6  $\mu\text{mol/L}$ , respectively

ISSR-PCR 结果表明(图 3)  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 1.2 mmol/L 时,扩增谱带很少,浓度为 1.6 mmol/L 和 2.0 mmol/L 时,扩增谱带比较清晰,2.0 mmol/L 稍优于 1.6 mmol/L,浓度 2.4 mmol/L 时,背景模糊,因而以后 ISSR-PCR 均采用 1.6 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 。dNTP 浓度为 120  $\mu\text{mol/L}$  时,扩增出的谱带很少,浓度 160  $\mu\text{mol/L}$  和 200  $\mu\text{mol/L}$  时,谱带较多且较清晰,200  $\mu\text{mol/L}$  稍优,浓度 240  $\mu\text{mol/L}$  时,带少且背景模糊,因此此后均采用 200  $\mu\text{mol/L}$  的 dNTP。反应体系中加入 0.5 U 的 Taq 酶时,几乎无法观察到弱带,1.0 U 最优,1.5 U 和 2.0 U 时背景模糊,因此以后的实验采用 1.0 U Taq 酶。引物浓度 0.4  $\mu\text{mol/L}$  和 0.8  $\mu\text{mol/L}$  时,谱带和背景都比较清晰,0.8  $\mu\text{mol/L}$  时弱带更为清晰,浓度为 1.2  $\mu\text{mol/L}$  和 1.6  $\mu\text{mol/L}$

时,背景较模糊,可能是产物浓度较高所致,因而此后引物浓度均采用 0.8  $\mu\text{mol/L}$ 。经上述试验优化的 ISSR-PCR 反应体系为:反应体积 25  $\mu\text{L}$ ,其中模板 DNA 25 ng,Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L,  $\text{Mg}^{2+}$  1.6 mmol/L, dNTP 200  $\mu\text{mol/L}$ , Taq 酶 1.0 U, 引物 0.8  $\mu\text{mol/L}$ 。

PCR 反应是 SRAP 和 ISSR 分子标记体系的重要环节,反应体系中各组分浓度均影响扩增结果,SRAP-PCR 和 ISSR-PCR 的最佳反应体系中同一组分的浓度也不相同。 $\text{Mg}^{2+}$  浓度影响 PCR 反应的特异性和扩增效率,是 Taq 酶的激活剂。dNTP 是 PCR 反应底物,浓度过高会引起错误的渗入,产生错配,同时将与 Taq 酶竞争  $\text{Mg}^{2+}$ ,使酶活性下降,浓度过低则

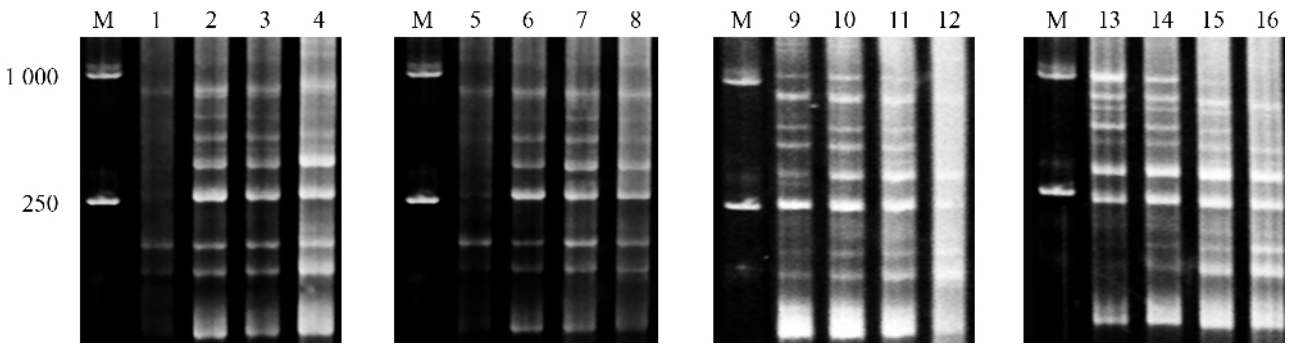


图3 基本反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、Taq 酶浓度和引物浓度对 ISSR 反应的影响

注: 品种: 岩溪晚芦; 引物: IS01; M: DL15000 DNA Marker; 1~4:  $Mg^{2+}$  浓度分别为 1.2 mmol/L、1.6 mmol/L、2.0 mmol/L、2.4 mmol/L; 5~8 dNTP 浓度分别为 120  $\mu$ mol/L、160  $\mu$ mol/L、200  $\mu$ mol/L、240  $\mu$ mol/L; 9~12: Taq 酶浓度分别为 0.5 U、1.0 U、1.5 U、2.0 U; 13~16: 引物浓度分别为 0.4  $\mu$ mol/L、0.8  $\mu$ mol/L、1.2  $\mu$ mol/L、1.6  $\mu$ mol/L

Figure 3 Effect of  $Mg^{2+}$ , dNTP, Taq DNA polymerase and primers concentrations on ISSR patterns in basic system

Note: Cultivar: Yanxiwanlu; Primer: IS01; M: DL2000 DNA Marker; 1~4:  $Mg^{2+}$  concentration is 1.2 mmol/L、1.6mmol/L、2.0 mmol/L、2.4 mmol/L, respectively; 5~8: dNTP concentration is 120  $\mu$ mol/L、160  $\mu$ mol/L、200  $\mu$ mol/L、240  $\mu$ mol/L, respectively; 9~12: Taq DNA polymerase concentration is 0.5 U、1.0 U、1.5 U、2.0 U, respectively; 13~14: Primers concentration is 0.4  $\mu$ mol/L、0.8  $\mu$ mol/L、1.2  $\mu$ mol/L、1.6  $\mu$ mol/L, respectively

影响 PCR 的产率。Taq 酶用量影响 PCR 扩增效率, 过高则产生非特异性扩增, 过低则合成产物量减少。引物浓度影响 PCR 反应特异性, 浓度过高也会引起错配和非特异性扩增, 且增加形成二聚体的几率。

#### 2.4 电泳检测方法

PCR 扩增产物检测一般采用琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳检测, 琼脂糖凝胶电泳要求上样量较大, 且灵敏度不高, 难以较好地地区分相差几个到几十个碱基的片段。PAGE 电泳灵敏度较高, 对于 SRAP 扩增产物, 10%的非变性 PAGE 电泳得到的谱带效果较 8%和 6%好, 谱带多且重复性好, 谱带清晰, 不同谱带差别明显, 背景影响小; 对于 ISSR 扩增产物, 电泳时间以指示剂(二甲苯青)跑出凝胶为标准, 6%的凝胶电泳效果好, 谱带清晰, 谱带多且重复性好, 10%的凝胶电泳谱带不能完全拉开,

集中在凝胶上样端 1/3 处, 难以分辨谱带间差异。综上所述, SRAP 扩增产物以 10%的非变性 PAGE 电泳检测、ISSR 产物用 6%的非变性 PAGE 电泳检测最佳。

#### 2.5 大规模引物筛选

利用上述建立和优化的 SRAP-PCR 和 ISSR-PCR 体系, 以纽荷尔和岩溪晚芦 DNA 为模板, 对 64 个 SRAP 引物组合和 40 条 ISSR 引物进行筛选, 结果表明, 所有 SRAP 和 ISSR 引物都能得到条带清晰、重复性好、稳定性高的谱带。进一步用这些引物对 8 个柑桔品种进行指纹图谱检测, 获得 8 个品种间具有多态性谱带的 SRAP 引物组合 24 个、ISSR 引物 13 条(表 2), 各引物的多态性谱带数范围在 2~8 条之间。图 4 和图 5 分别为其中两对 SRAP 和 ISSR 引物的扩增图谱。可以看出, SRAP 标记在不同柑桔

表 2 适合柑桔 SRAP 和 ISSR 分析的引物

Table 2 Primers suitable for SRAP and ISSR analysis in Citrus

SRAP 引物组合				ISSR 引物		
DN08/UP08	DN07/UP09	DN01/UP02	DN03/UP09	IS01	IS20	IS31
DN03/UP06	DN04/UP10	DN09/UP03	DN02/UP07	IS03	IS22	IS36
DN02/UP04	DN10/UP10	DN07/UP02	DN10/UP01	IS09	IS26	IS39
DN06/UP03	DN07/UP01	DN10/UP06	DN01/UP05	IS13	IS28	IS40
DN09/UP09	DN05/UP10	DN05/UP06	DN10/UP002	IS17		
DN02/UP06	DN07/UP03	DN10/UP04	DN09/UP06			

注: 引物编号同表 1

Note: Primers No. were same as Table 1

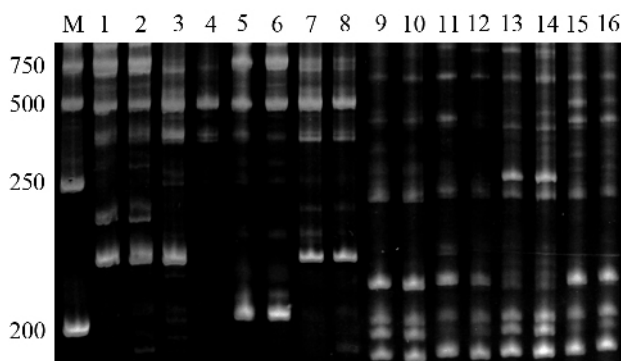


图 4 引物 DN05/UP06 和 DN07/UP09 对 8 个柑桔品种 DNA 的 SRAP 扩增带型

注: M: DL 2000 DNA Marker; 1,9: 纽荷尔; 2,10: 德尔塔; 3,11: 福桔; 4,12: 本地早; 5,13: 宫本; 6,14: 大浦; 7,15: 岩溪晚芦; 8,16: 新生系 3 号; 1~8: 引物为 DN05/UP06; 9~16: 引物为 DN07/UP09

Figure 4 SRAP profiles amplified among DNA of 8 citrus cultivars by primer DN05/UP06 and DN07/UP09

Note: M: DL 2000 DNA Marker; 1,9: Newhall; 2,10: Delta; 3,11: Tangerina; 4,12: Succosa; 5,13: Miyamoto; 6,14: Oura; 7,15: Yanxiwanlu; 8,16: Ponkan varieties nucellar line No.3; 1~8: Primer DN05/UP06; 9~16: Primer DN07/UP09

多态性好,已广泛应用于植物分子生物学的各个领域。两种分子标记都是基于 PCR 的实验技术,因此 PCR 反应程序和反应体系对其结果有着重要的影响。目前使用的 SRAP 程序有两种,一种由 Li 与 Quiros (2001)建立,为了让两个引物与靶 DNA 更好的结合,前 5 个循环的退火温度较低(35<sup>o</sup>);另一种由 Budak 等 (2004) 所提出,整个反应过程退火温度一直保持 47<sup>o</sup>。这两种方法都能得到较好的扩增产物,重复性较好。但前者由于前 5 个循环退火温度较低,容易产生非特异性扩增;后者的特异性较好,稳定性更高。本研究吸取二者的优点,通过优化相关参数,建立了适合柑桔 SRAP 分析的最优扩增反应程序。ISSR 的反应程序比较固定,与 Fang 和 Roose (1997)、Fang 等 (1998)、Sankar 和 Moore (2001)、Shahsavari 等(2006)报道相比,除 Mg<sup>2+</sup> 浓度和退火温度外,其他扩增参数基本一致。Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1.6 mmol/L 时 PCR 反应的特异性最好,根据特定引物的 T<sub>m</sub> 值选择特定的退火温度 (T<sub>m</sub> 1.5<sup>o</sup>),在退火温度 52<sup>o</sup>~55<sup>o</sup> 获得了柑桔 ISSR-PCR 的最佳结果;此外,35 个扩增循环最适于柑桔 ISSR-PCR 分析。

ISSR 引物中含有重复序列,在延伸过程中容易产生滑动,造成拖带、背景模糊等现象,本研究在 PCR 反应体系加入 2%的甲酰胺和控制好银染显色的各个环节,有效地降低了背景的模糊程度。将本研究所用引物中的重复序列与 Jiang 等(2006)报道的柑桔基因组中的 SSR 出现频率相比较,可发现扩增效果较好的 ISSR 引物中的重复片段在柑桔基因组中有着较高的丰度,而基因组中丰度较低 SSR 序列对应的 ISSR 引物扩增结果不理想,因此在设计和筛选 ISSR 引物时可参考基因组中 SSR 的丰度,节省在引物设计上的时间和经费。

对于 PCR 产物的检测,本研究采用灵敏度较高的非变性 PAGE 电泳并对 PAGE 浓度进行了优化。SRAP-PCR 产物片段较小,10%的非变性 PAGE 效果最好;由于多数 ISSR-PCR 产物片段较大,采用 10%的非变性 PAGE 电泳难以将大片段产物分开,用 6%的非变性 PAGE 检测得到了很好的结果。与 Shahsavari 等 (2006) 采用变性 PAGE 电泳相比,非变性 PAGE 电泳检测减少了实验步骤,节约了实验成本。

本研究优化建立的 SRAP、ISSR 分子标记体系已成功地应用于构建 50 余个柑桔主栽优良品种的指纹图谱,初步建成了这些品种的标准指纹图谱数据库,同时,本研究也为遗传连锁图谱构建、遗传多样性分析、分子标记辅助育种等柑桔分子生物学

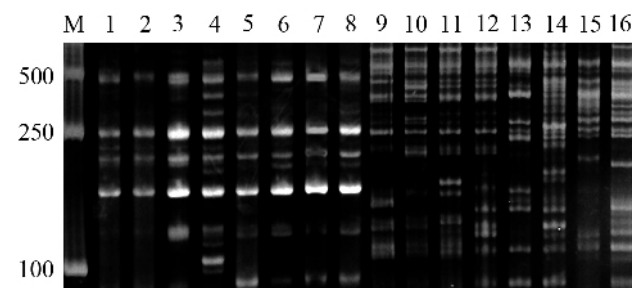


图 5 引物 IS03 和 IS39 对 8 个柑桔品种 DNA 的 ISSR 扩增带型

注: M: DL 2000 DNA Marker; 1,9: 纽荷尔; 2,10: 德尔塔; 3,11: 福桔; 4,12: 本地早; 5,13: 宫本; 6,14: 大浦; 7,15: 岩溪晚芦; 8,16: 新生系 3 号; 1~8: 引物为 IS03; 9~16: 引物为 IS39

Figure 5 ISSR profiles amplified among DNA of 8 citrus cultivars by primer IS03 and IS39

Note: M: DL 2000 DNA Marker; 1,9: Newhall; 2,10: Delta; 3,11: Tangerina; 4,12: Succosa; 5,13: Miyamoto; 6,14: Oura; 7,15: Yanxiwanlu; 8,16: Ponkan varieties nucellar line No.3; 1~8: Primer IS03; 9~16: Primer IS39

品种间多态性较丰富,亲缘关系相近的柑桔品种间 ISSR 谱带差异较明显。

## 2 讨论

SRAP 和 ISSR 是两种常用的分子标记技术,SRAP 技术简单、高效、稳定,ISSR 技术快速、可靠、

研究奠定了良好的基础。

## 参考文献

- Ahmad R., Potter D., and Southwick S.M., 2004, Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 129(2): 204-210
- Budak H., Shearman R.C., Gaussoin R.E., and Dweikat I., 2004, Application of sequence-related amplified polymorphism markers for characterization of turfgrass species, *HortScience*, 39(5): 955-958
- Dirlwanger E., Pronier V., Parvery C., Rothan C., Guye A., and Monet R., 1998, Genetic linkage map of peach (*Prunus persica* L. Batsch) using morphological and molecular markers, *Theor. Appl. Genet.*, 97(5-6): 888-895
- Fang D.Q., and Roose M.L., 1997, Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers, *Theor. Appl. Genet.*, 95(3): 408-417
- Fang D.Q., Krueger R.R., and Roose M.L., 1998, Phylogenetic relationships among selected citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 123(4): 612-617
- Hu T.J., Wang L., Feng X.L., and Pan Q.H., 2003, Molecular genetic studies on the rice blast fungus population-genetic structure of the rice blast fungus population consisted of five subpopulations selected from five counties in Guangdong province, *Zhongguo Nongye Kexue* (Agricultural Sciences in China), 36(12): 1476-1483 (胡铁柱, 王玲, 冯熙路, 潘庆华, 2003, 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究—由 5 个亚群体组成的广东省稻瘟病菌群体遗传结构的分析, *中国农业科学*, 36(12): 1476-1483)
- Jiang D., Zhong G.Y., and Hong Q.B., 2006, Analysis of microsatellites in citrus unigenes, *Journal of Genetics and Genomics*, 33(4): 345-353
- Lei T.G., He Y.R., Wu X., Liu X.F., Xu L.Z., Peng A.H., and Chen S.C., 2007, Identification of pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and hybrid citrus cultivars using SSR molecular markers, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 5(5): 720-724 (雷天刚, 何永睿, 吴鑫, 刘小丰, 许兰珍, 彭爱红, 陈善春, 2007, 利用 SSR 标记鉴定柚和杂柑品种, *分子植物育种*, 5(5): 720-724)
- Li G., and Quiros C.F., 2001, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica, *Theor. Appl. Genet.*, 103(2-3): 455-461
- Lin Z.X., Zhang X.L., Nie Y.C., He D.H., and Wu M.Q., 2003, Construction of genetic linkage map in cotton with SRAP, *Kexue Tongbao* (Chinese Science Bulletin), 48(15): 455-461 (林志旭, 张献龙, 聂以春, 贺道华, 吴茂清, 2003, 棉花 SRAP 遗传连锁图谱构建, *科学通报*, 48(15): 455-461)
- Nagaoka T., and Ogihara Y., 1997, Applicability of inter-simple sequence repeat markers in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers, *Theor. Appl. Genet.*, 94(5): 597-602
- Prevost A., and Wilkinson J., 1998, A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars, *Theor. Appl. Genet.*, 98(1): 107-112
- Ren Y., Wang D.Y., Zhang Y.D., Li Y., and Wang H.M., 2004, Optimization of SRAP-PCR in hot pepper, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 2(5): 689-693 (任羽, 王得元, 张银东, 李颖, 王恒明, 2004, 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化, *分子植物育种*, 2(5): 689-693)
- Riza A., Li G., Quresh Z., Swati M.S., and Quiros C.F., 2001, Genetic diversity of oilseed Brassica napus inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance, *Plant Breeding*, 120(5): 411-415
- Ruiz J.J., Garcia M.S., Pico B., Gao M.Q., and Quiros C.F., 2005, Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 130(1): 88-94
- Sankar A.A., and Moore G.A., 2001, Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in citrus and extension of the genetic linkage map, *Theor. Appl. Genet.*, 120(2-3): 206-214
- Shahsavari A.R., Izadpanah K., Tafazoli E., and Tabatabaei B.E., 2006, Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, *Scientia Horticulturae*, 112(3): 310-314
- Wu X.E., Fan M.T., Gong X., and Yang Y., 2006, The ISSR analysis of 22 citrus resources, *Yunnan Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Yunnan Agricultural University), 21(1): 36-41, 51 (吴兴恩, 范眸天, 龚洵, 杨杨, 2006, 22 份柑桔资源的 ISSR 分析, *云南农业大学学报*, 21(1): 36-41, 51)
- Wu Z.L., Fang L.Y., Wang J., and Shen Y.J., 2006, Analysis of relationship of 15 Vitis germplasm resources by ISSR markers, *Guoshu Xuebao* (Journal of Fruit Science), 23(4): 605-608 (吴子龙, 方连玉, 王军, 沈育杰, 2006, 15 份葡萄种质亲缘关系的 ISSR 分析, *果树学报*, 23(4): 605-608)
- Xuan J.P., Zhang Z., Fang J.G., Gao Z.H., and Che S.L., 2002, Construction of apple cultivar ISSR fingerprinting, *Guoshu Xuebao* (Journal of Fruit Science), 19(6): 421-423 (宣继萍, 章镇, 房经贵, 高志红, 车胜利, 2002, 苹果品种 ISSR 指纹图谱构建, *果树学报*, 19(6): 421-423)
- Zietkiewicz E., Rafalski A., and Labuda D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics*, 20(2): 176-183