

苹果柱型基因的 ISSR 分子标记研究

朱元娣¹ 李光晨¹ 李春雨¹ 董利民² 王 涛^{2*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; ² 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘 要: 以普通型苹果品种‘富士’和柱型苹果‘舞姿’以及其杂交后代的柱型与非柱型实生苗为试材, 建立了苹果的 ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat polymorphic DNA) 分子标记体系, 并将 ISSR 标记用于苹果柱型基因 *Co* 的遗传分析。结果表明, 在 20 μL 反应体系中各组分的用量为 Taq DNA 聚合酶 1U、 Mg^{2+} 的浓度为 2.5 mmol L^{-1} 、模板 DNA 用量 20 ng、引物浓度 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 及退火温度 52 $^{\circ}\text{C}$, 80% 引物具有良好的扩增能力。调整模板 DNA 的用量、引物浓度及退火温度能够优化苹果 ISSR-PCR 扩增体系。从所筛选的 65 个引物中获得了 35 个 ISSR 标记, 其中 33 个标记呈现 1:1 分离, 可用于苹果柱型基因的遗传分析。

关键词: 苹果; 柱型苹果; 柱型基因; 遗传分析; ISSR 标记

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0505-06

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat polymorphic DNA, 内部简单序列重复多态性 DNA) 是一种新的遗传标记技术, 依赖于植物真核基因组中丰富的简单序列重复 (SSRs), 由 2~4 个随机的核苷酸锚定在微卫星序列如 $(\text{AC})_n$ 或 $(\text{GA})_n$ 的 3' 或 5' 端, 由此组成的单引物进行重复序列间 DNA 的 PCR 扩增^[1]。扩增的产品由聚丙烯酰胺凝胶分离、放射自显影或用琼脂糖凝胶电泳、EB 染色等方法检出。该标记技术克服了 RFLP、SSR 和 RAPD 的技术性限制, 具有操作简单、可重复性高、模板 DNA 用量少等优点^[2~5]。ISSR 标记符合孟德尔遗传, 不仅用于生物分类学和系统发育的比较研究, 也是有应用潜力的遗传作图工具, 已应用于果树遗传学研究的各方面, 如苹果、梨品种鉴定^[6,7]、核桃品种遗传关系的确定^[8]、李和板栗品种的表现型分类鉴定^[9,10]、醋栗属植物的遗传多样性分析^[11]、葡萄品种无性系的区分^[12,13]和柑橘、欧洲板栗遗传连锁图谱的构建^[10,14,15]。

柱型苹果是‘威赛克’ (McIntosh Wijcik) 及以威赛克为亲本杂交所选育的芭蕾苹果的几个品种的总称^[16]。由于它具有新梢节间极紧凑、短枝及叶丛枝多、侧生延长枝少或无、自然单干树型的特点, 区别于目前生产上常见的普通型和短枝型品种, 特别适合苹果矮化密植生产^[17]。关于柱型苹果遗传特性的研究最初以形态学分析为主, 根据新梢节间长度、树体高度、侧枝有无或多少、短枝数量等形态指标, 以金冠和威赛克为亲本进行正交、反交测验以及用威赛克和其他品种杂交, 对所得到的杂交后代调查分析, 确认柱型苹果极紧凑的生长特性是受单显性的 *Co* 基因控制, 一个或几个修饰基因共同作用^[18,19]。随着分子标记技术在果树育种领域的应用, 柱型基因 *Co* 的研究也在形态学研究的基础上, 利用各种 DNA 分子标记方法, 在 DNA 分子水平研究 *Co* 基因的遗传^[20,21], 期望在柱型苹果的分子育种领域获得突破, 为 *Co* 基因的克隆、测序及遗传转化打下基础。

作者以苹果栽培品种‘富士’ (普通型) 和‘舞姿’ (柱型) 以及其杂种实生苗后代的柱型单株与非柱型单株为试材, 建立适合于苹果的 ISSR 标记分析体系, 为将 ISSR 标记用于苹果柱型基因 *Co* 的遗传分析打下基础。

收稿日期: 2003-01-24; 修回日期: 2003-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970526)

* 通讯作者: Wangt @cau.edu.cn

1 材料与方法

试验材料为苹果普通型品种‘富士’和柱型品种‘舞姿’及其杂种实生苗后代的柱型单株 20 个与非柱型单株 20 个, 分别提取叶片总 DNA。利用集团分离分析 (Bulked segregant analysis, BSA) 方法, 等量混合柱型单株与非柱型单株的 DNA, 构建柱型基因池 P_c 和非柱型基因池 P_s 。叶片总 DNA 提取参照祝军的改进方法^[21], 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的吸光值, 确定 DNA 浓度和质量, 并将样品冷藏于 -20°C 备用。

ISSR 引物购于加拿大的 University of British Columbia, 编号为 UBC801 ~ UBC900 共 100 个; Taq DNA Polymerase、Buffer ($10\times$)、 MgCl_2 (25 mmol L^{-1})、dNTP (10 mmol L^{-1}) 购于鼎国生物技术发展中心及华美生物技术公司。扩增在美国应用生物技术公司生产的 Gene Amp. PCR system 9700 上进行。PCR 的扩增产物经 $1.8\% \sim 2\%$ 的琼脂糖凝胶电泳、EB 染色, 凝胶成像扫描保存。

2 结果与分析

2.1 苹果 ISSR 引物初选反应体系的建立

参照 ISSR 引物在小麦、水稻、玉米和柑橘等作物上的 PCR 反应体系^[2~5], 通过预备试验, 确定各个反应组分的用量, 即是在 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的反应体积中加入 20 ng DNA、 1 U Taq 聚合酶、 $10\times$ Buffer (含 MgCl_2) $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 0.2 mmol L^{-1} dNTP、 $0.2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ Primer 和 ddH_2O 。PCR 的反应参数是: 94°C 变性 5 min ; 94°C 1 min 、 52°C 1 min 、 72°C 2 min , 45 个循环; 72°C 延伸 8 min 。以富士 DNA 为模板 DNA, 利用该反应体系筛选了 UBC 100 个引物, 80 个引物有清晰条带, 但扩增的条带数目及清晰程度不一致 (图 1)。

2.2 苹果 ISSR 反应体系的优化

PCR 反应体系中, 酶、dNTPs、Buffer 和 MgCl_2 的浓度很容易控制, 关键是调节模板 DNA 的浓度、引物的浓度以及 PCR 反应过程中退火温度的高低。根据初选的结果, 设立了包括 DNA 浓度、引物浓度以及 PCR 反应过程中退火温度 3 个变量 (见表 1), 筛选 UBC 100 个引物, 选择适合于苹果的 ISSR-PCR 反应体系。

2.2.1 引物浓度对 PCR 扩增结果的影响 大多数引物在 $0.2 \sim 0.6\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ 的应用浓度之间均有清晰的扩增片段, 考虑到经济与效果两个方面, 以 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的反应体积中引物浓度为 $0.2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, 个别引物为 $0.4\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ 和 $0.6\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ 应用效果更好。

2.2.2 模板 DNA 的用量对扩增结果的影响 模板 DNA 的用量对 ISSR-PCR 的扩增结果影响较小 (图 2)。以富士 DNA 为模板, DNA 的用量在 $5 \sim 50\text{ ng}$ 之间均得到了良好的扩增, 但以 $20 \sim 25\text{ ng}$ 的效果最佳。当 DNA 用量过多时, PCR 扩增片段增加至不可数或呈现出弥散状态。

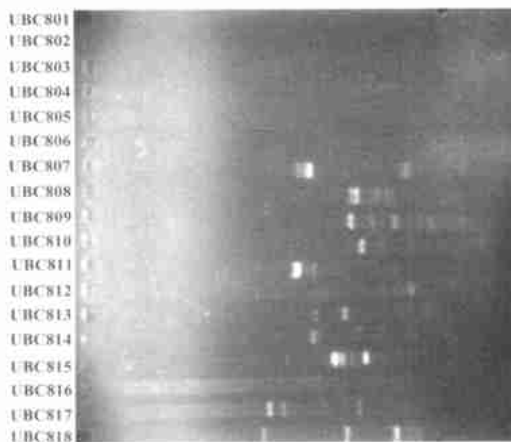


图 1 以相同的模板 DNA 对 ISSR 引物的 PCR 反应初选结果

Fig. 1 Display of ISSR primers with the same template DNA in PCR reaction

表 1 ISSR-PCR 反应体系 ($20\text{ }\mu\text{L}$) 中各成分用量的设计

Table 1 Comparison of the components in ISSR-PCR reaction volume ($20\text{ }\mu\text{L}$)

模板 DNA Template DNA (ng)	引物 Primers (mol L^{-1})	Taq DNA 聚合酶 Polymerase (U)	Buffer + MgCl_2 (μL)	dNTP (mmol L^{-1})	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)
20	0.2	1	2	0.2	50
25	0.4	1	2	0.2	52
30	0.6	1	2	0.2	55
35	0.8	1	2	0.2	45

2.2.3 PCR 反应过程中退火温度对扩增结果的影响 在引物浓度、模板 DNA 的用量固定的情况下,不同的退火温度对 PCR 扩增的结果影响较大。大多数引物在退火温度 52 的条件下均有清晰、稳定的扩增片段,而引物 UBC824 在 50 、 UBC814 在 55 时效果更好。图 3 表明不同退火温度条件下,ISSR 引物的 PCR 扩增能力在富士 (F)、舞姿 (W)、柱型基因池 (Pc) 和非柱型基因池 (Ps) 中的表现一致。

2.2.4 不同引物的最佳反应条件 ISSR 引物在设计上锚定的是基因组中重复序列中间的区域,碱基数目为 16~22 个,多数为 17 个或 18 个,富含不同的重复序列。由于碱基的种类、数目和排列顺序的差异,对 PCR 反应条件的要求也有较大的差异,不同引物表现的 PCR 扩增能力不同。以 (AT)_n 为主的引物 UBC801~UBC806、UBC831~UBC833、UBC837~UBC839 等在所设置的各个退火温度,提高模板 DNA 及引物浓度等条件下均无扩增产物;以 (GT)_n 为主的引物如 UBC819、UBC820、UBC821 等,在所设置的各个条件下,虽然有清晰的扩增片段,但数目少,一般为 2~3 个;一些以重复序列 (GA)_n、(AC)_n、(GC)_n、(CT)_n 为主的引物多数有清晰可辨的扩增片段。个别引物如 UBC880,序列为 (GGAGA)₃,在 DNA 模板用量和引物浓度一致的前提下,在 3 个退火温度 50、52 及 55 的 PCR 扩增中均有清晰稳定的片段 (图 4),而大多数的引物在一定的反应条件下表现为扩增片段数目多而且清晰,否则会出现扩增条带弱、数量少或是呈现弥散状态。

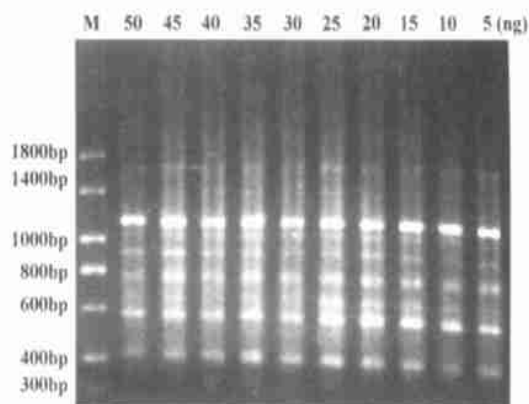


图 2 不同浓度的模板 DNA 对 PCR 扩增的影响
引物 UBC864, 20 μ L 的反应体积中 DNA 用量
分别是 5~50 ng; M: 分子量标记。

Fig. 2 Effect of different concentration of
template DNA in PCR reaction
primer UBC864, 5 - 50 ng template DNA in 20 μ L
reaction volume; M: marker.

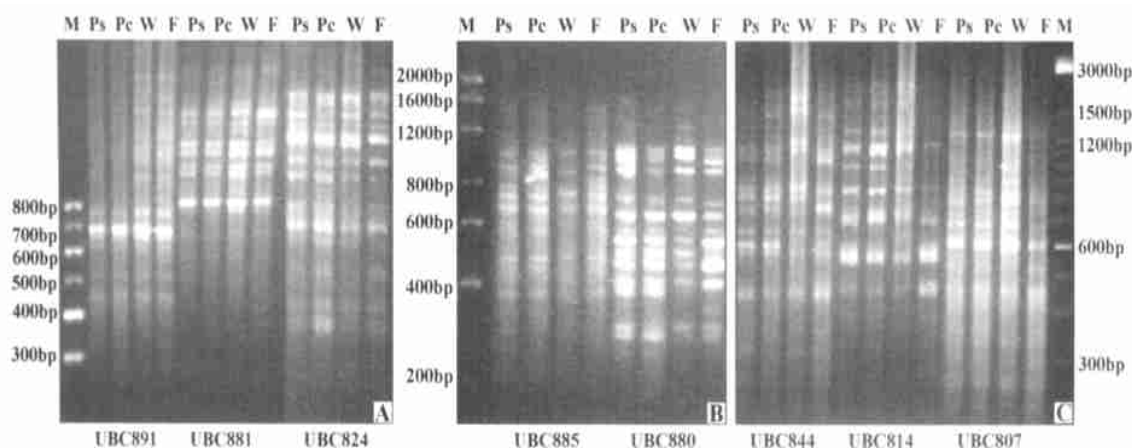


图 3 不同退火温度对 PCR 扩增结果的影响

A、B、C 分别为 50 、 52 和 55 。 F: 富士; W: 舞姿; Pc: 柱型基因池; Ps: 非柱型基因池。

Fig. 3 Effect of different annealing temperature in PCR amplification

A: 50 ; B: 52 ; C: 55 ; F: Fuji; W: Waltz; Pc: Columnar gene pool; Ps: Standard gene pool; M: marker.

通过对富士、舞姿、柱型基因池和非柱型基因池 DNA 的 PCR 扩增结果表明,不同引物最佳的 PCR 反应条件各异,为了获得更好的扩增效果,应调整反应体系的关键变量,如模板 DNA 的用量、引物浓度及 PCR 扩增中退火温度。表 2 列举了可用于苹果遗传分析的 65 个 UBC 引物最适合的 PCR 反应条件。

表2 苹果 ISSR-PCR 扩增体系的优化最佳条件
Table 2 Optimization of ISSR-PCR reactions for apple

引物序号/引物序列 The serial number and sequence of primers	适宜的 PCR 扩增条件 Optimization of ISSR-PCR reactions (20 μ L)		
	引物 Primers (μ mol L ⁻¹)	DNA (ng)	退火温度 Annealing temperature (°C)
UBC808/(AG) ₈ C; UBC809/(AG) ₈ G; UBC810/(GA) ₈ T; UBC811/(GA) ₈ C; UBC812/(GA) ₈ A; UBC813/(CT) ₈ T; UBC815/(CT) ₈ G; UBC816/(CA) ₈ T; UBC817/(CA) ₈ A; UBC818/(CA) ₈ G; UBC825/(AC) ₈ T; UBC827/(AC) ₈ G; UBC834/(AG) ₈ YT; UBC835/(AG) ₈ YC; UBC836/(AG) ₈ YA; UBC840/(GA) ₈ YT; UBC841/(GA) ₈ YC; UBC842/(GA) ₈ YG; UBC845/(CT) ₈ RG; UBC880/(GGA) ₃ ; UBC846/(CA) ₈ RT; UBC848/(CA) ₈ RG; UBC851/(GT) ₈ YG; UBC852/(TC) ₈ RA; UBC856/(AC) ₈ YA; UBC861/(ACC) ₆ ; UBC862/(AGC) ₆ ; UBC864/(ATG) ₆ ; UBC866/(CTC) ₆ ; UBC867/(GCC) ₆ ; UBC868/(GAA) ₆ ; UBC873/(GACA) ₄ ; UBC884/HBH(AG) ₈ ; UBC885/BHB(GA) ₇ ; UBC888/BDB(CA) ₇ ; UBC889/DBD(AC) ₇ ; UBC900/ACTTCCCCACAGGTTAACACA	0.2~0.4	20~25	52
UBC822/(TC) ₈ A; UBC823/(TC) ₈ C; UBC824/(TC) ₈ G; UBC826/(AC) ₈ C; UBC847/(CA) ₈ RC; UBC849/(CA) ₈ RG; UBC850/(GT) ₈ YC; UBC853/(TC) ₈ RT; UBC854/(TC) ₈ RG; UBC855/(AC) ₈ YT; UBC858/(TC) ₈ RT; UBC860/(TC) ₈ A; UBC876/(GATA) ₂ (GACA) ₂ ; UBC881/(GGGTG) ₃ ; UBC886/VDV(CT) ₇ ; UBC887/DVD(TC) ₇ ; UBC891/HVH(TG) ₇ ; UBC898/GATCAAGCTTNNNNNNATGTGG	0.4	20~25	50
UBC807/(AG) ₈ T; UBC814/(CT) ₈ A; UBC843/(CT) ₈ RA; UBC844/(CT) ₈ RC; UBC857/(AC) ₈ YG; UBC877/(TGCA) ₄ ; UBC897/CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG	0.4	25	55
UBC828/(TG) ₈ A; UBC859/(TG) ₈ RC; UBC829/(TG) ₈ C; UBC896/AGGTCGCGCNNNNNNATG; UBC899/CATGGTGTTGGTCATTGTCCA	0.6	20	50

2.3 利用 ISSR 标记对 Co 基因进行遗传分析

用扩增能力强的 ISSR 引物对柱型基因池 Pc 和非柱型基因池 Ps 进行多态性筛选,并在亲本富士和舞姿之间验证所筛选到的差异片段,所得到的 ISSR 标记再经过富士与舞姿的 F₁ 作图群体检测,观察各标记的分离表现。根据优化后的 PCR 扩增条件,引物 UBC880 在退火温度 52 °C 下(图 4)得到一个 1000 bp 的片段,来自亲本富士,并在非柱型基因池 Ps 中出现,该多态性片段记为一个 ISSR 标记 UBC880-1000 bp。经过 F₁ 后代 120 株实生苗的检测,该标记在 61 株中出现,符合孟德尔的 1:1 分离 ($\chi^2=0.1333$)。从所筛选的 65 个引物中获得了 35 个 ISSR 标记,其中 33 个标记符合柱型基因的遗传分离特性,呈现 1:1 的分离,可用于柱型基因的遗传图谱构建及连锁分析,两个标记表现了偏分离现象。

3 讨论

ISSR 标记技术同 RAPD、SSR 等相似,也是基于 PCR 扩增为核心的 DNA 指纹分析技术,但该技术融合了 RAPD 标记和 SSR 标记的优点,具有更广泛的应用前景。SSR 标记虽为共显性标记,但引物的设计是基于某一物种中某重复序列两侧的保守序列,需要对该物种的基因组有足够的认识,引物是特异的。而 ISSR 引物设计是随机的,不需要预先了解植物基因组的 DNA 序列,引物多以 (AT)_n、(GC)_n、(AC)_n、(GT)_n 和 (CT)_n 等两个碱基的重复序列为主,有的引物以 3 个碱基的重复为主,如 (ACC)_n、(AGC)_n 等,并在 3' 或 5' 端锚定。由于 AA/TT 和 GT/CA 这样两种简单序列广泛分布于真核

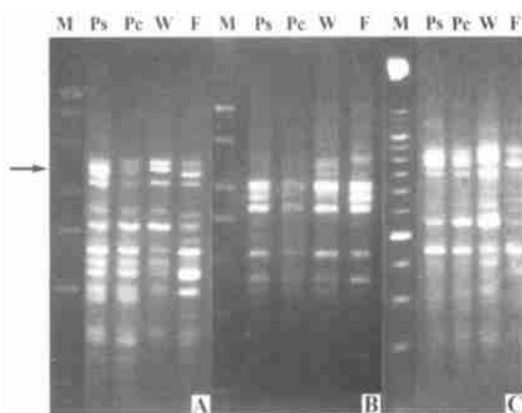


图4 引物 UBC880 在不同退火温度条件下 PCR 扩增的表现
A、B、C 分别是 52 °C、50 °C、55 °C; F: 富士; W: 舞姿;
Pc: 柱型基因池, Ps: 非柱型基因池; M: 分子量标记。

Fig. 4 Display of primer UBC880 in different annealing temperatures in PCR amplification

A: 52 °C; B: 50 °C; C: 55 °C; F: Fuji; W: Waltz; Pc: Columnar gene pool; Ps: Standard gene pool; M: marker.

基因组中^[22], 增强了引物在植物基因组中的检测能力, 可以在不同的植物中应用。除了用于果树的遗传学研究之外, 已经用于小麦遗传连锁图谱的构建^[5]及水稻、玉米、甘薯、豇豆等品种、品系的鉴定及系谱分析^[3,4]。当然, 不同的引物在不同植物的基因组中表现是不一致的。

与 RAPD 技术比较, ISSR 引物一般是有 18~21 个碱基, 多于 RAPD 引物的 10 个碱基, 在 PCR 反应过程中退火温度高, 扩增稳定, 可重复性强, 而且模板 DNA 的用量更少。

3.1 引物序列对 PCR 扩增能力的影响

在 UBC 100 个引物中, 以 (AT)_n 重复序列为主的引物均没有得到扩增产品, 这种现象在柑橘上亦如此。虽然植物基因组中含有丰富的 (AT)_n 序列, 但富含 (AT)_n 或 (TA)_n 的引物由于可能自我互配 (self-complementary nature) 的特性而导致无扩增条带的产生。同时在 3' 端和 5' 端锚定的引物, 即使其他碱基排列顺序完全相同, 也表现出不同的扩增能力。在苹果基因组中, 利用分子杂交技术筛选 Florida 的基因组文库很难得到 (AT) / (TA) 重复, 但容易富集 (AG) / (CT) 重复, 由此发展的微卫星标记, 富含 (AG)_n、(GT)_n 和 (AG)_n 等, 具有高水平的遗传多态性, 可以用于品种鉴定和遗传作图^[23,24]。

3.2 检测方法对试验结果的影响

据报道, ISSR 引物的扩增能力强于 RAPD、RFLP 和 SSR 等标记技术。用聚丙烯酰胺非变性胶方法检测时, PCR 扩增条带多, 平均 60 个, 扩增片段长度在 50~3000 bp, 可记录的条带在 100~2000 bp。用 2% 的琼脂糖凝胶检出, 扩增片段长度在 200~2000 bp, 平均 12.5 个扩增片段^[3]。本试验用 1.8%~2.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段长度在 200~2000 bp, 数目在 6~12 之间。虽然理论上 2% 以上的琼脂糖凝胶电泳可以检测出小到 50 bp 的 DNA 片段, 但实际操作中大于 2000 bp 和小于 300 bp 的片段虽能检出, 却很难进行统计分析。在可以检测区域的片段由于琼脂糖凝胶电泳分离能力的限制, 一些多态性片段不能被检测到。

3.3 模板 DNA 的质量对扩增能力的影响

模板 DNA 的质量对任何一种分子标记技术的成功应用都是至关重要的。一般来说, 吸光值 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.6~1.9 (紫外分光光度计) 的 DNA 样本能得到良好的扩增。但是如果模板 DNA 降解或含有 RNA 将会导致扩增的失败, 表现为扩增片段少或无或弥散。当然, 影响 PCR 扩增能力的还包括引物本身是否降解、浓度的高低, 以及 dNTP 与 Tag 聚合酶的质量。

参考文献:

- 1 Zetkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1999, 20: 176~183
- 2 Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98 (5): 780~792
- 3 Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. Phylogenetic relationships among selected citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1998, 123 (4): 612~617
- 4 Kantety R V, Zeng X P, Bennetzen J L, et al. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding*, 1995, 1: 365~373
- 5 Kojima T, Nagaoka T, Noda K, et al. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 37~45
- 6 Goulao L, Oliveira C M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, 2001, 122: 81~89
- 7 Monte Corvo L, Goulao L, Oliveira C. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2001, 126: 517~522
- 8 Potter D, Gao F Y, Aiello G, et al. Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2002, 127: 75~81
- 9 Goulao L, Monte Corvo L, Oliveira C M. Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2001, 126: 72~77

- 10 Mereno S, Martin J P, Ortiz J M. Intersimple sequence repeat PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica*, 1998, 101: 117 ~ 125
- 11 Regner f, Stadlbauer A, Eisenheld C, et al. Molecular markers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties. *Acta Horticulturae*, 2001, 546: 331 ~ 341
- 12 Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, et al. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 8, 1190 ~ 1199
- 13 Lanham P G, Brennan R M, Dore C, et al. Genetic diversity in ribes. *Acta Horticulturae*, 2001, 564: 135 ~ 137
- 14 Roose M L, Feng D, Cheng F S, et al. Mapping the *Citrus* genome. *Acta Horticulturae*, 2000, 535: 25 ~ 32
- 15 Sankar A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 206 ~ 214
- 16 Tobutt K R. Breeding columnar apples at East Malling. *Acta Hort.*, 1985, 159: 63 ~ 68
- 17 李光晨, 张 勇. 超高密度栽植的最佳品种——芭蕾苹果. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 2 ~ 13
- 18 Lapins K O. Spur-type growth habit in 60 apple progenies. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1974, 99: 568 ~ 572
- 19 Lapins K O. Inheritance of compact growth type in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1976, 101: 133 ~ 135
- 20 Hemmat M, Weeden N F, Conner P J, et al. A DNA marker for columnar growth habit in apple contains a simple sequence repeat. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1997, 122 (3): 347 ~ 349
- 21 祝 军. 苹果、桃基因型水平鉴定和苹果柱型基因分子标记的研究: [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 1998. 30 ~ 37
- 22 Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 6463 ~ 6471
- 23 Garfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, et al. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 1069 ~ 1076
- 24 Guilford P, Prakash S, Zhu J M, et al. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94: 249 ~ 254

Studies on the ISSR Marker Analyses of the Columnar Gene in Apple

Zhu Yuandi¹, Li Guangchen¹, Li Chunyu¹, Dong Limin², and Wang Tao²

(¹ College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ² State Key Laboratories for Agrobiotechnology, Beijing 100094, China)

Abstract : In the present paper, cultivated apple 'Fuji' (standard growth type), 'Waltz' (or 'Telemon', columnar growth type) and seedlings in their progeny with standard and columnar types were used to establish the ISSR (inter-simple sequence repeat) analyses in apple. ISSR markers were also used for genetic analysis of the columnar gene. The results showed that 80 % primers produced good amplification in 20 μ L reaction volume include 1U Taq DNA polymerase, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 20 ng DNA and 0.2 μ mol \cdot L⁻¹ primer with the annealing temperature 52 . Adjusting the concentration of the template DNA, primers and the annealing temperature can optimize the ISSR - PCR amplification. 35 ISSR markers were obtained from the screened 65 primers. Among them 33 ISSR markers, which displayed 1:1 segregant ratio in correspondence with the genetic segregation of *Co* gene, could be used for genetic analysis of the *Co* gene in apple.

Key words : Apple (*Malus × domestica*); Columnar apple; *Co* gene; ISSR marker; Genetic analysis

新书推荐

《分子克隆实验指南》(第三版)

作者对图书内容进行了全面升级,修订了试验的每条方案,增加了大量新的材料,拓宽了所涉及试验的领域。前面的章节描述了一些基本的技术,后面的几章是关于 cDNA 克隆和外显子截留、核酸探针的使用、突变和 DNA 测序的介绍。最后的章节主要解决筛选表达文库、克隆基因在原核和真核细胞的表达、转录物和蛋白质分析、探测蛋白质与蛋白质的相互作用,附录中包含了试剂、载体、培养基、技术支持等基本信息。定价:187 元(上、下册,含邮资)。

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。