

安佰义,王 迦,王 嫚,等. 李种质资源 ISSR 反应体系引物筛选[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):63-65.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.014

# 李种质资源 ISSR 反应体系引物筛选

安佰义<sup>1</sup>, 王 迦<sup>1</sup>, 王 嫚<sup>1</sup>, 于慧颖<sup>1</sup>, 范爱淇<sup>1</sup>, 张艳波<sup>2</sup>, 张 艳<sup>3</sup>, 李 锋<sup>2</sup>

(1. 吉林农业大学园艺学院, 吉林长春 130118; 2. 吉林省农业科学院果树研究所, 吉林长春 130033; 3. 吉林省农业科学院, 吉林长春 130124)

**摘要:**以李 18 个品种种质资源为试验材料, 对其开展 ISSR 反应体系引物筛选, 结果表明, 从 41 个随机引物中筛选出 25 个多态性引物用于 PCR 扩增, 每个多态性引物扩增出的条带数在 8~23 条之间, 扩增出的 DNA 片段长度大多在 150~2 400 bp 之间; 共扩增出条带数为 385 条, 其中, 样品间相同的条带数为 53 条; 所选引物的多态位点百分率为 86.23%。

**关键词:**李; 种质资源; ISSR; 引物; 多态位点

**中图分类号:** S662.302.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0063-03

区间简单重复序列标记(inter-simple sequence repeat, ISSR)是一种微卫星基础上的第 2 代分子标记技术, 其基本原理是用锚定的微卫星 DNA 为引物, 在简单重复序列(SSR)的 3'端或 5'端各加 2~4 个非重复随机核苷酸序列作为引物, 在聚合酶链式反应(PCR)中锚定引物可引起特定位点退火, 并对重复序列间的 DNA 片段进行 PCR 扩增<sup>[1-3]</sup>。ISSR 标记结合了随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、SSR 技术的优点, 具有模板 DNA 用量少、引物设计简单、成本低、PCR 扩增产物多态性丰富、产物重复性和稳定性好、试验安全性较高及技术难度较低等特点<sup>[4]</sup>, 现已在植物遗传作图、基因定位、品种鉴定、遗传多样性及亲缘关系分析等方面被广泛应用<sup>[5-9]</sup>。

我国是李的起源地之一, 有着非常丰富的李种质资源, 是李种质遗传多样性中心<sup>[10]</sup>。李是优良的蜜源植物, 其叶簇、花朵、果实有一定的观赏价值, 可作庭园绿化树种<sup>[11]</sup>。中国李对土壤要求不严格, 适应性好, 生长迅速, 结实期早, 产量高, 抗防腐病力强, 果实耐贮藏, 被世界各国引种栽培, 并作为培育李的重要亲本, 而在长期选育过程中, 李的亲缘关系复杂<sup>[12]</sup>。本试验对李种质资源基因组进行 ISSR-PCR 扩增, 以期筛选出扩增良好的引物, 对李种质资源亲缘关系的鉴定及研究能提供有益的参考。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

18 份李种质资源, 由国家果树种质公主岭寒地果树资源圃提供, 试验编号及种质名称见表 1。试验引物共 41 个(表 2), 参照哥伦比亚大学公布的 ISSR 引物序列, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 植物基因组 DNA 的提取

采用十二烷基苯磺酸钠(SDS)法提取植物基因组 DNA。2016 年 5 月, 自李树刚萌发的新梢上采集幼嫩叶片, 液氮速冻, 置于 -80℃冰箱中保存, 备用; 取适量叶片, 液氮条件下

表 1 用于 ISSR 分子标记引物筛选的 18 份李种质资源

编号	名称	编号	名称	编号	名称
1	牛心李	7	砭门伏李	13	麦芽黄
2	铁把	8	孔雀蛋实生	14	紫肉李
3	吉林二道沟老杏梅	9	美丽李	15	香蕉李
4	二场干脆李	10	石人李	16	公主红
5	李子梅	11	牡丹江 1 号	17	92-1-3
6	本园无名	12	向阳红	18	92-1-10

研磨至粉末状, 装于 2 mL 离心管, 加入 Buffer A 提取液, 立即混匀; 65℃水浴 16 min, 其间摇动离心管 2 次; 取出离心管, 冷却至室温, 加入体积比为 25:24:1 的酚、三氯甲烷、异戊醇混合液 800 μL, 轻轻摇匀 2~3 min; 12 000 r/min 离心 8 min, 上清转移至 1.5 mL 离心管中, 尽量不要触动中间蛋白层; 加入 0.7 倍体积的异丙醇至上清液中, 轻轻混匀, 直至絮状沉淀产生; 用毛细管勾出絮状沉淀, 转移至装有 200 μL 70%乙醇的 1.5 mL 离心管中进行洗涤; 吸干离心管中乙醇, DNA 在管中自然晾干; 加入 200 μL 含 RNA 酶的 1×TE 缓冲液以充分溶解 DNA, 4℃或 -20℃保存, 备用。

### 1.3 PCR 扩增与电泳检测

反应体系总体积为 10 μL, 分别为 10×上样缓冲液 (loading buffer) 1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 0.2 μL, 0.4 μmol/L 引物 (Primer) 0.4 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.1 μL, 50 ng/μL DNA 模板 2 μL, 用双蒸水补足 10 μL。扩增程序参照文献[12], 并稍作修改, 95℃预变性 4 min; 95℃变性 30 s, 45~61℃退火 45 s (退火温度见表 2), 72℃延伸 2 min, 共 34 个循环; 72℃延伸 10 min。扩增产物 4℃保存, 经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳液为 1×TAE 缓冲液, DL 2000 为 DNA 分子量标准, 电压为 135 V, 电泳时间为 50 min; 电泳结果采用凝胶成像系统拍照记录, 每个引物的扩增产物呈稳定而清晰的条带作为统计数据, 有条带的记为“1”, 无条带的记为“0”; 将数据输入计算机, 对其进行统计分析。

## 2 结果与分析

由图 1、图 2、图 3 可见, 不同的生物基因组可使用同 1 个引物, 而对某一特定的基因组, 不同引物的扩增效率是不同

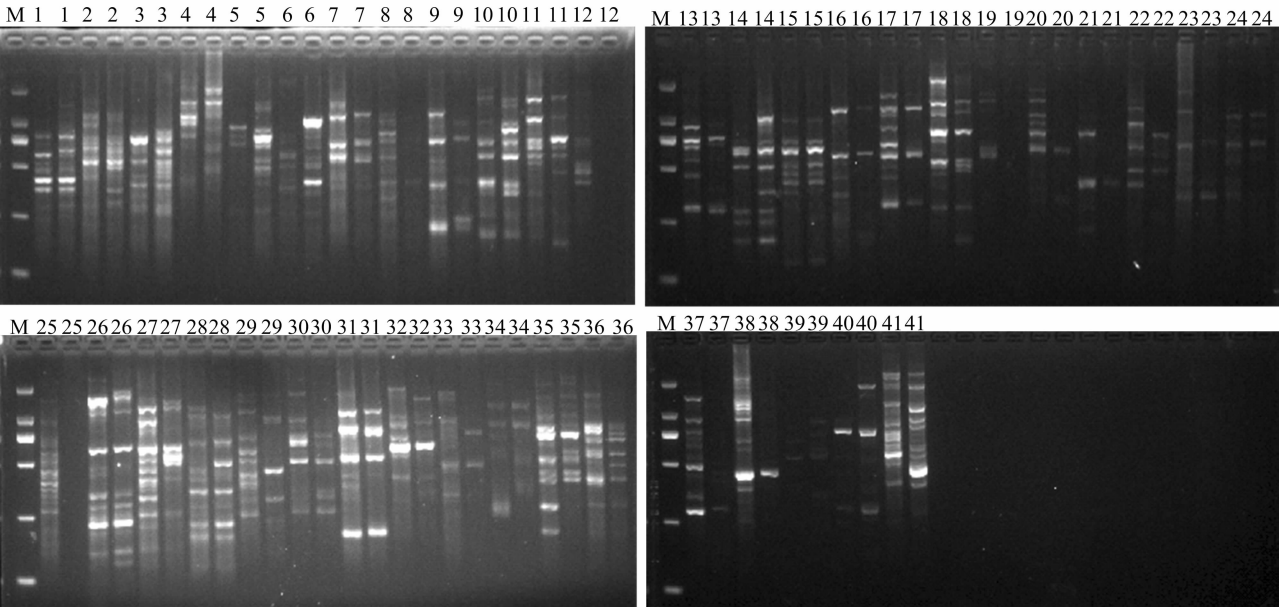
收稿日期: 2018-01-31

基金项目: 吉林省重点科技攻关项目 (编号: 20160204031NY)。

作者简介: 安佰义 (1978—), 男, 山东日照人, 博士, 副教授, 从事园林植物种质资源及栽培生理研究。E-mail: lili10437@126.com。

表 2 筛选引物的名称、碱基序列及退火温度

编号	名称	序列(5'→3')	退火温度(℃)	编号	名称	序列(5'→3')	退火温度(℃)
1	UBC807	AGAGAGAGAGAGAGACT	50.7	22	UBC848	CACACACACACACARG	55.0
2	UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50.7	23	UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGYC	55.0
3	UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	53.8	24	UBC852	TCTCTCTCTCTCTCTCRA	52.3
4	UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50.7	25	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCTCART	52.3
5	UBC815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	53.8	26	UBC854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG	55.0
6	UBC818	CACACACACACACACAG	53.8	27	UBC855	ACACACACACACACACYT	52.3
7	UBC820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	53.8	28	UBC856	ACACACACACACACACYA	52.3
8	UBC821	GTGTGTGTGTGTGTGTT	50.7	29	UBC857	ACACACACACACACACYG	55.0
9	UBC825	ACACACACACACACACT	50.7	30	UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT	52.3
10	UBC827	ACACACACACACACACG	53.8	31	UBC859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	55.0
11	UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52.3	32	UBC860	TGTGTGTGTGTGTGTGRA	52.3
12	UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	55.0	33	UBC864	ATGATGATGATGATGATG	47.8
13	UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	52.3	34	UBC868	GAAGAAGAAGAAGAA	47.8
14	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52.3	35	UBC873	GACAGACAGACAGACA	50.7
15	UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	55.0	36	UBC876	GATAGATAGACAGACA	45.0
16	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	55.0	37	UBC879	CTTCACTTCACTTCA	45.0
17	UBC843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	52.3	38	UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	52.3
18	UBC844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	55.0	39	UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG	61.0
19	UBC845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	55.0	40	UBC899	CATGCTGTTGGTCATTGTTCCA	57.9
20	UBC846	CACACACACACACACART	52.3	41	UBC900	ACTTCCCCACAGTTAACACA	57.9
21	UBC847	CACACACACACACACARC	55.0				



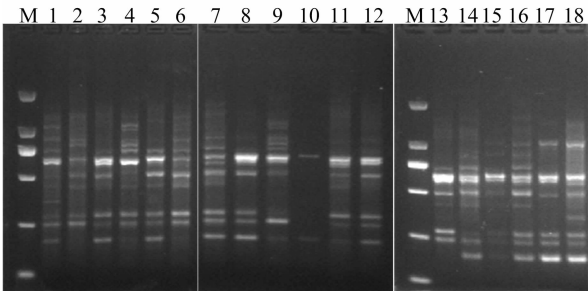
1~41分别为相应试验编号的引物；M—marker；同一编号中，前者为向阳红，后者为 92-1-10  
图1 41个引物对李种质资源向阳红、92-1-10的筛选扩增结果

的,引物扩增效率的高低由其产生的多态性条带数决定。由表 3 可见,41 个引物中可筛选出 25 个多态性高的引物用于扩增,这 25 条引物分别为 UBC807、UBC810、UBC811、UBC812、UBC815、UBC818、UBC821、UBC825、UBC827、UBC834、UBC835、UBC836、UBC841、UBC842、UBC843、UBC844、UBC845、UBC846、UBC847、UBC848、UBC856、UBC857、UBC859、UBC873、UBC881;25 个多态性引物对 18 份李种质资源进行 PCR 扩增,扩增出的条带数在 8~23 条之间,扩增出的分子量大多在 150~2 400 bp 之间;共扩增出条

带数为 385 条,其中样品间相同的条带数有 53 条,呈多态性的条带数为 332 条,平均多态位点百分率为 86.23%;扩增出的多态性条带占比在 55.56%~100.00% 之间,其中,引物 UBC812、UBC815、UBC821、UBC844、UBC848、UBC881 扩增出的条带多态性相对较好,多态性条带占比达到 100.00%。

3 结论与讨论

目前,应用分子生物学技术对李种质资源的研究已取得较大进展。ISSR 分子标记技术具有操作简单、可靠性强、重



1~18 分别为相应试验编号的李种质；M—marker。图 3 同  
图2 引物 UBC834 对 18 份李种质的扩增结果

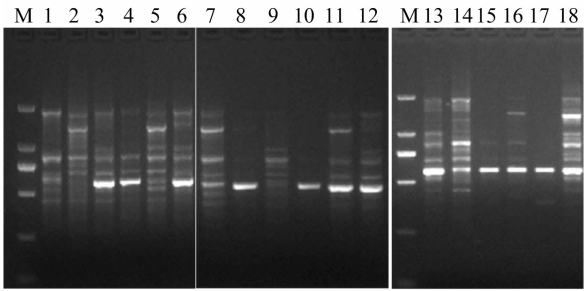


图3 引物 UBC848 对 18 份李种质资源的扩增结果

表 3 25 个引物对 18 份李种质资源的扩增结果

引物名称	总带数 (条)	多态带数量 (条)	多态带占比 (%)	引物名称	总带数 (条)	多态带数量 (条)	多态带占比 (%)
UBC807	13	11	84.62	UBC842	16	14	87.50
UBC810	14	13	92.86	UBC843	9	8	88.89
UBC811	18	17	94.44	UBC844	22	22	100.00
UBC812	16	16	100.00	UBC845	23	19	82.61
UBC815	14	14	100.00	UBC846	17	11	64.71
UBC818	8	6	75.00	UBC847	13	9	69.23
UBC821	12	12	100.00	UBC848	12	12	100.00
UBC825	14	13	92.86	UBC856	11	8	72.73
UBC827	19	18	94.74	UBC857	18	17	94.44
UBC834	17	16	94.12	UBC859	15	12	80.00
UBC835	20	12	60.00	UBC873	22	20	90.91
UBC836	9	5	55.56	UBC881	15	15	100.00
UBC841	18	12	66.67	合计	385	332	86.23

复性高等特点,但运用 ISSR 分子标记技术时,每个引物在不同物种上的扩增效率不同,引物的多态性水平越高,则说明物种的种质资源越丰富。因此,针对不同物种筛选出条带清晰、稳定性高的引物是必不可少的<sup>[13]</sup>。本试验筛选出的引物多态性程度相对较高,平均多态位点百分率为 86.23%,说明李种质资源的遗传基础较为广泛,种质资源较为丰富,这可能与我国是李属植物的起源中心且自然分布较广有关;从 41 个引物中筛选出的 25 个引物能够很好地反映出供试李种质资源的差异性,扩增出的条带多态性占比在 55.56% ~ 100% 之间,其中,引物 UBC812、UBC815、UBC821、UBC844、UBC848、UBC881 扩增出的条带可用于多态性标记,与刘威生等的研究结果<sup>[9,14]</sup>基本一致。

参考文献:

[1] 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.  
[2] 张玉星,马艳芝,赵国芳. 简单重复序列间扩增分子标记技术及其应用[J]. 生物技术通报,2009(9):54 - 56.  
[3] 宋晓兵,彭埃天,刘景梅,等. ISSR 分子标记及其在中国南方果树上的应用[J]. 广东农业科学,2009(7):199 - 201.  
[4] Fang D Q,Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars

with inter - simple sequence repeat markers [J]. Theoretical and Applied Genetics,1997,95(3):408 - 417.  
[5] 周亚星,周 伟. ISSR 分子标记技术在作物遗传育种中的应用[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2011,26(6):682 - 684.  
[6] 王 绪,邓俭英,方锋学. ISSR 分子标记技术及其在园艺作物中的应用[J]. 广西农业科学,2007,38(4):371 - 374.  
[7] 孙淑霞,李 靖,陈 栋,等. ISSR 分子标记技术在桃品种鉴定中的应用[J]. 中国农学通报,2011,27(4):173 - 177.  
[8] 马丹慧. 杏种质资源亲缘关系及分类地位的 ISSR 和 SSR 分子标记研究[D]. 长春:吉林农业大学,2007.  
[9] 刘威生. 李种质资源遗传多样性及主要种间亲缘关系的研究[D]. 北京:中国农业大学,2005.  
[10] 李洪果. 李、杏、杏李 S 基因型确定及其在种间杂交亲本选择中的应用[D]. 长沙:中南林业科技大学,2010.  
[11] 贺全红,陈 灏,邓 红,等. 李树栽培技术要点[J]. 特种经济动植物,2012,15(3):46 - 48.  
[12] 冯晨静. 李种质资源 RAPD、SSR、ISSR 亲缘关系鉴定及遗传多样性研究[D]. 保定:河北农业大学,2005.  
[13] 余 艳,陈海山,葛学军. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报,2003,11(1):15 - 19.  
[14] 王 进,何 桥,欧 毅,等. 李种质资源 ISSR 鉴定及亲缘关系分析[J]. 果树学报,2008,25(2):182 - 187.