

柑橘 CAPS 标记和 AS-PCR 引物的开发

雷天刚, 何永睿*, 彭爱红, 许兰珍, 刘小丰, 姚利晓, 邹修平, 江 东, 陈善春*

(中国农业科学院柑橘研究所, 西南大学柑橘研究所, 国家柑橘工程技术研究中心, 国家柑橘品种改良中心, 重庆 400712)

摘 要: 以从 GenBank 中下载的 93 955 条甜橙 [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] EST 序列为源序列, 利用 QualitySNP 软件包从中挖掘出 1 521 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 候选位点。进一步利用酶切位点查找软件 WatCut 进行分析, 发现其中 125 个 SNP 为酶切扩增多态性序列 (cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS) 位点。随机挑选 40 个 CAPS 候选位点设计引物, 对 12 个含多种类型的柑橘品种进行分型, 以此验证各标记的有效性。同时, 还挑选了 25 个经生物信息学预测可导致其编码蛋白氨基酸序列改变的 SNP 位点, 分别设计出一组等位基因特异 PCR (allele specific PCR, AS-PCR) 引物, 以 6 个不同类型柑橘品种的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 筛选多态性引物。结果显示, 40 个 CAPS 候选位点中有 26 个位点具有酶切扩增多态性, 且分型结果稳定, 可作为 CAPS 标记。此外, 还筛选获得 15 组在不同柑橘品种间检测到多态性的 AS-PCR 引物, 重复性好, 可有效用于柑橘品种的 SNP 分型。

关键词: 柑橘; 表达序列标签; 单核苷酸多态性; 酶切扩增多态性序列; 等位基因特异 PCR

中图分类号: S 666

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 06-1027-08

Development of CAPS Markers and Allele-specific PCR Primers in *Citrus*

LEI Tian-gang, HE Yong-rui*, PENG Ai-hong, XU Lan-zhen, LIU Xiao-feng, YAO Li-xiao, ZOU Xiu-ping, JIANG Dong, and CHEN Shan-chun*

(*Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Citrus Research Institute, Southwest University; National Citrus Engineering Research Center; National Center for Citrus Varieties Improvement, Chongqing 400712, China*)

Abstract: The objective of this study was to develop CAPS markers and AS-PCR primers that can be used as molecular genetic markers in cultivar identification and genetic diversity studies. With the QualitySNP software package, 1 521 putative single nucleotide polymorphism (SNP) sites were identified among the 93 955 sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] expressed sequence tags (ESTs) downloaded from the GenBank. Furthermore, those ESTs containing the putative SNP sites were analysed with WatCut program and 125 putative Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) sites were obtained. Forty

收稿日期: 2012-01-04; **修回日期:** 2012-05-20

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目 (PCSIRT); 国家高科技研究发展计划 (863) 项目 (2011AA100205); 柑橘产业技术体系项目 (CARS-27); 农业部引进国际先进农业科学技术项目 (948); 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (2010 03067-02-4); 重庆市科委重点实验室专项经费项目 (CSTC); 教育部科学技术研究重点项目 (109131); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2010C074); 重庆市自然科学基金项目 (CSTC2011JJA811); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2011C003)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: scchen2004@vip.sina.com; heyongrui110@sina.com; Tel: 023-68349020)

ESTs with CAPS sites were randomly chosen to design primer pairs, with which PCR amplifications were performed and then the amplification products were digested with restriction enzymes. Meanwhile, 25 sets of AS-PCR primers were designed according to other 25 putative SNP that change the deduced amino acid type. Afterwards, 6 citrus cultivars with different genotypes were used for the validation of each SNP site. As a result, 26 CAPS sites with cleaved amplified polymorphism among 12 citrus cultivars were identified, all of them can be used as CAPS markers. Furthermore, fifteen sets of Allele-specific PCR primers with good reproducibility and polymorphism were obtained, which can be applied for further SNP genotyping in citrus. This study indicated that it is feasible to develop CAPS markers and AS-PCR primers based on public citrus EST sequences.

Key words: citrus; expressed sequence tags (EST); single nucleotide polymorphism (SNP); cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS); allele specific PCR

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 是指基因组 DNA 序列上由单个核苷酸的变异而引起的多态性。由于 SNP 在生物基因组中具有数量多、分布广、遗传稳定、二等位性、易于分型等诸多优点 (Zhu et al., 2003; Lijavezhy et al., 2007), 特别是一些存在于基因编码区或非编码调节区域的 SNP, 极有可能导致其编码蛋白氨基酸序列的改变或引起相关蛋白表达量的差异。所以 SNP 被称为是继 RFLP 和 SSR 之后最具应用潜力的新一代分子标记。目前 SNP 标记已被广泛应用于植物高密度遗传连锁图谱的构建 (Rostoks et al., 2005; Vezzulli et al., 2008)、分子标记辅助选择 (Missaoui et al., 2007; Lehmensiek et al., 2008)、遗传多样性分析 (Chao et al., 2009; Hayden et al., 2009) 及品种鉴定 (Yoon et al., 2007; Jung et al., 2010) 等多方面研究。

迄今, 已有多种方法应用于植物 SNP 标记的开发, 基于全基因组序列或 EST 序列的生物信息学法是发掘 SNP 较为常用的方法之一。如水稻 (Feltus et al., 2004)、小麦 (Somers et al., 2003)、大豆 (束永俊 等, 2010)、番茄 (Labate & Baldo, 2005) 及柑橘 (Jiang et al., 2010; 吴波 等, 2012) 等植物中都曾利用全基因组序或公共数据库中的 EST 序列发掘出大量的 SNP。各种新型的 SNP 分型检测技术, 如变性高效液相色谱法、基质辅助激光解析—电离—飞行时间质谱法和高分辨率熔解曲线分析技术等出现, 也为 SNP 标记的高通量分型检测提供了强大的技术支撑。尽管如此, 由于这些技术多依赖于高昂的仪器设备, 而且检测成本也都相对较高, 这在很大程度上限制了其在 SNP 标记开发研究中的应用。相比之下, 酶切扩增多态性序列 (cleaved amplification polymorphic sequences, CAPS) 和等位基因特异 PCR (Allele-specific PCR, AS-PCR) 是两种操作简单、检测快速、成本低廉且不依赖于高精仪器的 SNP 分型技术, 这两种技术已被广泛应用于植物的 SNP 分型 (Hayashi et al., 2004; Chung et al., 2008; Konovalov et al., 2009; Lee et al., 2009)。

近年来, 随着柑橘分子生物学研究的不断深入, GenBank 等公共数据库中积累了大量的柑橘 EST 数据, 这为柑橘 SNP 标记的开发提供了宝贵的资源。本研究中, 拟基于生物信息学方法从公共数据库中发掘出一批柑橘 SNP 候选位点, 然后根据部分位点设计 CAPS 标记或 AS-PCR 引物, 对不同遗传背景的柑橘品种进行分型检测, 以此验证 SNP 的真实性, 并筛选获得有效的柑橘 CAPS 标记和 AS-PCR 引物。

1 材料与方法

1.1 材料及其 DNA 提取

为了便于多态性 CAPS 标记和 AS-PCR 引物的筛选, 以包含甜橙、椪柑、温州蜜柑和柚这 4 种

类型的 12 个柑橘品种为供试材料 (表 1), 均由中国农业科学院柑橘研究所国家果树种质重庆柑橘圃提供。试验于 2009 年在国家柑橘品种改良中心进行。采用 CTAB 法 (Jiang et al., 2010) 提取叶片的基因组 DNA; 经琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测, 将浓度调至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.2 SNP 候选位点的发掘

从美国生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载甜橙 EST 序列; 在 Linux 操作系统下利用 QualitySNP 软件包中的 CAP3 程序将同源性高于 95% 且长度均大于 100 bp 的 EST 序列组装成簇; 使用 Perl 脚本 “Geta-aligninfo” 除去少于 4 条同源序列

的 EST 簇; 运行 QualitySNP 软件自动搜寻功能查找各簇中存在的 SNP 候选位点。然后利用在线酶切位点识别软件 WatCut (<http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php>) 查找引起限制性内切酶识别位点改变的 SNP。将 SNP 位点所在 EST 序列翻译成氨基酸序列与在线蛋白序列数据进行比对, 预测每个 SNP 可否引起所编码蛋白氨基酸序列的改变。

1.3 CAPS 引物设计及酶切扩增多态性分析

随机挑选 40 个可引起限制性内切酶识别位点改变的 SNP 候选位点, 利用在线引物设计软件 Primer3 设计 CAPS 引物。引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

PCR 扩增体系为 $25 \mu\text{L}$, 包括 100 ng 模板 DNA, $2.5 \mu\text{L}$ $10 \times \text{PCR buffer}$, $1.5 \mu\text{L}$ $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $2.0 \mu\text{L}$ $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dNTP}$, $0.5 \mu\text{L}$ $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, 0.8 U *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa)。扩增反应程序: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, 30 循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。扩增反应在德国 Biometra 公司 T1 Thermocycler 型 PCR 扩增仪上进行。

经 PCR 扩增的产物分别用 *Bam*H I、*Hind*III、*Eco*R I、*Eco*R II 和 *Mis* I 限制性内切酶 (ABI 公司) 对相应的 CAPS 位点进行酶切。酶切反应体系 $20 \mu\text{L}$, 含 $10 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物, $2 \mu\text{L}$ 酶切 buffer, 2.5 U 的内切酶, $8 \mu\text{L}$ 的 ddH₂O。37 $^\circ\text{C}$ 消化 3 h, 然后加入 $4 \mu\text{L}$ 溴酚蓝。取 $10 \mu\text{L}$ 样品在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳 ($1 \times \text{TBE buffer}$), 120 V 稳压 40 min 左右, 经溴化乙锭 (EB) 染色, 置于 UVP 凝胶成像系统 (Gel Doc-It) 成像。

1.4 AS-PCR 引物设计及 PCR 分析

随机挑选 25 个可能导致所编码蛋白氨基酸序列改变的 SNP 候选位点, 利用 premier5.0 和 oligo6.0 等软件根据每个 SNP 位点分别设计两条等位基因特异引物 (ASP) 和 1 条公用引物。ASP 引物的 3' 末端分别与 SNP 位点的两个等位碱基完全匹配, 同时在特异引物 3' 末端的倒数第 2 或第 3 位置引入 1 个错配碱基, 以此提高 PCR 的特异性及稳定性。错配碱基的引入原则参照前人 (Hayashi et al., 2004; 卫波等, 2006) 的研究。

AS-PCR 扩增体系及电泳方法与 CAPS 分析基本相同。AS-PCR 操作过程中需将两条 ASP 引物与其公用引物分别组对, 在两个 PCR 管中对同一 DNA 模板进行 PCR 扩增。若样品中的等位位点与

表 1 供试 12 个柑橘品种
Table 1 Twelve citrus cultivars used for SNP validation in this study

代号 Code	品种 Cultivar	类型 Type
1	纽荷尔脐橙 Newhall Navel	甜橙
2	铜水 72-1 锦橙 Tongshui 72-1	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
3	无核雪柑 Xuegan Seedless	
4	冰糖橙 Bingtangcheng	
5	塔罗科血橙 Tarocco Blood Orange	
6	奥林达 Olinda	
7	太田椪柑 Ota Ponkan	椪柑
8	台湾椪柑 Taiwan Ponkan	<i>C. reticulata</i> Blanco
9	大浦温州蜜柑 Ooura	温州蜜柑
10	日南 1 号温州蜜柑 Nichinan 1	<i>C. unshiu</i> Marcow
11	强德勒柚 Chandler Pummelo	柚 <i>C. grandis</i> Osbeck
12	琯溪蜜柚 Guanxi Pummelo	

ASP 引物的 3'末端相匹配, 便能进行有效扩增, 反之则不能进行有效扩增。

2 结果与分析

2.1 SNP 候选位点

利用 QualitySNP 软件包中的 CAP3 程序将来自甜橙的 93 955 条 EST 组装成 2 925 个簇; 使用 Perl 脚本 “Getalignmentinfo” 除去少于 4 条同源序列的簇后得到 1 236 个簇; 利用 QualitySNP 搜寻簇中可能存在的 SNP, 结果共挖掘到 1 521 个可靠性较高的 SNP 候选位点。进一步利用酶切位点识别软件 WatCut 分析, 发现其中 125 个 SNP 可引起限制性内切酶识别位点的改变, 即为 CAPS 候选位点。利用生物信息学法对 1 521 个 SNP 候选位点进行功能预测, 发现其中 325 个 SNP 可能会导致所编码蛋白氨基酸序列的改变。

2.2 CAPS 标记的获得

以 12 个柑橘品种 (表 1) 的 DNA 为模板, 利用 40 对 CAPS 引物进行 PCR 扩增, 并用相应的限制性内切酶对扩增产物进行酶切分析。结果 40 对引物均能扩增出与预期长度吻合的特异性产物, 其中 26 对 (表 2) 在 12 个柑橘品种间具有酶切扩增多态性。

表 2 CAPS 引物序列及其 SNP 位点
Table 2 Primer sequences of CAPS and the SNP loci

引物名称 Primer name	引物序列 (正向和反向) Primer sequence (forward and reverse)	SNP 位点 SNP loci	限制性内切酶 Restriction endonuclease	PCR 产物大小/bp PCR product size	酶切后片段大小 /bp After digestion
CSP01	5' > GTAACAAATGGGCCACCATC 5' > CACACCGGGTAAGCTTGAAT	GGATCC GAATCC	<i>Bam</i> H I	248	248/ (215 + 33)
CSP02	5' > GGCCATCTTCCAAGTCTTA 5' > CAACCCCTCATCTCGTCCTC	GGATCC GTATCC	<i>Bam</i> H I	195	195/ (141 + 54)
CSP03	5' > ACACGTCATCCATCCTCTCC 5' > TGCAGCACTCAGCTTCTTGT	GGATCC GGACCC	<i>Bam</i> H I	194	194/ (121 + 73)
CSP04	5' > CAGAAAATGGGGCTGTCAAT 5' > TCTTATCCTGACCCCAACA	AAGCTT AAACTT	<i>Hind</i> III	226	226/ (198 + 28)
CSP05	5' > GAACATTCAGGATGCCTTGG 5' > CTTTGCCACTTGCTGCAATA	AAGCAT AAGCTT	<i>Hind</i> III	155	155/ (101 + 54)
CSP06	5' > CGCAGTGGTTGAGTGTGTGT 5' > GTAACGCGGTTGTCTGATT	AAGCCT AAGCTT	<i>Hind</i> III	226	226/ (127 + 99)
CSP07	5' > ATCAGGCTGTGATGGCTCTT 5' > TAACTGCATCATCGGGTGAA	AAGCTG AAGCTT	<i>Hind</i> III	250	250/ (203 + 47)
CSP08	5' > AGCAGAGAAGCCAAATCCAA 5' > CTCTGAGCGGTTCGGTTAAG	AAGCTT AAGCCT	<i>Hind</i> III	231	231/ (196 + 35)
CSP09	5' > TGAACAAGCAGCTTACATTGC 5' > ACTTACGCTGGTGAGGCTGT	AAGCTT AGGCTT	<i>Hind</i> III	182	182/ (123 + 59)
CSP10	5' > GATCCAATGGCTCCAAAGAA 5' > GACGATCGGAGAGAATGGAA	AAGCTC AAGCTT	<i>Hind</i> III	214	214/ (157 + 57)
CSP11	5' > ATCAGGGACCTGAGCGATT 5' > CAACTTGGGTGCAATTGTTG	AAGCTT AAGCTG	<i>Hind</i> III	166	166/ (139 + 27)
CSP12	5' > TGCTGGAAAATCAAGTGCAG 5' > AGGATTTCATGCATACAGCA	GAATTC GAATTT	<i>Eco</i> R I	167	167/ (91 + 76)
CSP13	5' > TGATAATGGGAGAGGGGTGA 5' > AGCTGCTCAGAATATTGTGCTT	GAATTC GAATTT	<i>Eco</i> R I	179	179/ (131 + 48)
CSP14	5' > GCAAGAGCACCTAAGAACG 5' > TCACTTTGCTTCCGACCTCT	CCTGG CTTGG	<i>Eco</i> R II	239	239/ (200 + 39)
CSP15	5' > AAGGCTGAAGATGAGGAGCA 5' > GGTAGCGCACGCAATACATA	CCTGG CCTCG	<i>Eco</i> R II	247	247/ (152 + 95)
CSP16	5' > CAGCTTCAGCTTCAGTTCCA 5' > ACTGTTGGAGAATGCCGAGA	CCAGG CCGGG	<i>Eco</i> R II	226	226 (142 + 84)

续表 2

引物名称 Primer name	引物序列 (正向和反向) Primer sequence (forward and reverse)	SNP 位点 SNP loci	限制性内切酶 Restriction endonuclease	PCR 产物大小/bp PCR product size	酶切后片段大小 /bp After digestion
CSP17	5' > AGCCCTCTGAGCATTGAGAA 5' > ACAAAAACCTGGGGACAT	CCTGG CTTGG	<i>EcoR</i> II	243	243/ (209 + 34)
CSP 18	5' > CCATATCCGTGATTGGGTTC 5' > ACAAAAACCTGGGGACATTCA	CTTGG CCTGG	<i>EcoR</i> II	200	200/ (159 + 41)
CSP 19	5' > CCTCGGAGAATCCAAATTCA 5' > AGGACCGACAGGTCGTATTG	CATGG CCTGG	<i>EcoR</i> II	239	239/ (203 + 36)
CSP 20	5' > CGCCAACCTTTCTCAATCA 5' > TCGACGCTGTGATTTCAGC	CCTGG CTTGG	<i>EcoR</i> II	201	201/ (135 + 76)
CSP 21	5' > GAGCTGAAAGATTCCGTTGC 5' > TTGATCTTCATGCTGCTTGG	CCTGG CCC GG	<i>EcoR</i> II	245	245/ (171 + 62)
CSP 22	5' > TCGAGAGGTTTCGAGAAGGAA 5' > TCAATGATAAGGACGGCACA	CCTGG CTTGG	<i>EcoR</i> II	235	235/ (163 + 72)
CSP 23	5' > AACCTTGCCCTGTCTAACGA 5' > GCTCCTCCGACATTGTGAT	GCCGGT GCCGGC	<i>Mis</i> I	218	218/(116 + 102)
CSP 24	5' > TGTTGGGCATGTCGCTACTA 5' > TCGGGATCACTTTCAGTTCC	GCCAGC GCCGGC	<i>Mis</i> I	181	181/ (132 + 49)
CSP 25	5' > ACGATGTCGGGATGAAGAAG 5' > TAATGCGCAGAACATGGAAG	GCTGGC GCCGGC	<i>Mis</i> I	198	198/ (140 + 58)
CSP 26	5' > AAGCAACTAAGAGGGGCACA 5' > TCCACCTCTACGAGCCAAAC	GCCGGC GCCAGC	<i>Mis</i> I	215	215/ (184 + 31)

注: 表中标为黑体的碱基为 SNP 位点。

Note: The bold bases are SNP loci.

如图 1 所示, 纽荷尔、铜水 72-1、无核雪柑、冰糖橙、塔罗科血橙和奥林达这 6 个甜橙品种 (泳道 1~6) 的两个 CAPS 位点均表现为杂合基因型 (G/T); 太田椪柑、台湾椪柑和强德勒柚 (泳道 7、8、11) 的两个位点均表现为纯合基因型 (GG 或 TT); 大浦温州蜜柑、日南 1 号温州蜜柑和琯溪蜜柚 (泳道 9、10、12) 这 3 个品种在图 1, A 中为纯合型 (TT), 在图 1, B 为杂合型 (G/T)。上述 26 个 CAPS 位点经过两次重复验证, 结果均一致。由此可见, 这 26 个 SNP 位点均为真实的 SNP, 且由它们转化而得的 CAPS 标记可用于柑橘品种鉴定及种质资源遗传多样性研究等。

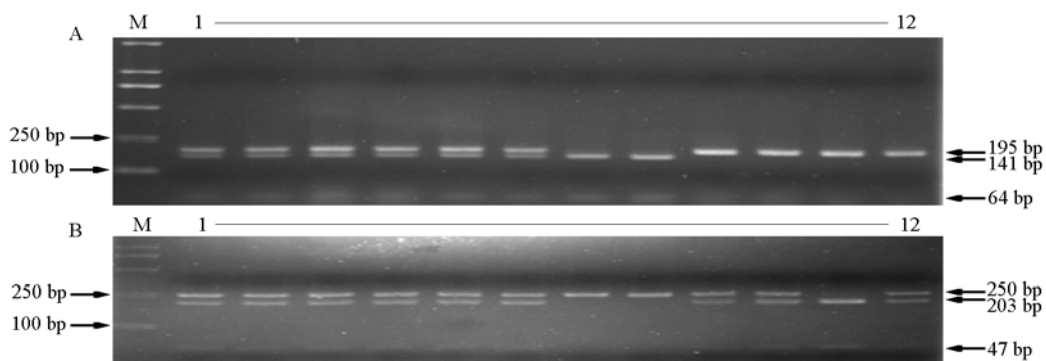


图 1 两个 CAPS 标记对 12 个柑橘品种的分型结果

M: DL2000 marker; A: 引物 CSP02 扩增产物经 *Bam*H I 酶切的结果;
B: 引物 CSP07 扩增产物经 *Hind*III 酶切的结果; 1~12 代表品种见表 1。

Fig. 1 Genotyping of SNP among twelve citrus cultivars by CAPS markers

M: DL2000 marker; A: The PCR products amplified with primer CSP02 were digested with *Bam*H I ;
B: The PCR products amplified with primer CSP07 were digested with *Hind*III; 1 - 12 see Table 1.

2.3 AS-PCR 引物的获得

以纽荷尔脐橙、无核雪柑、台湾椪柑、大浦温州蜜柑、琯溪蜜柚和强德勒柚这 6 个分别归属于上述 4 类柑橘的代表品种的基因组 DNA 为模板, 分别利用 25 组等位基因特异引物进行 PCR 扩增

及琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示, 25 组引物均能扩增出与预期长度吻合的特异性 PCR 产物; 其中 15 组 AS-PCR 引物(引物序列及其 SNP 位点见表 3)在上述 6 个品种间扩增出多态性谱带。就单个品种而言, 每组 AS-PCR 引物中至少有 1 条引物可扩增出 PCR 产物; 在 6 个品种中, 有的品种仅 1 条 AS-PCR 引物能有效扩增出产物, 即表现为纯合基因型; 有的品种两条 AS-PCR 引物均可有效扩增出产物, 即表现为杂合基因型。如图 2 所示, 纽荷尔脐橙、无核雪柑和琯溪蜜柚 3 个品种的该位点表现为纯合的 AA 型, 台湾椪柑表现为纯合的 GG 型, 大浦和强德勒柚为 A/G 型。

表 3 AS-PCR 引物及其 SNP 位点

Table 3 Primer sequences of AS-PCR and the SNP loci

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5'→3') Forward primer sequence (5'→3')	反向引物序列 (5'→3') Reverse primer sequence (5'→3')	SNP 位点 SNP loci	PCR 产物大小/ bp PCR product size
CSP-31	F1: TGCGGACCATGCCGTTTAA F2: TGCGGACCATGCCGTTTGG	TCTTTGCTCCAACCACCT	TTCA TTCG	260
CSP-32	F1: GAAACTGATGAGGAAGTGTG F2: GAAACTGATGAGGAAGTGTAA	TAACCACTTCCTGCCACA	TGAG TGAA	178
CSP-33	F1: TCAAACAAACCAACAGGCG F2: TCAAACAAACCAACAGGCA	GGGCTGATTCTGATTGTAGTAA	GGAG GGAA	114
CSP-34	F1: TGCTGGTCTCCGATGAGGTA F2: TGCTGGTCTCCGATGAGGTG	TCCTGGCTGAAGTGGTC	GGCA GGCG	105
CSP-35	F1: AGTCCAAGGCTGCTAAGGTC F2: AGTCCAAGGCTGCTAAGGTG	CCATCAGTGCCTCCGTTA	GACA GAGA	119
CSP-36	F1: ATGGTGGGATCATGTCA F2: ATGGTGGGATCATGTCC	CTCCGTATGTGATGGTTC	GCCA GCCG	205
CSP-37	F1: CAAGCTCCTCCACTAGATTC F2: CAAGCTCCTCCACTAGATTA	ATGCCCTTCTCAACACCC	ATCC ATCA	150
CSP-38	F1: TCAGAAAGTCGTGTAGAGCAA F2: TCAGAAAGTCGTGTAGAGCAT	CTCCCTGACGGATTGACTAAG	GCCA GCCT	260
CSP-39	F1: AGGTCAAGTTTTATGTGCGT F2: AGGTCAAGTTTTATGTGCGA	CTTGTAGCCTTCTCCACT	GCCT GCCA	195
CSP-40	F1: TCTCAATCCAATCCAGCAAT F2: TCTCAATCCAATCCAGCAAC	GCGAGCCTTCATAGTTGT	CACT CACC	215
CSP-41	F1: GGCACAGACCCAAGATGAG F2: GGCACAGACCCAAGATGAC	CACCGTCAGTAAGGAGATGTA	GGAC GGAG	152
CSP-42	F1: CGGTCGTTGACTCGGATG F2: CGGTCGTTGACTCGGATC	ACTCCTTTGGTGTCTCC	GACG GACC	205
CSP-43	F1: CTCAGAAACCTCCACCGACT F2: CTCAGAAACCTCCACCGACA	ACTGGGAAAACCATCACG	GAGT GAGA	216
CSP-44	F1: TTGCCGTGTTGTGGGAGC F2: TTGCCGTGTTGTGGGAGT	TTCGCTACAGGTATCAGAGA	GAAT GAAC	199
CSP-45	F1: GGGCTGTCATTACGAGA F2: GGGCTGTCATTACGAGG < 3'	5' > ATCCCTCAACTCATCCTC < 3'	GAAG GAAA	258

注: 表中标为黑体的碱基为 SNP 位点。

Note: The bold bases are SNP loci.

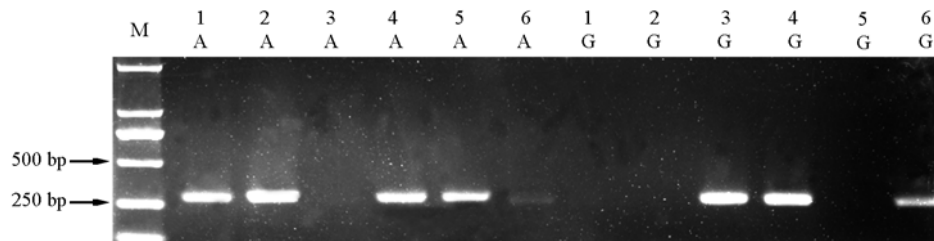


图 2 6 个柑橘品种 AS-PCR 分型结果

M: DL 2000 marker; 1: 纽荷尔脐橙; 2: 无核雪柑; 3: 台湾椪柑; 4: 大浦; 5: 琯溪蜜柚; 6: 强德勒柚;
所用引物为 CSP-31, A、G 分别代表两条 AS-PCR 引物的扩增产物。

Fig. 2 Genotyping of SNP among six citrus cultivars by AS-PCR

M: DL 2000 marker; 1: Newhall Navel; 2: Xuegan Seedless; 3: Taiwan Ponkan; 4: Ooura; 5: Guanxi Pummelo; 6: Chandler Pummelo;
PCR products amplified with primer CSP-31, A or G represent PCR products of the two allele specific PCR primers.

经过两次重复验证, 均获得相同的结果。由此可见, 这 15 组 AS-PCR 引物所对应的 SNP 候选位点为真实的 SNP; 获得的 15 组引物可有效用于柑橘品种鉴定及种质资源遗传多样性研究等。

3 讨论

自 Picoult-Newberg 等 (1999) 利用 EST 序列发掘 SNP 以来, 小麦 (Somers et al., 2003)、大麦 (Bundock et al., 2006)、玉米 (Batley et al., 2003) 等作物中都先后利用公共数据库中的 EST 序列发掘出大量的 SNP, 有的还开发出了适用于 SNP 分型的 CAPS 标记 (Jiang et al., 2010; 束永俊 等, 2010) 或 AS-PCR 引物 (Soleimani et al., 2003; Bundock et al., 2006)。本研究中利用 QualitySNP 软件从柑橘 EST 数据库中挖掘出 1 521 个柑橘 SNP 候选位点, 并根据其中一些位点直接设计成 CAPS 标记或等位基因特异 PCR 引物, 然后以多种遗传背景不同的柑橘品种为材料, 筛选多态性的标记及引物。结果筛选获得 26 个柑橘 CAPS 标记和 15 组等位基因特异 PCR 引物。这些多态性标记和引物的获得为柑橘种质资源遗传多样性研究、品种 DNA 指纹鉴定以及分子标记辅助选择 (如杂种胚鉴定) 等提供了新的分子遗传标记; 同时也有力地证明了柑橘中相应 SNP 位点的真实性, 为今后直接应用高通量的 SNP 检测技术对这些位点进行 SNP 分型奠定了良好的基础。

CAPS 标记和 AS-PCR 技术在应用上虽为简单的 SNP 分型技术, 但开发这两种标记均存在一定的难度 (Soleimani et al., 2003)。因为导致限制性内切酶识别位点改变的 SNP 的数量相对较少, 如本研究中共发掘到的 CAPS 候选位点仅 125 个, 其中一些还不是真实的 SNP 位点。同样能够设计出特异性的 AS-PCR 引物的 SNP 位点也不是特别多。由于两条 AS-PCR 引物的 3' 末端都必须处在 SNP 位点上, 这很难保证每条引物均具有很好的 PCR 特异性和重复性。本研究中总结了前人的经验 (Hayashi et al., 2004; 卫波 等, 2006), 在每条 AS-PCR 引物的 3' 端倒数第 2 或第 3 位置引入了 1 个特定的错配碱基, 使 AS-PCR 引物难于与非匹配模板结合而扩增; 并且还在试验过程中对每组引物进行了 PCR 反应体系的优化, 从而有效地保证了每组引物的 PCR 特异性及稳定性。因此, 只要引物设计得当, 结合 PCR 反应体系的优化, AS-PCR 技术也可以广泛地应用于 SNP 分型。

References

- Batley J, Barker G, O'Sullivan H, Edwards K J, Edwards D. 2003. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data. *Plant Physiology*, 132: 84 - 91.
- Bundock E C, Cross M J, Shapter F M, Henry R J. 2006. Robust allele-specific polymerase chain reaction markers developed for single nucleotide polymorphisms in expressed barley sequences. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 358 - 365.
- Chao S, Zhang W, Akhunov E, Sherman J, Ma Y, Luo M C, Dubcovsky J. 2009. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Molecular Breeding*, 23: 23 - 33.
- Chung W H, Ishii H, Nishimura K, Ohshima M, Iwama T, Yoshimatsu H. 2008. Genetic analysis and PCR-based identification of major *Fusarium* species causing head blight on wheat in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 74: 364 - 374.
- Feltus F A, Singh H P, Lohithaswa H C, Schulze S R, Silva T D, Paterson A H. 2004. A comparative genomics strategy for targeted discovery of single nucleotide polymorphisms and conserved noncoding sequences in orphan crops. *Plant Physiology*, 140: 1183 - 1191.
- Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I. 2004. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1212 - 1220.
- Hayden M J, Tabone T, Mather D E. 2009. Development and assessment of simple PCR markers for SNP genotyping in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 939 - 951.
- Jiang D, Ye Q L, Wang F S, and Cao L. 2010. The mining of *Citrus* EST-SNP and its application in cultivar discrimination. *Agricultural Sciences in China*, 9 (2): 179 - 190.

- Jung J K, Park S W, Liu W Y, Kang B C. 2010. Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capsicum* and SNP markers for cultivar identification. *Euphytica*, 175: 91 - 107.
- Konovalov F A, Toshchakova E V, Gostimsky S A. 2009. CAPS markers for the identification of garden pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Russian Journal of Genetics*, 45 (2): 284 - 288.
- Labate J A, Baldo A M. 2005. Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing. *Molecular Breeding*, 16: 343 - 349.
- Lee G A, Koh H H, Chung H K, Dixit A, Chung J W, Ma K H, Lee S Y, Lee J R, Lee G S, Gwag J G, Kim T S, Park Y J. 2009. Development of SNP-based CAPS and dCAPS markers in eight different genes involved in starch biosynthesis in rice. *Molecular Breeding*, 24: 93 - 101.
- Lehmensiek A, Sutherland M W, McNamara R B. 2008. The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 721 - 728.
- Lijavezhy D, Cabezas J A, Ibanez A, Rodriguez V Martinez-Zapater J M. 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNP lex technology. *BMC Genomics*, 8: 424.
- Missaoui A M, Ha B K, Phillips D V, Boerma H R. 2007. Single nucleotide polymorphism detection of the Rcs3 gene for resistance to frogeye leaf spot in soybean. *Crop Science*, 47: 1681 - 1690.
- Picoult-Newberg L, Ideker T E, Pohl M G, Taylor S L, Donaldson M A, Nickerson D A, and Boyce-Jacino M. 1999. Mining SNPs from EST databases. *Genome Research*, (9): 167 - 174.
- Rostoks N, Mudie S, Cardle L, Russell J, Ramsay L, Booth A, Svensson J T, Wanamaker S I, Walia H, Rodriguez E M, Hedley P E, Liu H, Morris J, Close T J, Marshall D F, Waugh R. 2005. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol Gen Genomics*, 274: 515 - 527.
- Shu Yong-jun, Li Yong, Wu Na-la-hu, Bai Xi, Cai Hua, Ji Wei, Zhu Yan-ming. 2010. Mining and identification of SNP from EST sequences and conversion of CAPS markers in soybean. *Acta Agronomica Sinica*, 36 (4): 574 - 579. (in Chinese)
- 束永俊, 李 勇, 吴娜拉胡, 柏 锡, 才 华, 纪 巍, 朱延明. 2010. 大豆 EST-SNP 的挖掘、鉴定及其 CAPS 标记的开发. *作物学报*, 36 (4): 574 - 579.
- Soleimani V E, Baum B R, Johnson D A. 2003. Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 281 - 228.
- Somers D J, Kirkpatrick R, Moniwa M, Walsh A. 2003. Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome*, 46 (3): 431 - 437.
- Vezzulli S, Troggio M, Coppola G, Jermakow A, Cartwright D, Zharkikh A, Stefanini M, Grando M S, Viola R, Adam-Blondon A, Thomas M, This P, Velasco R. 2008. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 499 - 511.
- Wei Bo, Jing Rui-lian, Wang Cheng-she, Chang Xiao-ping. 2006. Assaying single nucleotide polymorphism in wheat (*Triticum aestivum* L.) with allele-specific PCR. *Scientia Agricultura Sinica*, 39 (7): 1313 - 1320. (in Chinese)
- 卫 波, 竟蕊莲, 王成社, 昌小平. 2006. 用等位基因特异 PCR 检测普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的单核苷酸多态性. *中国农业科学*, 39 (7): 1313 - 1320.
- Wu Bo, Yang Run-ting, Zhu Shi-ping, Zhong Yun, Jiang Bo, Zeng Ji-wu, Zhong Guang-yan. 2012. Genotyping single nucleotide polymorphisms in mandarin cultivars using high resolution melting analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (4): 777 - 782. (in Chinese)
- 吴 波, 杨润婷, 朱世平, 钟 云, 姜 波, 曾继吾, 钟广炎. 2012. 宽皮柑橘单核苷酸多态性的高分辨率溶解曲线分型. *园艺学报*, 39 (4): 777 - 782.
- Yoon M S, Song Q J, Choi I Y, Specht J E, Hyten D L, Cregan P B. 2007. BARCSoySNP23: A panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 885 - 899.
- Zhu Y L, Song Q J, Hyten S M, Fickus E W, Young N D, Gregan P B. 2003. Single nucleotide polymorphism in soybean. *Genetics*, 163: 1123 - 1134.