

SRAP、ISSR 技术的优化及在甘蓝类植物种子鉴别中的应用 Optimization of SRAP & ISSR Technology and Its Application in the Identification of Seeds of *Brassica oleracea* L.

刘 冲^{1,2}, 葛才林², 任云英¹, 陈锦秀¹, 杨晓锋¹, 薄天岳^{1*}

LIU Chong^{1,2}, GE Cai-Lin², REN Yun-Ying¹, CHEN Jin-Xiu¹, YANG Xiao-Feng¹ and BO Tian-Yue^{1*}

1 上海市农业科学院园艺研究所, 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201106

2 扬州大学农学院, 扬州 225009

1 Horticultural Research Institute, SAAS, Shanghai Key Lab of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201106, China

2 Agricultural College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

摘 要 将 SRAP 与 ISSR 2 种分子标记技术应用于 8 种甘蓝类植物 (*Brassica oleracea* L.) 的种子鉴别中。先以甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 基因组 DNA 为模板, 通过对 SRAP、ISSR 反应体系中各影响因素的逐一筛选, 优化了甘蓝类植物 SRAP、ISSR 反应体系。进而采用 30 个 SRAP 引物组合和 15 个 ISSR 引物对白甘蓝、皱叶甘蓝、红甘蓝、羽衣甘蓝、花椰菜、青花菜、抱子甘蓝、球茎甘蓝的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增, 结果表明: M3-E5 与 M4-E5 两个 SRAP 引物组合可以在 8 种甘蓝类植物之间显示较高的多态性, 844 和 888 两个 ISSR 引物也可在 8 种甘蓝类植物之间产生很好的多态, 特别是 844 引物单独应用即可区分所有材料。

关键词 甘蓝类植物, SRAP, ISSR, 反应体系, 鉴别

中图分类号 S6351 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0657-05

Abstract In this study, the molecular marker technology of SRAP and ISSR were applied in rapid identification of seeds from eight species of *Brassica oleracea* L. Firstly, using the genomic DNA of cabbage as template, SRAP and ISSR reaction systems were optimized through testing every factor, respectively, that affects PCR amplification. Then, using the optimized reaction systems, 30 SRAP primer pairs and 15 ISSR primers were applied to amplify genomic DNA of cabbage, savoy, purple cabbage, borecole, cauliflower, broccoli, Brussels sprouts, and kohlrabi. The results showed that high polymorphisms were exhibited among the eight species of *Brassica oleracea* L. by SRAP primer pairs of M3-E5 and M4-E5, as well as ISSR primers of 844 and 888, especially primer 844 which can identify all eight materials efficiently.

Key words *Brassica oleracea* L., SRAP, ISS, reaction system, identify

甘蓝类植物种类繁多, 常见的有白甘蓝、皱叶甘蓝、茎甘蓝等, 它们属于芸薹属甘蓝种植物, 染色体数均为 18 条, 亲缘关系近, 种子形状相似程度高, 用常规

Received: December 6, 2005; Accepted: January 20, 2006.

This work was supported by the grants from the Basic Research Program of Shanghai Science and Technology Commission (No.03JC14060) and the Major Program of Shanghai Municipal Agricultural Commission (No.2004-2-5).

* Corresponding author. Tel: 86-21-52630102; E-mail: tybo@saas.sh.cn

上海市科委基础性研究计划项目(No.03JC14060)和上海市农委科技兴农重点攻关项目(2004-2-5)联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

方法很难将它们快速区分开,而分子标记技术如 RAPD、SRAP、ISSR 等,通过比较材料之间的扩增谱带,就可以较好地将其区分,既省时又可靠。SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 是基于 PCR 的一种新型分子标记技术,由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros 博士于 2001 年最先开发的^[1],该技术集 RAPD 与 AFLP 两技术优点于一体,具有简单、稳定、在基因组中分布均匀等特点,现已用于马铃薯、苹果、油菜、棉花等植物和水稻稻瘟病的研究^[1-5]。ISSR (inter-simple sequence repeat) 又称简单序列重复区间扩增,是利用真核生物基因组广泛存在的简单重复序列 (SSR) 设计引物,无需预知基因组序列,对所有作物均适用,并且实验成本低、操作简单、稳定性好、多态性丰富,现已广泛应用于基因定位、种子资源分类、生物遗传多样性分析和遗传图谱构建等研究领域^[6-9],但尚未见到在甘蓝上应用

的报道。本实验先对甘蓝类植物的 SRAP、ISSR 反应体系进行了优化,进而对八种甘蓝类植物 DNA 进行了比较扩增,获得了区分度较好的引物组合。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料为甘蓝类植物白甘蓝、皱叶甘蓝、红甘蓝、羽衣甘蓝、花椰菜、青花菜、抱子甘蓝、球茎甘蓝材料各一份,由上海市农业科学院园艺研究所提供。

1.2 试剂与仪器

实验所用的 PCR 试剂 (MgCl₂、PCR Buffer、dNTP、Taq E、Primer) 以及 SDS、Tris-HCl、EDTA、琼脂糖均购自上海生工生物工程有限公司,其中 SRAP 采用 Li 与 Quiros 等人发表的 5 个正向、6 个反向共计 11 个引物^[1],ISSR 采用易克等人报道的 15 个引物^[9],所有引物序列详见表 1。

表 1 SRAP、ISSR 引物序列

Table 1 The sequence of SRAP & ISSR primers

SRAP primers		ISSR primers	
No.	Sequences	No.	Sequences
M1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
M2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	813	CTCTCTCTCTCTCTT
M3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	816	CACACACACACACAT
M4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	818	CACACACACACACAG
M5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	825	ACACACACACACACT
E1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'	835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
E2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'	836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
E3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'	841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
E4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'	844	CTCTCTCTCTCTCTRC
E5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'	853	TCTCTCTCTCTCTCRT
E6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'	858	TGTGTGTGTGTGTGTRT
		881	GGTGGGTGGGGTG
		887	DVDICTCTCTCTCTC
		888	BDBCACACACACACA
		890	VHVGTGTGTGTGTGT

Note :R=(A,G);Y=(C,T);B=(C,G,T)(i.e. not A);D=(A,G,T)(i.e. not C);H=(A,C,T)(i.e. not G);V=(A,C,G)(i.e. not T).

实验所用仪器为: Mastercycler 5333 和 Mastercycler gradient 两种型号 PCR 仪, PowerPac Basic™ EN61010-1 电泳仪, Gel Doc™ EQ 170-8060 凝胶成像仪及 UV-100 紫外可见分光光度计等。

1.3 基因组 DNA 的提取

参照经典的 SDS 方法^[10], 略加改进后直接从甘蓝类植物种子中提取基因组 DNA。

1.4 PCR 扩增及其电泳分析

SRAP 扩增反应初始体系参照林忠旭等人应用 SRAP 技术在棉花上的研究^[2], 初始扩增程序参照文献 [1]; ISSR 扩增反应初始体系和扩增程序参照易

克等人应用于西瓜的研究^[9]。

SRAP、ISSR 扩增产物电泳分析均采用浓度为 15g/L 的琼脂糖凝胶 (含 0.15μg/mL EB), 电泳缓冲液为 1×TAE, 保持 90V 恒压 (4~5V/cm) 电泳, 待指示色带移至胶板前端约 2/3 处时, 进行凝胶成像分析。

1.5 PCR 扩增程序调整及反应体系优化

进行 PCR 扩增程序调整时, 分别选择具有代表性的 SRAP 与 ISSR 扩增程序进行比较, 根据结果, 适当调整, 获得适用于甘蓝且扩增效果较好的扩增程序。

进行 PCR 反应体系优化时, 以调整后的程序和

1.4 中所述的 PCR 反应体系为基础,参照结球甘蓝 RAPD 反应条件优化实验^[11],对模板 DNA、Primer、 Mg^{2+} 、dNTP、Taq E 等因素的用量逐个进行筛选比较,获得甘蓝类植物 SRAP、ISSR 的优化反应体系。

2 结果与分析

2.1 SRAP 与 ISSR 扩增程序的比较选择

SRAP 技术在国内应用的报道为数不多,在水稻、棉花应用研究中采用的 SRAP 扩增程序均与 Li 报道的程序一致^[1-5],黄瓜 SRAP 遗传图谱构建研究中所用的扩增程序不同于 Li,但同样获得很好的扩增效果^[12]。本实验以甘蓝基因组 DNA 为模板,选择 SRAP 引物组合 M_3-E_4 ,对两程序进行比较,结果两程序都能成功扩增产生丰富的带型,但利用潘等人的程序扩增产物多呈弱带,背景较为模糊,而利用 Li 等人的程序扩增产物条带清晰且主带呈亮带。经过比较调整,确定的甘蓝 SRAP 扩增的程序为: $94^{\circ}C$ 5min; $94^{\circ}C$ 1min, $35^{\circ}C$ 1min, $72^{\circ}C$ 1.5min (5 cycles); $94^{\circ}C$ 1min, $48^{\circ}C$ 1min, $72^{\circ}C$ 1.5min (35 cycles); $72^{\circ}C$ 10min。

ISSR 技术在国内已广泛应用。本实验以甘蓝基因组 DNA 为模板,选择 ISSR 引物 853,比较邱英雄^[7]、李海生^[8]、易克^[9]等人报道的 ISSR 程序,结果三个程序均可以成功扩增并产生较为丰富的带型,但利用李报道程序的扩增产物多呈弱带,可能是由于退火和延伸时间较短;另外两程序扩增效果相当,但利用易报道程序的扩增产物检验略显模糊,可能是退火时间较长,导致非特异扩增较多。所以,从节约时间角度考虑,将甘蓝 ISSR 扩增的程序调整为: $94^{\circ}C$ 5min; $94^{\circ}C$ 1min, $50^{\circ}C$ 1min, $72^{\circ}C$ 1.5min (40 cycles); $72^{\circ}C$ 10min。

由于 ISSR 引物之间的退火温度差异较大,且实验表明引物的最佳退火温度与理论计算得到的适宜退火温度有差异。因此,本实验以甘蓝基因组 DNA 为模板,利用调整后的 ISSR 扩增程序对所有引物进行扩增,确定其最佳退火温度。ISSR 引物共计 15 个,其中引物 808、890 不能成功扩增,可能对甘蓝不适用,其余引物均确定了最佳退火温度:引物 813 和 887 为 $47.5^{\circ}C$;引物 816 为 $47.0^{\circ}C$;引物 818 和 835 为 $46.5^{\circ}C$;引物 825 和 841 为 $56.0^{\circ}C$;引物 836 为 $57.0^{\circ}C$;引物 844、853 和 888 为 $50.0^{\circ}C$;引物 858 为 $44.0^{\circ}C$;引物 881 为 $54.5^{\circ}C$ 。

2.2 SRAP、ISSR 反应体系的优化

利用调整得到的扩增程序和 ISSR 引物的最佳

退火温度,对 SRAP、ISSR 反应体系中各因素用量进行筛选,以扩增产物量大、带型丰富、条带清晰并尽量避免或减少非特异扩增为原则,根据扩增结果,结合经济角度综合考虑优化了 SRAP 和 ISSR 的反应体系。总体积为 $20\mu L$ 的 SRAP 反应体系是: $25mmol/L$ $MgCl_2$ $2\mu L$ + $10 \times$ PCR Buffer $2\mu L$ + $10mmol/L$ dNTP $0.4\mu L$ + $5u/\mu L$ Taq E $0.2\mu L$ + $30ng$ 正向 Primer + $30ng$ 反向 Primer + $25ng$ 模板 DNA,其余体积以灭菌双蒸水补齐;总体积为 $20\mu L$ 的 ISSR 反应体系是: $25mmol/L$ $MgCl_2$ $1.8\mu L$ + $10 \times$ PCR Buffer $2\mu L$ + $10mmol/L$ dNTP $0.4\mu L$ + $5U/\mu L$ Taq E $0.3\mu L$ + $30ng$ Primer + $30ng$ 模板 DNA,其余体积以灭菌双蒸水补齐。

2.3 SRAP 与 ISSR 技术在甘蓝类植物快速鉴定中的应用

将调整后的程序和优化的体系试用于甘蓝类植物,以白甘蓝、皱叶甘蓝、红甘蓝、羽衣甘蓝、花椰菜、青花菜、抱子甘蓝、球茎甘蓝的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增产物带型丰富、条带清晰,且能产生较好的多态,说明程序和反应体系对甘蓝类植物均适用。在此基础上,对上述八份材料进行 SRAP、ISSR 扩增分析,以获得区分度较好的特异引物或特征条带。实验中材料的排列顺序为白甘蓝、皱叶甘蓝、红甘蓝、羽衣甘蓝、花椰菜、青花菜、抱子甘蓝、球茎甘蓝,分别用数字 1~8 代表,见图 1、图 2。实验中采用 30 个 SRAP 引物组合对上述八份材料进行比较扩增,其中正向引物 M_5 与反向引物 $E_1 \sim E_6$ 组成的 6 个组合扩增产物呈现弱带或单条带的现象,可见引物 M_5 对甘蓝类植物不适用;其余引物组合都能扩增产生丰富的带型,并且材料之间呈现一定的差异,尤其是引物组合 M_3-E_5 (图 1-左)、 M_4-E_5 (图 1-右)对八份材料的扩增带型差异明显,其中青花菜与球茎甘蓝的扩增带较弱,其余材料的扩增带型清晰,结合 M_3-E_5 、 M_4-E_5 两组合的扩增结果可将八份材料一一区分开。

实验中采用 15 个 ISSR 引物对上述八份材料进行比较扩增,扩增时采用的退火温度为 2.1 中确定的最佳温度,结果表明:引物 858 扩增产物较模糊,可能是较低的退火温度导致非特异扩增较多;引物 825、887 扩增产物呈弱带;其余引物扩增产物带型丰富、条带清晰。图 2-左为引物 888 扩增结果,各材料均扩增产生 6~10 条带,且多呈强带,但材料间带型相似、差异不大;图 2-右为引物 844 扩增结果,除羽衣甘蓝扩增带较弱,其余材料均呈强带,且条带清

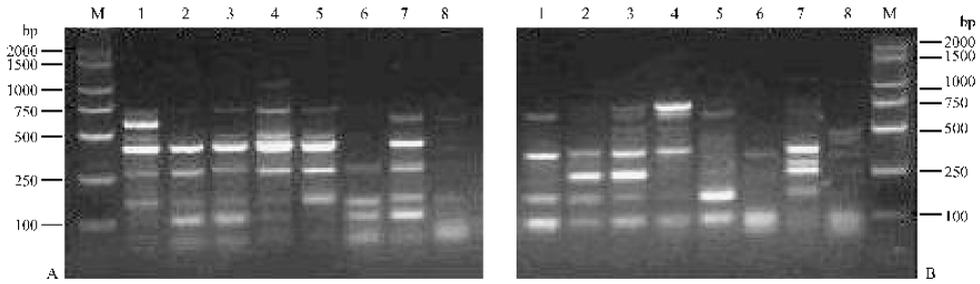


图1 甘蓝类植物 SRAP 扩增结果

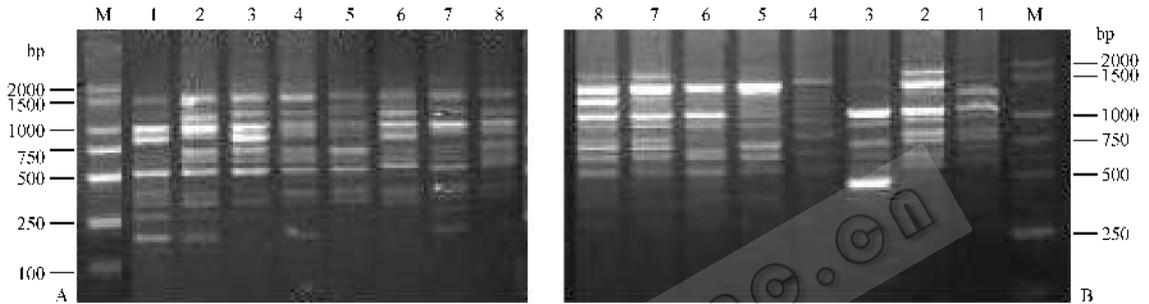
Fig.1 The results of SRAP amplified on *Brassica oleracea* L.

图2 甘蓝类植物 ISSR 扩增结果

Fig.2 The results of ISSR amplified on *Brassica oleracea* L.

晰差异明显,仅靠引物 844 即可把八种甘蓝类植物逐一鉴别出来。

为方便应用 ISSR 引物 844 鉴别甘蓝类植物,根据扩增产物电泳检测图(图 2-右),以 1 和 0 分别代表某个等位基因位点扩增出的 DNA 条带的有无,按照从小片段向大片段的读带方向,将引物 844 对各材料的扩增图谱转换为由 1 和 0 组成的字符串,即构成数字指纹(表 2)。从表 2 可知,材料之间的差异可以通过字符串的排列顺序而得到清楚的表达。

表 2 ISSR 引物 844 扩增结果的数字指纹

Table 2 The digital form of amplified results by ISSR primer 844

Materials	Digital fingerprinting
Wight cabbage	001011111000
Savoy	010101111011
Purple cabbage	110101011000
Borecole	000100110010
Cauliflower	010101011010
Broccoli	010110011010
Brussels sprouts	010101111011
kohlrabi	010101111111

3 讨论

SRAP 是一种新型的标记系统,该技术采用复性

变温法:前 5 个循环复性温度为 35℃,确保引物与靶 DNA 部分配对,随后的 30 个循环中将复性温度提升至 50℃,可保证前 5 个循环的扩增产物在余下的循环中呈指数式增加^[1]。由于该技术具有简单、高效、易测序等优点,国外已广泛使用,而国内现仅用于棉花等少数物种^[13]。ISSR 标记技术快速、可靠,能揭示出比 RAPD、RFLP、SSR 更好的多态,现已广泛应用于多种物种,但尚未见到在甘蓝上应用的报道^[14]。本实验优化了甘蓝类植物的 SRAP、ISSR 两种分子标记技术的反应体系,并成功应用于八种甘蓝类植物 DNA 水平上的快速鉴别,M3-E5、M4-E5 两个 SRAP 引物组合以及 844、888 两个 ISSR 引物均可在八种甘蓝类植物之间显示较高的多态性,特别是 844 引物单独应用即可把八种甘蓝类植物逐一鉴别出来,这一结果为解决生产中甘蓝类植物种子难以区分的问题提供了快速有效的方法,具有重要的实用价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Li G, Quiricos CF. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Thero Appl Genet*, 2001, **103**: 455 - 461

- Evaluation of application of new molecular marker SRAP on analysis of F2 segregation population and genetic diversity in cotton. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2004, **31**(6): 622-626
- [3] Li Z, Zhang X, Nie Y *et al.* Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48**(19): 2063-2067
- [4] Hu TZ(胡铁柱), Wang L(王玲), Feng XL(冯熙路) *et al.* Molecular genetic studies on the rice blast fungus population—Genetic structure of the rice blast fungus population consisted of five sub-populations selected from five counties in Guangdong province, China. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2003, **36**(12): 1476-1483
- [5] Pan QH(潘庆华), Hu TZ(胡铁柱), Wang L(王玲) *et al.* Molecular genetic studies on the rice blast fungus population—DNA fingerprinting and pathotype analysis of the isolates selected from the region-specific lineages of Guangdong province, China. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2003, **37**(1): 57-64
- [6] Zhang LR(张立荣), Xu DQ(徐大庆), Yang WX(杨文香). ISSR molecular marker for the leaf rust resistance gene Lr37 in wheat. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2004, **12**(1): 86-89
- [7] Qiu YX(邱英雄), Hu SQ(胡绍庆), Chen YL(陈跃磊) *et al.* Studies on cultivar classification of *Osmanthus fragrans* by ISSR-PCR analysis. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2004, **31**(4): 529-532
- [8] Li HS(李海生), Chen GZ(陈桂株). Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan Island based on ISSR analysis. *Acta Ecologica Sinica*(生态学报), 2004, **24**(8): 1657-1663
- [9] Yi K(易克), Xu XL(徐向利), Lu XY(卢向阳). Construction of molecular genetic map of watermelon by SSR and ISSR technology. *Journal of Hunan Agricultural University*(Natural Sciences)(湖南农业大学学报,自然科学版), 2003, **29**(4): 333-337
- [10] Wang GL(王关林), Fang HJ(方宏筠). Plant Genetic Engineering Principle and Technology. Beijing: Science Press, 1998, pp.370-375
- [11] Liu C(刘冲), Bo TY(薄天岳), Ge CL(葛才林) *et al.* Optimization of RAPD reaction system for cabbage. *Acta Agriculturae Shanghai*(上海农业学报), 2005, **21**(3): 114-117
- [12] Pan JS(潘俊松), Wang G(王刚), Li XZ(李效尊) *et al.* Construction of genetic linkage map and gene mapping of branch characteristics in cucumber by SRAP. *Science in China Ser. C Life Sciences*(中国科学 C 辑生命科学), 2004, **34**(6): 510-516
- [13] Liu LW(柳李旺), Gong YQ(龚义勤), Huang H(黄浩) *et al.* Novel molecular systems—SRAP and TRAP and their application. *Hereditas*(遗传), 2004, **26**(5): 777-781
- [14] Wang JB(王建波). ISSR marker and their applications in plant genetics. *Hereditas*(遗传), 2002, **24**(5): 613-616