

内切酶接头引物对柿属 SSAP分子标记扩增的影响

杜晓云^{1,2}, 黄建民¹, 张青林², 罗正荣^{2*}

(1. 江西省农业科学院 园艺研究所, 江西 南昌 330200; 2. 华中农业大学 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: SSAP (sequence-specific amplification polymorphism, 序列特异扩增多态性) 是种质遗传多样性分析和系统进化研究的有力工具之一。根据 10 个 SSAP 引物组合对 28 份柿属基因型的扩增结果探讨内切酶因素对 SSAP 逆转座子分子标记扩增的影响。结果表明, 在以 *Mse* I 和 *EcoR* I 组合消化的 SSAP 反应系统, 且均以 3 个碱基作为末端选择性碱基的前提下, *Mse* I 与逆转座子引物组合的 SSAP 扩增性能优于 *EcoR* I 与逆转座子引物组合。研究结果为有目的和高效选择内切酶引物进行植物种质资源 SSAP 分析提供参考。

关键词: 柿; 逆转座子; SSAP 分子标记

中图分类号: S665.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)02-0368-05

Influence of Restriction Endonuclease on the Performance of Retrotransposon - based SSAP Amplification in *Diospyros* spp.

DU Xiao-yun^{1,2}, HUANG Jian-min¹, ZHANG Qing-lin², LUO Zheng-rong^{2*}

(1. Institute of Horticultural Sciences, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 2. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology Affiliated to Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: SSAP (Sequence - Specific Amplification Polymorphism) molecular marker has proven to be highly efficient in estimating genetic diversity and determining phylogenetic relationships in plant. Based on the result of SSAP molecular data derived from 10 primer combinations on 28 *Diospyros* spp., the influence of restriction endonuclease on the performance of SSAP amplification was conducted. The results showed that when the SSAP analysis was digested by the combination of *Mse* I and *EcoR* I restriction endonuclease, moreover, its selective PCR amplification was performed with a retrotransposon primer in combination with either *Mse* I + 3 or *EcoR* I + 3, the performance of SSAP amplification with the combination of retrotransposon primer and *Mse* I + 3 was superior than that with the combination of retrotransposon primer and *EcoR* I + 3. These results would provide a guidance for high efficient and specific selection of restriction endonuclease in application of SSAP retrotransposon - based molecular marker in analysis of plant germplasm.

Key words: *Diospyros kaki* Thunb.; retrotransposon; SSAP (sequence - specific amplified polymorphism)

收稿日期: 2009 - 11 - 27 修回日期: 2010 - 01 - 14

基金项目: 国家自然科学基金 (30871686)、华中农业大学科研启动基金 (20070504011) 和江西省农业科学院创新基金 (博士启动项目: 2009博 - 8)

作者简介: 杜晓云 (1979 -), 女, 助理研究员, 主要从事果树种质资源与生物技术研究, E-mail: duxiaoyunduzi@126.com; *通讯作者: 罗正荣, 教授, E-mail: luozhr@mail.hzau.edu.cn

SSAP (sequence - specific amplified polymorphism, 特异序列扩增多态性) 为系列逆转座子分子标记技术中应用最广、效率最高的一种^[1], 由 Waugh 等^[2]根据 AFLP (amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性) 改进而来, 不同于 AFLP 之处在于选择性扩增中的接头引物之一被逆转座子引物替换。SSAP 整个实验过程需要经过内切酶消化、连接、预扩增、选择扩增及终产物 PAGE 胶分离等多步操作, 每一环节中相关联的因子均可能对实验结果造成影响, 而且反应中使用的各种内切酶类以及银染显象的检测体系均系较高成本投入, 因此, 对 SSAP 分子标记扩增影响因素的研究对于提高实验效率、减少成本具有重要意义。目前有关 SSAP 在植物遗传多样性检测、系统发育重建及连锁图谱构建等研究^[3-16]中的具体应用较多, 但对于影响 SSAP 扩增因素的研究鲜见报道, 加之 SSAP 的高效性, 应用很少数目的引物组合即可获得较丰富的遗传信息, 故从已有研究中归纳不同引物组合对 SSAP 扩增反应的影响规律用以指导 SSAP 引物有效选择, 尚缺乏较系统的数据资料可循。因此, 本研究拟对内切酶接头引物对 SSAP 逆转座子标记扩增的影响展开研究, 以期明确内切酶接头引物对 SSAP 逆转座子标记扩增的影响, 为在植物种质资源分析中有目的和高效选择内切酶引物进行 SSAP 分析提供参考。

表 1 试验试材

Tab 1 List of 28 *Diospyros* spp used in the study

编号 Code	基因型 Genotype	学名 Scientific name	脱涩类型 Astringent type	起源地 Origin
1	90 - 1 - 37	<i>Diospyros kaki</i> Thunb	PCNA	China
2	90 - 1 - 10	<i>D. kaki</i> Thunb	PVNA	China
3	90 - 3 - 99	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
4	90 - 1 - 15	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
5	90 - 1 - 34	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
6	90 - 3 - 4	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
7	90 - 3 - 77	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
8	罗田甜柿 (Luotian - tianshi)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
9	鄂柿 1 号 (Eshi 1)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
10	四方甜柿 (Sifang - tianshi)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
11	小果甜柿 (Xiaoguo - tianshi)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
12	铜盆柿 (Tongpenshi)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCA	China
13	磨盘柿 (Mopanshi)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCA	China
14	宝盖甜柿 (Baogai - tianshi)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
15	小宝盖甜柿 (Xiaobaogai - tianshi)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
16	湘西甜柿 (Xiangxi - tianshi)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	China
17	前川次郎 (Maekawa - Jirou)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	Japan
18	次郎 (Jirou)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	Japan
19	华柿 1 号 (Huashi 1)	<i>D. kaki</i> Thunb	PVA	Japan
20	富有 (Fuyuu)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	Japan
21	松本早生 (Matsumoto - wase)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	Japan
22	上西早生 (Uenishi - wase)	<i>D. kaki</i> Thunb	PCNA	Japan
23	君迁子 (Date plum)	<i>D. lotus</i> L.	PCA	China
24	浙江柿 (Chekiang persimmon)	<i>D. glaucifolia</i> Metc	PCA	China
25	老鸦柿 (Diamond leaf persimmon)	<i>D. rham bifolia</i> Hemsl	PCA	China
26	油柿 (Oily persimmon)	<i>D. oleifera</i> Cheng	PCA	China
27	美洲柿 (Common persimmon)	<i>D. virginiana</i> L.	PCA	USA
28	金枣柿 (Jinzaoshi)	?	PCA	China

PCNA: 完全甜柿; PCA: 完全涩柿; PVNA: 不完全甜柿; PVA: 不完全涩柿; ?: 分类学地位尚未明确。

PCNA: Pollination - constant nonastringent; PCA: Pollination - constant astringent; PVNA: Pollination - variant nonastringent; PVA: Pollination - variant astringent; ?: The taxonomic status is unclear

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为柿属 7 种 28 个基因型 (表 1), 均采自华中农业大学柿圃。基因组 DNA 提取方法参考 Doyle and Doyle^[17]。

1.2 试验方法

1.2.1 SSAP 分析 SSAP 流程参考 Waugh 等^[12]和 Vos 等^[18]。选择性扩增由 *Mse* - CAG, *EcoR* - ACG 接头引物分别与逆转座子引物组合完成。接头及预扩增接头引物序列参考 Vos 等^[18], 逆转座子引物参考 Du 等^[15], 序列见表 2。PCR 终产物由质量分数为 6% 聚丙烯酰胺变性胶 60 W 恒功率电泳检测, 银染显色。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应中涉及到的分子生物学试剂均为北京三博远志生物技术有限责任公司。内切酶购于深圳晶美生物工程公司。

表 2 本研究所用逆转座子引物

Tab 2 Retrotransposon primers used in this study

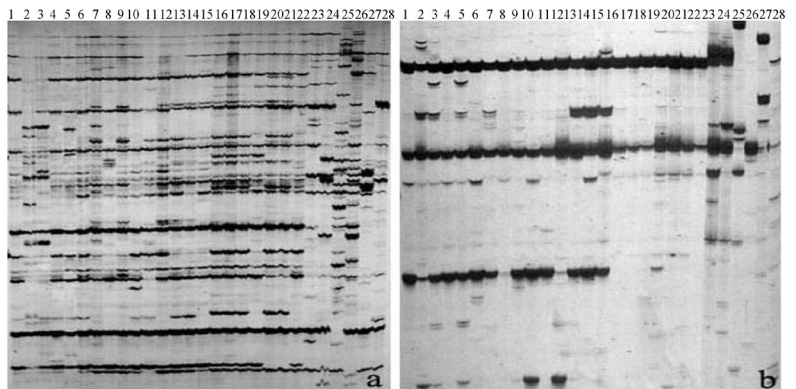
引物 Primer	方向 Orientation instance	序列 (5' - 3') Sequence (5' - 3')
<i>rdk14</i> - <i>r1</i>	Antisense	CA TTGGGTCCA TCA GTTICC
<i>rdk16</i> - <i>r9</i>	Antisense	CAACACGAAA TACGGCTACG
<i>rdk16</i> - <i>r10</i>	Antisense	CTGCGACTTCACCAA GCCA TAAA
<i>rdk11</i> - <i>p1</i>	Sense	GCTTGA GGGGGA GTGTTGA GTT
<i>rdk4</i> - <i>p3</i>	Sense	GAA GGA GGTCTAAACTGA GGAAA

1.2.2 SSAP 数据统计及分析 电泳条带按 1/0 形式进行数据转换, 只统计清晰、再现性强的条带。扩增产物按同一位点条带有或无分别赋值, 有带记为“1”, 无带则记为“0”; 采用 NTSYS - pc Version 2.1^[19] 软件计算遗传距离和进行 Mantel 检验分析聚类结果之间的相关性。

2 结果与分析

5 个引物共扩增出 142 条带, 其中多态性带 141 条, 多态位点百分率为 99.30%。扩增片段大小在 100 ~ 2 000 bp。引物扩增总带数介于 20 ~ 42 条, 平均每个引物产生 28 条带。图 1 所示为引物组合 *rdk14/Mse* (CAG) 和 *rdk4/EcoR* (ACG) 的 SSAP 扩增电泳图谱。

逆转座子的扩增性能因选择性扩增时酶接头引物的种类不同而有别。由表 3 可以看出, 除 *rdk16-r10/EcoR* (ACG) 外, 与 *Mse*I 选扩引物组合 (逆转座子 / M) 的 SSAP 扩增性能普遍优于 *EcoR* 组合 (逆转座子 / E), 就同一逆转座子而言, 由前类组合扩增产生的总位点数高于后类组合, 二者差异最高达 7 倍之多 (*rdk-r9*, 70/9), 平均差异近 2 倍。进一步分析发现, 多态位点百分率与使用的酶接头引物似乎没有必然的相关性, 但 SSAP 分析所能反映的种质间平均遗传距离值除 *rdk16* 外, 其它 3 个逆转座子均为逆转座子 / M 组合要高于逆转座子 / E 组合, 而且每个 SSAP 组合



1 - 28 号对应基因型见表 1。

Lanes 1 - 28 correspond to the accessions listed in Table 1.

a: *rdk14/Mse* (CAG), b: *rdk4/EcoR* (ACG).

图 1 引物组合 *rdk14/Mse* (CAG) (a) 和 *rdk4/EcoR* (ACG) 在 28 份柿属植物基因型中的 SSAP 扩增图谱。

Fig 1 SSAP profiles of 2 retrotransposon primer combinations on 28 accessions

与 10 对 SSAP 引物组合总的聚类结果间的相关性比较也表明,逆转座子 / M 组合的相关系数值普遍较逆转座子 / E 组合的高。

表 3 SSAP 分子标记反映的多样性信息

Tab 3 Diversity information for SSAP markers in accessions analyzed

逆转座子 Retrotransposon	选扩引物 Selective primer	扩增总带数 No. amplified bands	多态性百分比 / % Percent polymorphism	平均遗传距离 Average genetic distance	Mantel 相关性值 (r) Mantel correlation value
<i>rtk14</i>	<i>Mse</i> (CAG)	32	81.3	0.231	0.79
	<i>EcoR</i> (ACG)	25	88.0	0.228	0.69
	总计 Total	57	84.2	0.230	0.87
<i>rtk16 - r9</i>	<i>Mse</i> (CAG)	70	100.0	0.332	0.79
	<i>EcoR</i> (ACG)	9	100.0	0.204	0.58
	总计 Total	79	100.0	0.317	0.82
<i>rtk16 - r9 - r10</i>	<i>Mse</i> (CAG)	56	87.5	0.265	0.90
	<i>EcoR</i> (ACG)	75	98.7	0.353	0.95
	总计 Total	131	94.7	0.316	0.98
(Average)	<i>Mse</i> (CAG)	63	94.4	0.302	0.96
	<i>EcoR</i> (ACG)	42	98.8	0.337	0.95
	总计 Total	105	96.2	0.316	0.98
<i>rtk11</i>	<i>Mse</i> (CAG)	73	93.2	0.300	0.96
	<i>EcoR</i> (ACG)	30	83.3	0.203	0.82
	总计 Total	103	90.3	0.272	0.96
<i>rtk4</i>	<i>Mse</i> (CAG)	58	96.6	0.313	0.95
	<i>EcoR</i> (ACG)	29	89.7	0.236	0.80
	总计 Total	87	94.3	0.287	0.96

3 讨 论

本研究对内切酶种类对 SSAP 扩增的影响进行探讨,结果表明,在以 *Mse*I 和 *EcoR*I 组合消化的 SSAP 反应系统,且均以 3 个碱基作为末端选择性碱基的前提下,*Mse*I 与逆转座子引物组合的 SSAP 扩增性能优于 *EcoR*I 与逆转座子引物组合。SSAP 选择性扩增中逆转座子 / E 引物组合产生的扩增位点过少,可能与 E 引物末端选择性碱基个数过多有关,也可能因 *EcoR*I 的低频酶性质所致。现有研究多使用逆转座子 / M 引物组合,少数几例逆转座子 / E 的 SSAP 多位点成功扩增的报道也多使用附加 2 个^[10,12]或不附加选择性碱基的 *EcoR* 酶接头引物^[11,13],由此笔者推测,减少 *EcoR*I 选择性碱基个数可能有助于提高 SSAP 分析性能,但是从本研究其中一个逆转座子 (*rtk16*) / E + 3 组合和 Vershinin 等^[20]结果来看,筛选不同选择性碱基组成和排序的 E + 3 引物也有可能提升逆转座子 / E 引物的性能,这些都有待进一步实验证实。研究结果为 SSAP 分子标记在植物逆转座子种质资源分析的应用过程中有目的和高效的选择内切酶引物提供参考。

参考文献:

- [1] Kumar A, Hirochika H. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology[J]. Trends Plant Sci, 2001, 6(3): 127 - 134.
- [2] Waugh R, McLean K, Flavell A J, et al Genetic distribution of Bare - 1 - like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence - specific amplification polymorphisms (S - SAP) [J]. Mol Gen Genet, 1997, 253(6): 687 - 694.
- [3] Pearce SR, Knox M R, Ellis TH N, et al Pea *Ty1 - copia* group retrotransposons: Transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum* [J]. Mol Gen Genet, 2000, 263(6): 898 - 907.

- [4] Sanz A M, Gonzalez S G, Syed N H, et al Genetic diversity analysis in *Vicia* species using retrotransposon - based SSAP markers[J]. Mol Genet Genomics, 2007, 278 (4): 433 - 441.
- [5] Gribbon B M, Pearce S R, Kalender R, et al Phylogeny and transpositional activity of *Ty1 - copia* group retrotransposons in cereal genomes[J]. Mol Gen Genet, 1999, 261 (6): 883 - 891.
- [6] Leigh F, Kalender R, Lea V, et al Comparison of the utility of barley retrotransposon: Families for genetic analysis by molecular marker techniques[J]. Mol Gen Genomics, 2003, 269 (4): 464 - 474.
- [7] Takagi K, Nagano H, Kishina Y, et al MITE - transposon display efficiently detects polymorphisms among the *oryza* AA - genome species[J]. Breed Sci, 2003, 53 (2): 125 - 132.
- [8] Queen R A, Gribbon B M, James C, et al Retrotransposon - based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat[J]. Mol Genet Genomics, 2004, 271 (1): 91 - 97.
- [9] Soleimani V D, Baum B R, Johnson D A. Genetic diversity among barley cultivars assessed by sequence - specific amplification polymorphism species[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110 (7): 1290 - 1300.
- [10] Berenyi M, Gichuki S T, Schmidt J, et al *Ty1 - copia* retrotransposon - based S - SAP (sequence - specific amplified polymorphism) for genetic analysis of sweetpotato[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105 (6 - 7): 862 - 869.
- [11] Tam S M, Mhiri C, Vogelaar A, et al Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon - based SSAP, AFLP and SSR[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110 (5): 819 - 831.
- [12] Bousios A, Saldana - Oyarzabal I, Valenzuela - Zapata A G, et al Isolation and characterization of *Ty1 - copia* retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis[J]. Plant Sci, 2007, 172 (2): 291 - 298.
- [13] Petit M, Lin K, Julio E, et al Differential impact of retrotransposon populations on the genome of allotetraploid tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Mol Genet Genomic, 2007, 278 (1): 1 - 15.
- [14] Huo H, Conner J A, Ozias - Akins P. Genetic mapping of the apospory - specific genomic region in *Pennisetum squamulatum* using retrotransposon - based molecular markers[J]. Theor Appl Genet, 2009, 119 (2): 199 - 212.
- [15] Du X Y, Zhan Q L, Luo Z R. Development of retrotransposon primers and their utilization for germplasm identification in *Diospyros* spp. (Ebenaceae) [J]. Tree Genetics Genomes, 2009, 5 (1): 235 - 245.
- [16] Du X Y, Zhang Q L, Luo Z R. Comparison of four molecular markers for the analysis of genetic relationships in *Diospyros* L. (Ebenaceae) [J]. Plant Systematic and Evolution, 2009, 281 (1/4): 171 - 181.
- [17] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bul, 1987, 19 (1), 11 - 15.
- [18] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23 (21): 4407 - 4414.
- [19] Rohlf F J. NTSYS - pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. 2 ed New York, USA, 2000.
- [20] Vershinin A V, Allnutt T R, Knox M R, et al Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition in *Pisum* diversity evolution and domestication[J]. Mol Biol Evol, 2003, 20 (12): 2067 - 2075.