

# 链格孢属小孢子种 ISSR 和 RAPD-PCR 最佳反应体系的建立

刘振亚<sup>1</sup>, 熊仁次<sup>1,2</sup>, 朱天生<sup>1,2</sup>

(1. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆农业有害生物综合治理重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

**摘 要:**以 13 个链格孢属小孢子种菌株为试材, 采用正交实验设计的方法, 研究  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶和引物 4 个因素在 4 个水平上对链格孢属小孢子种的 ISSR 和 RAPD 反应体系的影响。结果表明:链格孢属小孢子种 ISSR 和 RAPD 的最佳反应体系为 25  $\mu$ L 的 ISSR-PCR 反应体系中,  $10\times$  PCR Buffer 2.50  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.50 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.10 mmol/L, 引物浓度为 0.30  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.25 U; 在 RAPD-PCR 反应体系中,  $10\times$  PCR Buffer 2.50  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.00 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L, 引物浓度为 0.60  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.25 U; 在此基础上, 对最佳反应体系的退火温度进行了筛选确定; 在确定退火温度后, 采用最佳反应体系, 用 ISSR 引物 UBC808 和 RAPD 引物 OPE07 进行稳定性和通用性验证, 结果表明该优化反应体系具有较好的稳定性和通用性。

**关键词:**链格孢属小孢子种; ISSR; RAPD; 正交设计; 体系优化

**中图分类号:**S 432.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0105-06

红枣作为环塔里木盆地治理塔克拉玛干沙漠防风固沙的经济林树种, 明显改善了当地的生态环境, 扬沙

**第一作者简介:**刘振亚(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为果树病理学。E-mail: liuzhenya\_sm@126.com.

**责任作者:**朱天生(1974-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事植物病理学等研究工作。E-mail: ztszky@163.com.

**基金项目:**兵团产学研重大合作科技专项资助项目(2013AA001-1); 北京市援助和田科技攻关资助项目(201106)。

**收稿日期:**2015-01-22

扬尘天气减少, 空气湿润度增加, 空气质量得到改善, 同时整个红枣产业链的发展, 能够带动当地的就业, 促使南疆各族人民生活质量的提高, 将会进一步改善边疆社会稳定的现状。但近几年, 由链格孢属小孢子种引起的黑斑病、缩果病等病害发生越来越严重, 造成了较大的经济损失, 而目前有关这些病害的病原种级分类是不确定的, 给该类病害的防治工作带来一定的困难, 因此对链格孢属小孢子种病原种级分类单位的准确鉴定显得尤为重要。但是种级分生孢子具有多型现象, 特别是小

## Establishment of Regeneration System of *Atropa belladonna*

ZOU Lijuan, WU Qinggui, XIE Mushan, LIU Danli, LUO Minghua

(Ecological Security and Protection Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Science and Technology, Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan 621000)

**Abstract:** Taking seedlings of *Atropa belladonna* as explants, by tissue culture methods, MS as basic culture medium with different concentrations of IAA, NAA, 6-BA and KT were used to establish the optimal media for callus induction and differentiation. The results showed that 100% of calli induction rate was obtained on MS medium with KT 0.5 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L and KT 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L. Calli could not be induced on MS medium with the combination of auxin and KT or 6-BA. The induced calli on MS media with KT or KT with 6-BA were subcultured optimally at 20 days and 40 days.  $1/2MS + NAA$  0.2—0.4 mg/L was the optimal medium for plants' rooting. This study would provide the technological system of tissue culture for *Atropa belladonna* regeneration.

**Keywords:** *Atropa belladonna*; callus; differentiation; plant regeneration

孢子种,大小幅度变化较大,不同的培养条件对分生孢子的形态也产生一定的影响,而且不同的菌系在相同的人工培养条件下分生孢子具有趋同现象,这给从传统形态学鉴定到种带来了很大的困难<sup>[1]</sup>,因此需借助一定的分子手段如分子标记技术等,结合形态学鉴定的方法进行准确鉴定。分子标记即以 DNA 分子的多态性为基础的遗传标记,本质上是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段<sup>[2]</sup>。RAPD 分子标记技术是利用个随机序列的寡核苷酸作为引物,通常为 10 个碱基,通过 PCR 反应非定点地扩增 DNA 片段,然后用凝胶电泳分离扩增产物 DNA 序列的多态性。扩增产物 DNA 序列的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性,可用于分类和系统的演化研究,区分不同病菌的种类及同一种类的不同菌株<sup>[3]</sup>,而 ISSR 分子标记技术是引物与基因组 DNA 中的 SSR 的 5' 或 3' 末端结合,导致位于反向排列的间隔不太大的重复序列间的基因组片段进行扩增,由于 SSR 在真核生物中的普遍存在及其变异进化速度非常快,因而锚定引物的 ISSR-PCR 扩增能够检测基因组许多位点的差异,揭示遗传上的差异<sup>[4]</sup>。目前,RAPD 分析已经在链格孢种级分类研究得到了应用,但不同的学者对 RAPD 分析是否能准确区分链格孢小孢子存在不同的看法,COOK<sup>[5]</sup>认为 RAPD 分析可以明确区分 *Alternaria* 不同的种,而王洪凯等<sup>[6]</sup>认为 RAPD 分析不能把链格孢小孢子区分开。ISSR 分析尚鲜见相关的报道,但 ISSR 稳定性好,揭示的 DNA 多态性比较高,可以获得几倍于 RAPD 的信息量<sup>[7]</sup>,因此该研究的目的是检验 RAPD 和 ISSR 2 种分析方法是否能作为链格孢种级鉴定的辅助手段,为链格孢的遗传分析和分类研究提供 DNA 水平的证据<sup>[8]</sup>。

RAPD 和 ISSR 分子标记都是基于 PCR 的一种技术,易受多种因素的干扰,因此在使用 RAPD 和 ISSR 技术前,需先建立稳定可靠的反应体系,以确保结果的稳定性和可靠性。该试验采用正交实验设计方法,对影响 PCR 反应体系的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物等因素在 4 因素 4 水平上进行优化试验,得到适合于链格孢属小孢子种 ISSR 和 RAPD 的最佳反应体系,以期作为 RAPD 和 ISSR 2 种分析方法是否能作为链格孢种级鉴定的辅助手段以及相关研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 供试链格孢属小孢子种采自阿克苏、阿拉尔、和田等新疆南疆地区,通过组织分离纯化得到目的病原菌,经过形态学检测,证实供试菌株为 *Alternaria* sp.。

1.1.2 主要试剂 试验所用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、

10×PCR Buffer、 $Mg^{2+}$ 、DL 10 000 Ladder Marker、ISSR 引物 UBC808、UBC809<sup>[9]</sup> 和 RAPD 引物 OPR02、OPE07<sup>[8]</sup> 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照夏花<sup>[10]</sup>的方法,并做改进。称取 0.1 g 的菌丝体,加入一定量的 CTAB 和适量的石英砂研磨充分,取研磨液于 1.5 mL 的离心管中,65℃水浴 20 min,加入 600  $\mu$ L 17.5 mol/L NaCl 溶液,充分混匀后,冰浴 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液到新的离心管中,加入等体积的氯仿:异丙醇(24:1),轻摇 10 min,13 000 r/min 离心 5 min 后,加入 0.1 倍的 3 mol/L 醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇(醋酸钠和无水乙醇提前放在-20℃冰箱中预冷),13 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀,用 500  $\mu$ L 冷冻的 70% 的酒精洗涤沉淀 2 次,待乙醇挥发后,向离心管中加入 100  $\mu$ L TE(pH 8.0),4℃放置过夜,使 DNA 充分溶解,待 DNA 充分溶解后,向其中加入 1  $\mu$ L 10 mg/mL RNase,37℃水浴 2 h<sup>[11]</sup>,使 RNA 完全降解。

1.2.2 PCR 扩增 ISSR-PCR 反应条件<sup>[9]</sup>:94℃预变性 4 min,94℃变性 1 min,50℃退火 1 min,72℃延伸 90 s,35 个循环,结束循环后,72℃再延伸 10 min;RAPD-PCR 反应条件<sup>[8]</sup>:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,36℃退火 30 s,72℃延伸 80 s,45 个循环,结束循环后,72℃再延伸 5 min。PCR 产物检测:用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 1×TAE,在 120 V 稳定电压的条件下,电泳 45 min,用凝胶成像系统照相。

1.2.3 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 反应体系的正交设计 ISSR 随机引物 UBC809<sup>[9]</sup> (AGAGAGAGAGAGAGAGG) 和 RAPD 随机引物 OPR02<sup>[8]</sup> (CACAGCTGCC) 作为正交实验的引物,采用  $L_{16}(4^4)$  正交实验设计原理,在 25  $\mu$ L 反应体系中,对影响 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 试验的 4 个因素 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 $Mg^{2+}$  和引物,每个因素设置 4 个水平进行筛选分析(表 1 和表 2<sup>[12]</sup>),共计 16 个处理(表 3 和表 4),其中,在每管加入 2.5  $\mu$ L 的 10×PCR Buffer,按照各因素的浓度计算各因素的用量,用无菌双蒸水补足 25  $\mu$ L。

表 1 ISSR-PCR 反应的因素和水平

Table 1 Factors and levels of ISSR-PCR reaction

水平 Level	因素 Factor			
	$Mg^{2+}$ /(mmol · L <sup>-1</sup> )	dNTPs /(mmol · L <sup>-1</sup> )	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA polymerase /(U · $\mu$ L <sup>-1</sup> )	引物 Primer /( $\mu$ mol · L <sup>-1</sup> )
1	1.00	0.10	0.50	0.20
2	1.50	0.15	0.75	0.30
3	2.00	0.20	1.00	0.40
4	2.50	0.25	1.25	0.50

表 2 RAPD-PCR 反应的因素和水平

Table 2 Factors and levels of RAPD-PCR reaction

水平 Level	因素 Factor			
	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase	引物 Primer
	/(mmol · L <sup>-1</sup> )	/(mmol · L <sup>-1</sup> )	/(U · μL <sup>-1</sup> )	/(μmol · L <sup>-1</sup> )
1	1.00	0.10	0.50	0.20
2	1.50	0.15	0.75	0.40
3	2.00	0.20	1.00	0.60
4	2.50	0.25	1.25	0.80

表 3 ISSR-PCR 体系筛选正交实验设计 L<sub>16</sub> (4<sup>4</sup>)

Table 3 The orthogonal design for ISSR-PCR

编号 No.	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase	引物 Primer
	/(mmol · L <sup>-1</sup> )	/(mmol · L <sup>-1</sup> )	/(U · μL <sup>-1</sup> )	/(μmol · L <sup>-1</sup> )
1	1.00	0.10	0.50	0.20
2	1.00	0.15	0.75	0.30
3	1.00	0.20	1.00	0.40
4	1.00	0.25	1.25	0.50
5	1.50	0.10	0.75	0.40
6	1.50	0.15	0.50	0.50
7	1.50	0.20	1.25	0.20
8	1.50	0.25	1.00	0.30
9	2.00	0.10	1.00	0.50
10	2.00	0.15	1.25	0.40
11	2.00	0.20	0.50	0.30
12	2.00	0.25	0.75	0.20
13	2.50	0.10	1.25	0.30
14	2.50	0.15	1.00	0.20
15	2.50	0.20	0.75	0.50
16	2.50	0.25	0.50	0.40

1.2.4 退火温度的优化 在试验确定的最佳反应体系的基础上,对试验所用的 ISSR 引物 UBC809 和 RAPD 引物 OPR02 的退火温度进行优化,ISSR 引物按照 54、52、50、48℃,RAPD 引物按照 40、38、36、34℃共 4 个退火温度梯度试验,确定最佳的退火温度。

表 4 RAPD-PCR 体系筛选正交实验设计 L<sub>16</sub> (4<sup>4</sup>)

Table 4 The orthogonal design for RAPD-PCR

编号 No.	Mg <sup>2+</sup>	dNTPs	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase	引物 Primer
	/(mmol · L <sup>-1</sup> )	/(mmol · L <sup>-1</sup> )	/(U · μL <sup>-1</sup> )	/(μmol · L <sup>-1</sup> )
1	1.00	0.10	0.50	0.20
2	1.00	0.15	0.75	0.40
3	1.00	0.20	1.00	0.60
4	1.00	0.25	1.25	0.80
5	1.50	0.10	0.75	0.60
6	1.50	0.15	0.50	0.80
7	1.50	0.20	1.25	0.20
8	1.50	0.25	1.00	0.40
9	2.00	0.10	1.00	0.80
10	2.00	0.15	1.25	0.60
11	2.00	0.20	0.50	0.40
12	2.00	0.25	0.75	0.20
13	2.50	0.10	1.25	0.40
14	2.50	0.15	1.00	0.20
15	2.50	0.20	0.75	0.80
16	2.50	0.25	0.50	0.60

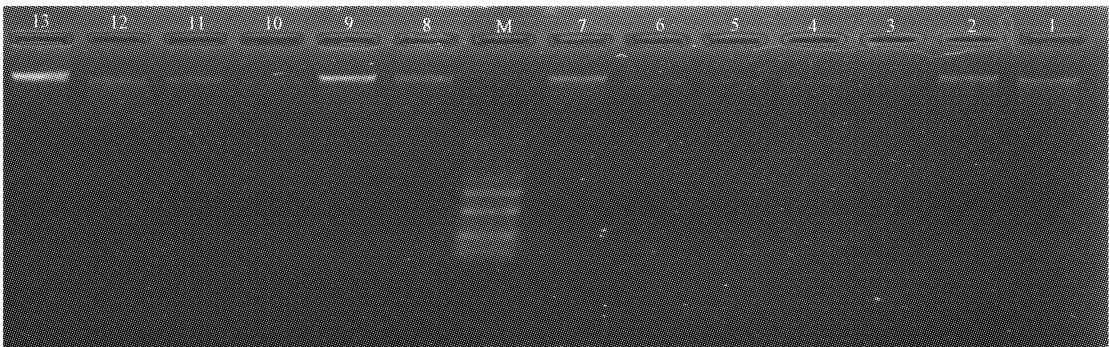
1.2.5 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 最佳反应体系的验证

采用 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 最佳反应体系,利用 ISSR 引物 UBC808 和 RAPD 引物 OPE07,对 13 个链格孢属小孢子种的 DNA 进行扩增,检验最佳反应体系的稳定性和通用性。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取效果

从图 1 可知,提取的基因组 DNA 完整,条带单一,蛋白质、多糖污染较少,无拖尾现象和无 RNA 条带,质量较好,适用于 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 的扩增。



注:M,Marker DL 2000;1~13 号菌株为 ALRZY,ALR12,ALRSG,AKST,AKSZCL,AKSYQ,ALRHB,ALRZQ,HTYP,HTKS-1,HTKS-3,HTYT-2,HT224-2。

Note:M,Marker DL 2000;1-13 strains are ALRZY,ALR12,ALRSG,AKST,AKSZCL,AKSYQ,ALRHB,ALRZQ,HTYP,HTKS-1,HTKS-3,HTYT-2,HT224-2.

图 1 不同链格孢小孢子种总 DNA 的检测结果

Fig. 1 The electrophoresis total DNA of different *Alternaria* small-spored species



## 2.2 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 反应体系的正交实验结果分析

从图 2 可知,ISSR-PCR 反应体系的正交实验各组合的扩增效果表现出一定的差异。组合 1、2、3、4、5、14 效果差,没有扩增出任何条带;组合 6、7、8、9、10 只能扩

增少量的条带,而且条带较弱;组合 11、12、13、15、16 均能扩增出的条带多态性丰富,无拖尾现象,但通过后期试验验证,组合 13 的稳定性最好。因此,确定组合 13 为链格孢属小孢子种 ISSR-PCR 的最佳反应体系。

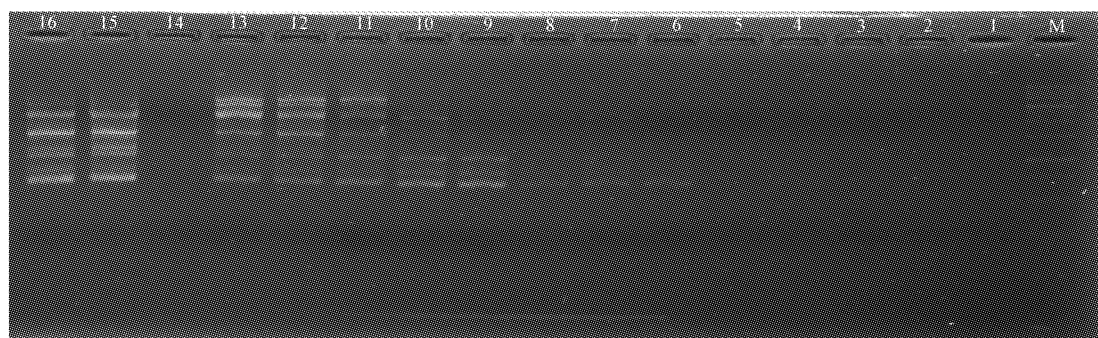


图 2 正交设计 ISSR-PCR 产物电泳结果

Fig. 2 The electrophoresis results of ISSR-PCR products

从图 3 可知,RAPD-PCR 反应体系组合 1、2、3、4、7、8 效果很差,没有扩增出条带;组合 5 的条带数少,而且条带不够明亮;组合 6、9、11、12、13、14、16 扩增的条带清晰明亮,但条带数少,多态性较低;组合 10、

15 扩增的条带清晰明亮,且多态性较高,但通过验证试验,组合 10 的稳定性好于组合 15。因此,确定组合 10 为链格孢属小孢子种 RAPD-PCR 的最佳反应体系。

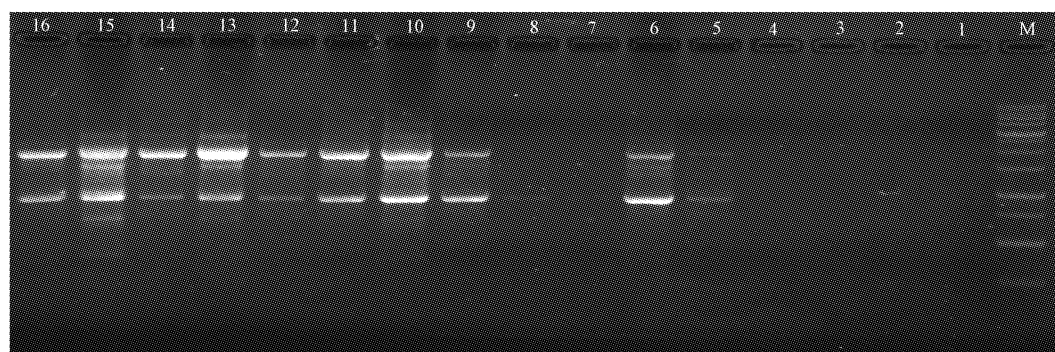


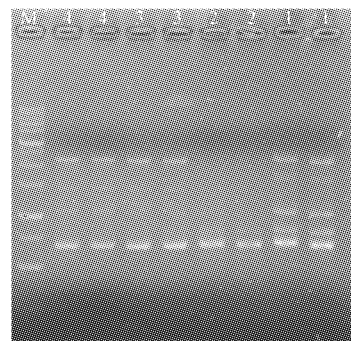
图 3 正交设计 RAPD-PCR 产物电泳结果

Fig. 3 The electrophoresis results of RAPD-PCR products

## 2.3 退火温度的优化

采用优化的反应体系对 ISSR-PCR 反应条件中的退火温度进行温度梯度试验,由图 4 可知,48~54℃ 4 个温度梯度都能扩增出条带,但在 48、50、52℃ 退火温度时,特异性较差,扩增的条带模糊、不清晰,退火温度为 54℃ 时,扩增的条带清晰明亮,多态性高,因此确定引物 UBC809 最佳退火温度为 54℃。

RAPD 引物 OPR02 的扩增结果见图 5,34~40℃ 4 个温度梯度均能扩增出条带,但在 34℃ 退火温度时,扩增的条带不明亮,36、38、40℃ 均能扩增出清晰明亮的条带,但从整个图谱看,40℃ 的退火温度的效果略优,因此确定引物 OPR02 最佳退火温度为 40℃。

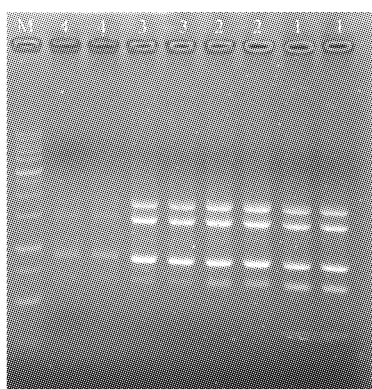


注:M,Marker DL 2000;1. 54℃;2. 52℃;3. 50℃;4. 48℃。

Note:M,Marker DL 2000;1. 54℃;2. 52℃;3. 50℃;4. 48℃.

图 4 退火温度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

Fig. 4 Effect of annealing temperature on ISSR-PCR



注: M, Marker DL 2000; 1. 40℃; 2. 38℃; 3. 36℃; 4. 34℃。

Note: M, Marker DL 2000; 1. 40℃; 2. 38℃; 3. 36℃; 4. 34℃。

图5 退火温度对 RAPD-PCR 扩增结果的影响

Fig. 5 Effect of annealing temperature on RAPD-PCR

## 2.4 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 反应体系稳定性的检验

采用优化的 PCR 反应体系,以 ISSR 引物 UBC808 和 RAPD 引物 OPE07 来验证 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 的最佳反应体系的稳定性和通用性。

由图 6、7 可以看出,通过 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 的最佳反应体系对 13 个 DNA 样品进行扩增,均能扩增出清晰明亮、稳定性强的条带,表明优化确立的 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 反应体系是稳定可靠的。

## 3 讨论与结论

ISSR 和 RAPD 分子标记都是基于 PCR 的一种技术,扩增结果易受  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物等因素的影响,因此,在使用这 2 项分子标记技术前,需先优化 PCR 反应体系,摸索出最佳的反应体系。目前常用优化 PCR 反应体系的方法是单因素设计方法和正交

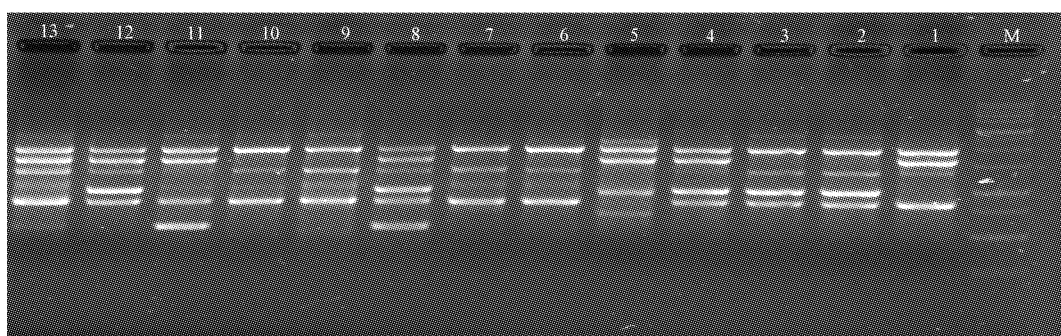


图6 引物 UBC808 扩增结果

Fig. 6 Electrophoresis results of ISSR-PCR products with primers UBC808

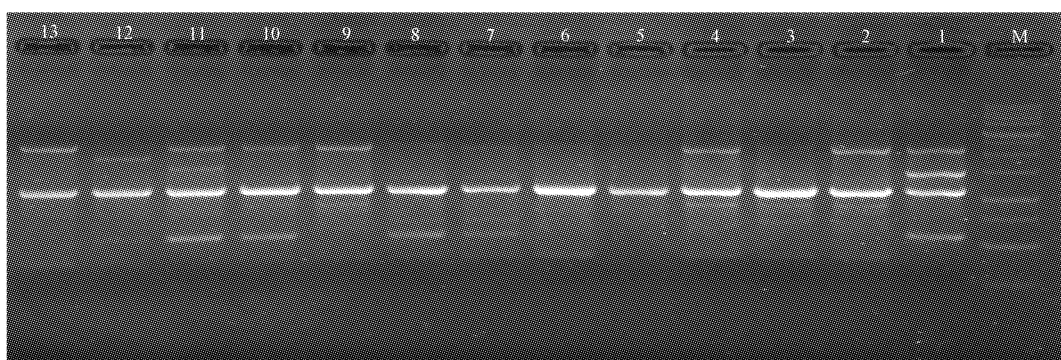


图7 引物 OPE07 扩增结果

Fig. 7 Electrophoresis results of RAPD-PCR products with primers OPE07

实验设计方法,但单因素设计方法需要进行多次梯度试验,过程繁琐,且不能兼顾到各因素间的交互作用<sup>[13]</sup>,此外,单因素设计方法也不能完全保证各组较优浓度的组合就是较优的反应体系<sup>[14]</sup>,而正交实验设计方法具有整齐可比和均衡分散的特点,可以全面了解试验的情况和各因子之间相互影响的规律<sup>[15]</sup>。因此,该试验采用正交实验设计方法优化 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 的最佳

反应体系。

$Mg^{2+}$  浓度过低或过高均会影响扩增结果, $Mg^{2+}$  是 *Taq* 酶的激活剂, $Mg^{2+}$  浓度过高抑制该酶的活性,过低又会对 *Taq* 酶的活化作用不够<sup>[16]</sup>。该试验结果表明,在 ISSR-PCR 反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度 2.50 mmol/L 最适,而在 RAPD-PCR 反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度 2.00 mmol/L 最适。

dNTPs 是 PCR 反应的原料,因此 dNTPs 浓度过低



时会导致 PCR 反应不彻底,浓度过高则会影响 PCR 反应进行<sup>[17]</sup>。该试验结果表明,在 ISSR-PCR 反应体系中,dNTPs 的最佳浓度为 0.10 mmol/L,而在 RAPD-PCR 反应体系中,dNTPs 的最佳浓度为 0.15 mmol/L。

*Taq* 酶的用量是 PCR 反应中的重要因子,它直接影响多态性的检出率和扩增结果的重复性及忠实性<sup>[18]</sup>。该试验结果表明,在 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 反应体系中,*Taq* 酶的最佳浓度均为 1.25 U。

引物浓度也是影响试验的一个重要因素,引物浓度过高,易引起碱基错配和产生非特异性扩增,还易形成引物二聚体;引物浓度过低,其与 DNA 模板结合位点少,扩增产量下降,并有可能出现 Smear 现象<sup>[19]</sup>。该试验结果表明,在 ISSR-PCR 反应体系中,引物最佳浓度为 0.30  $\mu$ mol/L,而在 RAPD-PCR 反应体系中,引物的最佳浓度为 0.60  $\mu$ mol/L。

综上所述,该试验对影响 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 反应体系中的因素,采用正交设计方法进行优化,最终确定了 ISSR-PCR 和 RAPD-PCR 的最佳反应体系:25  $\mu$ L 的 ISSR-PCR 反应体系中,10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, $Mg^{2+}$  浓度为 2.50 mmol/L,dNTPs 浓度为 0.10 mmol/L,引物浓度为 0.30  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.25 U;而 25  $\mu$ L 的 RAPD-PCR 反应体系中,10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, $Mg^{2+}$  浓度为 2.00 mmol/L,dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L,引物浓度为 0.60  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.25 U。

#### 参考文献

- [1] 王义勋. 苍术黑斑病病原学研究[D]. 武汉:华中农业大学,2006.
- [2] 许娟. 安徽小麦赤霉病菌生物学特性及遗传多样性研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2012.
- [3] 吕柏林. 河南省小麦纹枯病菌致病力分化及遗传多样性研究[D]. 郑州:河南农业大学,2011.
- [4] 姜占发. 棉花黄萎病菌基因组 ISSR 分子指纹分析[D]. 保定:河北农业大学,2002.
- [5] COOK D E. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR[J]. *Ann Appl Biol*,1998,132:197-209.
- [6] 王洪凯,张天宇. 链格孢属小孢子种的 RAPD 分析[J]. 菌物系统,2003,22(1):35-41.
- [7] 尹志新. 我国棉花黄萎病菌遗传多样性分析[D]. 安阳:中国农业科学院棉花研究所,2011.
- [8] 孙霞. 链格孢属真菌现代分类方法研究[D]. 泰安:山东农业大学,2006.
- [9] 王叶. 枣果实病原真菌的鉴定及链格孢属病原真菌多样性研究[D]. 郑州:河南农业大学,2013.
- [10] 夏花. 辣椒上一种新病害病原鉴定及尖孢炭疽菌株比较研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2012.
- [11] 臧睿. 中国苹果树腐烂病菌的种群组成、分子检测及其 ISSR 遗传分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [12] 台莲梅. 马铃薯早疫病菌多样性和侵染过程及品种抗病机制研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2011.
- [13] 卢莉,张强,王玉花,等. 利用正交设计优化茶树 ISSR 反应体系[J]. 经济林研究,2010,28(1):14-19.
- [14] 陈思,曹远银,李天亚,等. 小麦秆锈菌 RAPD 扩增体系的正交优化[J]. 沈阳农业大学学报,2014,45(3):339-342.
- [15] 刘楠楠,薛运波,王志,等. 蜜蜂遗传多样性研究的 RAPD-PCR 反应体系的正交优化[J]. 吉林畜牧兽医,2011,9(32):4-7.
- [16] 李雪峰,张含国,贯春雨,等. 利用正交设计优化兴安落叶松 RAPD-PCR 反应体系[J]. 植物研究,2009,29(1):80-85.
- [17] 李萌伟,李芳菲,樊志宏,等. 紫丁香蘑 ISSR-PCR 反应体系的正交优化与建立[J]. 生物技术,2013,23(6):55-59.
- [18] 闫林,黄丽芳,谭乐和,等. 咖啡 ISSR 与 RAPD-PCR 反应体系优化[J]. 热带作物学报,2012,33(5):854-859.
- [19] 王彦华,侯喜林,徐明宇,等. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究[J]. 西北植物学报,2004,24(5):899-902.

## Optimization of ISSR and RAPD-PCR Reaction Systems for *Alternaria* Small-spored Species

LIU Zhenya<sup>1</sup>, XIONG Renci<sup>1,2</sup>, ZHU Tiansheng<sup>1,2</sup>

(1. College of Plant Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300; 2. Southern Xinjiang Key Laboratory of IPM of Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

**Abstract:** Using 13 *Alternaria* small-spored species as materials, the orthogonal design were used to optimize ISSR and RAPD reaction system for *Alternaria* small-spored species, four including factors on ISSR and RAPD, including  $Mg^{2+}$ , dNTPs, *Taq* DNA polymerase and primer at four levels. The results showed that the optimal ISSR and RAPD reaction system for *Alternaria* small-spored species were established as follows: in 25  $\mu$ L ISSR-PCR system were 10 $\times$ PCR Buffer 2.50  $\mu$ L, 2.50 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.10 mmol/L dNTPs, 0.30  $\mu$ mol/L primer, 1.25 U *Taq* DNA polymerase; in ISSR-PCR system were 10 $\times$ PCR Buffer 2.50  $\mu$ L, 2.00 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.15 mmol/L dNTPs, 0.60  $\mu$ mol/L primer, 1.25 U *Taq* DNA polymerase; decided the annealing temperature of optimal reaction system, then ISSR primer UBC808 and RAPD primer OPE07 were used to carry out stable and adaption in the optimal ISSR and RAPD reaction system at the optimal annealing temperature, indicating that the optimal ISSR and RAPD reaction system were stable and adapted.

**Keywords:** *Alternaria* small-spored species; ISSR; RAPD; orthogonal design; system optimization