

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 03. 036

毛叶山桐子性别相关 ISSR 分子标记的筛选与分析

董娜, 唐晓珊, 唐琳

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 为筛选与毛叶山桐子性别相关的分子标记, 本研究优化了毛叶山桐子 ISSR-PCR 反应体系, 并利用优化后的体系逐一筛选 100 条 ISSR 引物, 然后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行多态性检测. 实验确立出最佳的 25 μL 反应体系为: 55 ng DNA 模板, 1 U Taq 酶, 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 2 μL 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 2.5 μL 10 \times Taq Buffer (含 Mg^{2+}), 超纯水补足总 25 μL . 利用该体系逐一筛选 ISSR 引物, 在多次重复后只有 UBC841 引物扩增出的差异性条带可以稳定存在. PAGE 电泳结果显示, UBC841 扩增产生一条差异性条带, 大小在 250~300bp 之间, 存在于毛叶山桐子雌株中, 但后期的测序发现该条带可能是由大小相近的条带组成的混合条带. 虽然如此, 引物 UBC841 仍可以作为毛叶山桐子性别相关的分子标记.

关键词: 毛叶山桐子; 性别鉴定; 雌雄异株; ISSR-PCR

中图分类号: Q945.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)02-0465-06

Screening and analysis of sex-related ISSR molecular marker in *Idesia polycarpa* Maxim. var. *vestita* Diels

DONG Na, TANG Xiao-Shan, TANG Lin

(Key Laboratory of Education Department Featuring Biological Resources and Environment,
Located in Life and Science Faculty in Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to screen the sex-related ISSR molecular marker in *Idesia polycarpa* Maxim. var. *vestita* Diels, the inter-simple sequence repeat-polymerase chain reaction (ISSR-PCR) system was established and optimized. And we found the best ISSR-PCR reaction system with total volume of 25 μL was 55 ng DNA template, 1U Taq polymerase, 2 μL dNTPs tendency (2.5 mmol/L), 2 μL primers (10 $\mu\text{mol/L}$), 2.5 μL 10 \times Taq Buffer (including magnesium ion) and then adding ultrapure water to make up total 25 μL . With this system we discovered only one ISSR primer-UBC841, which could amplify one stable female-special fragment with size in the range of 250~300bp. By sequencing the size of female-special fragment, we found it was a mixed bands which were consist of many similar sizes. Even so, the primer UBC841 still can be used for sex-related markers to identify the gender of *Idesia polycarpa* Maxim. var. *vestita* Diels.

Key words: *Idesia polycarpa* Maxim. var. *vestita* Diels; sex identification; dioecism; ISSR-PCR

收稿日期: 2015-05-12

基金项目: 四川省科技计划项目(2011 HH 0006); 四川省支撑课题(2011 JZ 0002)

作者简介: 董娜(1989-), 女, 山东滕州人, 硕士研究生, 主要研究方向为资源植物学. E-mail: dongna2605@163.com

通讯作者: 唐琳. E-mail: tangl66@sina.com

1 引言

毛叶山桐子 (*Idesia polycarpa* Maxim. var. *vestita* Diels) 又名水冬瓜, 为大风子科 (*Flacourtiaceae*) 山桐子属 (*Idesia* Maxim.) 落叶乔木, 是山桐子 (*Idesia polycarpa*) 的变种之一, 主要特征是叶背具疏短绒毛, 主要分布于我国秦岭淮河以南、江西、浙江、安徽、四川等省市^[1]。毛叶山桐子结实多, 果实含油量为 33.7%~42.3%, 其中亚油酸含量占 70% 左右, 另外毛叶山桐子油无毒, 经精炼后是优良的食用油, 长期食用对心血管有明显的保健作用^[2]。毛叶山桐子为雌雄异株植物, 偶见两性花, 花序为下垂圆锥花序, 长 12~30 cm; 花呈黄绿色, 雌雄花均为无瓣花, 雄花雄蕊多数丝状, 雌花子房球形, 雌雄花中可见退化的异性器官的痕迹。毛叶山桐子一般于 3 月下旬开始抽花序, 花期 4~5 月, 果期 9~10 月^[3]。目前对于毛叶山桐子或山桐子的研究主要涉及其生物学、生态学特性的研究、油脂综合利用的研究以及繁殖和栽培的研究, 鲜有关于毛叶山桐子分子生物学及其性别分化方面的报道。对植物的性别进行早期鉴定, 能够帮助人们在栽培时合理地分配雌雄株的比例, 因此开发毛叶山桐子性别相关的分子标记, 对育种也具有重要意义。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记是 Zietkeiwicz 等人于 1994 年发展起来的一种基于基因组微卫星的分子标记^[4]。具体原理是, 在微卫星序列的一端加 1~4 个锚定碱基, 然后以此为引物, 对两侧反向排列、间隔不太大的重复序列之间的一段 DNA 序列进行扩增, 最后根据谱带来分析不同样品间的多态性。ISSR 分子标记技术利用了微卫星序列普遍存在于真核生物基因组这一特点, 不需要预先知道物种基因组的序列, 扩增出来的条带多态性比较高, 与其他分子标记相比, 成本低、操作简便, 故而在雌雄异株植物性别鉴定方面已得到广泛应用^[5-7]。因此本研究从 DNA 水平入手, 旨在建立适合毛叶山桐子的 ISSR-PCR 反应体系, 初步筛选与毛叶山桐子性别相关的 ISSR 分子标记, 以为毛叶山桐子的性别鉴定提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料

供试毛叶山桐子嫩叶采集于四川省广元市朝天区陈家乡严家湾银广村, 生长于该地区的毛叶山

桐子存在若干雌株, 但仅发现两棵雄株。实验以毛叶山桐子生殖枝嫩叶为材料, 随机采集 6 棵雌株 A9、A22、A23、A27、A28、A29 和仅有的 2 棵雄株 B1、B2 的嫩叶, 将叶片剪碎装入冻存管, 然后放入液氮, 之后将其转入 -80℃ 冰箱保存备用。

2.2 方法

2.2.1 毛叶山桐子 DNA 的提取 DNA 的提取步骤参照北京天根生化科技有限公司的植物基因组提取试剂盒。为避免实验材料的浪费, 本研究首先尝试用试剂盒提取 A22、A23、B1、B2 的基因组 DNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoVue 微量分光光度计检测所提 DNA 的质量和浓度。若质量达到实验标准, 则利用此方法提取全部样品的 DNA, 储藏于 -20℃ 冰箱备用。

2.2.2 毛叶山桐子 ISSR-PCR 反应体系的四因素四水平正交优化实验 实验所用引物是根据加拿大哥伦比亚大学所公布的 100 条 ISSR 引物序列合成。为确定 ISSR-PCR 反应体系中模板 DNA、dNTP、Mg²⁺、Taq DNA 聚合酶四个因素的最适反应浓度, 我们通过正交设计助手 II 3.1 软件, 设计四因素四水平正交实验, 具体的 16 个浓度组合见表 1。除此之外, 每个处理都需添加 2.5 μL 10 × Taq Buffer (不含 Mg²⁺), 并用超纯水补足总体积为 25 μL。另外, 本实验还设置了第 17 种浓度组合, 即不单独添加 Mg²⁺, 而是将 2.5 μL 北京艾德莱生物科技有限公司标配的 10 × Taq Buffer (含有 Mg²⁺, Mg²⁺ 浓度在 PCR 反应体系中实际为 1.5 mmol/L) 直接加入反应体系, 其余成分为 DNA 模板 55 ng, Taq 酶 1 U, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 引物 (10 μmol/L) 2 μL, 并用超纯水补足总体积至 25 μL。优化实验所用的引物为 UBC812。PCR 扩增程序为 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30 s, 退火 35 s (退火温度根据引物的不同而变化), 72℃ 延伸 1.5 min, 35 次循环; 72℃ 延伸 10 min。每个扩增反应重复 3 次。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 17 个反应体系的 PCR 扩增结果, 找出扩增效果最好的因素组合, 以便确定最佳的 ISSR-PCR 反应体系。

2.2.3 ISSR 引物的筛选 采用优化后的毛叶山桐子 ISSR-PCR 反应体系, 对 100 条 ISSR 通用引物进行筛选测试。根据 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测结果, 选取条带清晰, 能扩增出特异性条带的引物。并进行 3 次重复实验, 以确定结果的稳定性。

2.2.4 毛叶山桐子性别特异条带的回收及测序

利用 Poly-Gel DNA Extraction Kit 试剂盒,回收毛叶山桐子性别特异的条带,并将此回收产物作为模板,利用最优的 ISSR 扩增体系和对应的引物进行二次 PCR 扩增,之后用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小.切胶回收纯化该片段,转化感受态细胞,之后随机挑选 20 个阳性克隆,送至上海生工公司测序.

表 1 ISSR 反应体系正交实验设计组合

Table 1 orthogonal table for ISSR-PCR

编号 Numbers	Taq(U)	dNTPs (mmol/L)	Mg ²⁺ (mmol/L)	DNA (ng)
1	0.5	0.1	1.0	40
2	0.5	0.12	1.5	60
3	0.5	0.16	2.0	80
4	0.5	0.2	2.5	100
5	1.0	0.1	1.5	80
6	1.0	0.12	1.0	100
7	1.0	0.16	2.5	40
8	1.0	0.2	2.0	60
9	1.5	0.1	2.0	100
10	1.5	0.12	2.5	80
11	1.5	0.16	1.0	60
12	1.5	0.20	1.5	40
13	2.0	0.1	2.5	60
14	2.0	0.12	2.0	40
15	2.0	0.16	1.5	100
16	2.0	0.2	1.0	80

3 结果与分析

3.1 毛叶山桐子 DNA 提取结果

电泳结果显示(图 1),试剂盒提取得到的毛叶山桐子 DNA 条带均较亮,无拖尾现象,A22、B1、A23、B2 样品的 DNA 浓度分别为 55、59、55、60 ng/ μ L,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值分别为 1.820、1.756、1.711、1.802.可见试剂盒提取得到的 DNA 浓度均可达到 50~60 ng/ μ L,且纯度较高,可以用来提取本实验所有样品的 DNA.

3.2 毛叶山桐子 ISSR-PCR 最佳反应体系

通过实施了 17 个反应体系的 PCR 扩增实验,我们发现 Mg²⁺ 浓度对 PCR 扩增的结果影响比较大,因为镁离子浓度均最低水平(1.0 mmol/L)的第 6、11、16 泳道没有扩增出任何条带,同时泳道 1 中也只有一条条带清晰可见.除此之外,Taq DNA

聚合酶的浓度对扩增效果几乎没有影响,因为相同酶浓度的四个泳道,所扩增得到的条带数目及清晰程度相差比较大,说明是其他因素造成了这种差异.根据电泳结果,我们可以发现第 17 种反应体系(并没有单独加 Mg²⁺,而是直接采用含有 Mg²⁺ 的 10 \times Taq Buffer, Mg²⁺ 浓度在 PCR 反应体系中实际为 1.5 mmol/L),得到的条带相较于其它处理来说既完整又清晰,因此选定处理 17 的体系作为最佳反应体系(图 2).综上所述,总体积为 25 μ L 的毛叶山桐子 ISSR-PCR 最佳反应体系为:55 ng DNA 模板,1 U Taq 酶,2 μ L dNTPs(2.5 mmol/L),2 μ L 引物(10 μ mol/L),2.5 μ L 10 \times Taq Buffer(含 Mg²⁺),并用超纯水补足总体积至 25 μ L. PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 35 s(退火温度根据引物的不同而变化),72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,35 次循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

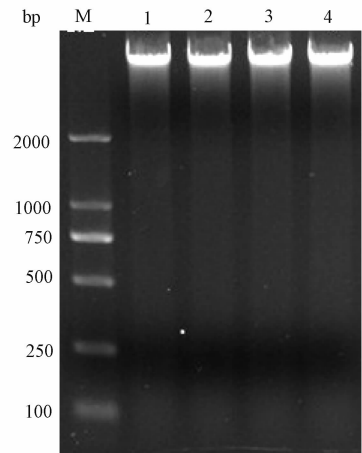


图 1 山桐子 DNA 提取结果

M. DL2000; 1, 2, 3, 4 泳道为样品 A22, B1, A23 和 B2 的 DNA

Fig. 1 DNA quality assayed by agarose gel electrophoresis

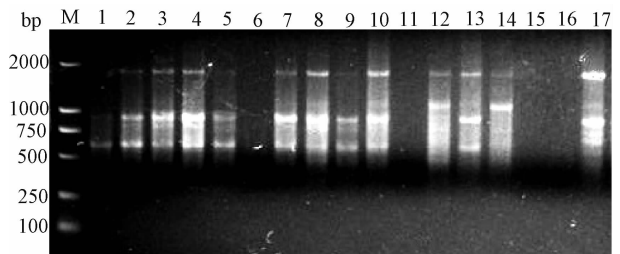


图 2 不同 ISSR-PCR 反应体系扩增结果

M. DL2000; 第 1-17 泳道分别代表第 1-17 反应体系

Fig. 2 PCR amplification results of different ISSR-PCR reaction systems

3.3 毛叶山桐子 ISSR 引物的筛选

以 6 棵雌株 A9、A22、A23、A27、A28、A29 和两棵雄株 B1、B2 的 DNA 为模板,用 3.2 中得到的最佳 ISSR-PCR 反应体系和反应程序,逐一筛选 100 条 ISSR 引物,实验共扩增出 675 条条带(每条引物扩增出的条带数目见表 2),其中能够扩增出

清晰条带的引物有 72 条,经过多次重复实验,发现只有引物 UBC841 扩增出的能够区别性别的特异性条带可以稳定存在(见图 3). 该引物扩增产生一条差异性条带,大小在 250~300 bp 之间,存在于毛叶山桐子雌株的基因组中,因此推测此条带有可能与毛叶山桐子性别差异相关.

表 2 100 条 ISSR 引物扩增条带数目

Table 2 Numbers of bands from 100 ISSR primers amplification

引物编号 Primer numbers	条带数目 Numbers of bands	引物编号 Primer numbers	条带数目 Numbers of bands	引物编号 Primer numbers	条带数目 Numbers of bands
UBC801	0	UBC802	0	UBC803	0
UBC804	0	UBC805	0	UBC806	0
UBC807	9	UBC808	8	UBC809	7
UBC810	7	UBC811	14	UBC812	4
UBC813	5	UBC814	6	UBC815	5
UBC816	9	UBC817	7	UBC818	6
UBC819	7	UBC820	8	UBC821	6
UBC822	6	UBC823	6	UBC824	4
UBC825	11	UBC826	9	UBC827	7
UBC828	6	UBC829	6	UBC830	1
UBC831	0	UBC832	0	UBC833	0
UBC834	10	UBC835	11	UBC836	16
UBC837	0	UBC838	0	UBC839	0
UBC840	14	UBC841	20	UBC842	22
UBC843	4	UBC844	8	UBC845	4
UBC846	9	UBC847	12	UBC848	12
UBC849	11	UBC850	14	UBC851	12
UBC852	0	UBC853	0	UBC854	0
UBC855	6	UBC856	7	UBC857	7
UBC858	11	UBC859	9	UBC860	9
UBC861	11	UBC862	11	UBC863	0
UBC864	10	UBC865	7	UBC866	7
UBC867	10	UBC868	11	UBC869	0
UBC870	6	UBC871	0	UBC872	6
UBC873	13	UBC874	0	UBC875	0
UBC876	15	UBC877	11	UBC878	0
UBC879	10	UBC880	10	UBC881	7
UBC882	0	UBC883	0	UBC884	7
UBC885	17	UBC886	12	UBC887	11
UBC888	11	UBC889	13	UBC890	9
UBC891	14	UBC892	2	UBC893	0
UBC894	0	UBC895	13	UBC896	0
UBC897	0	UBC898	0	UBC899	15
UBC900	14				

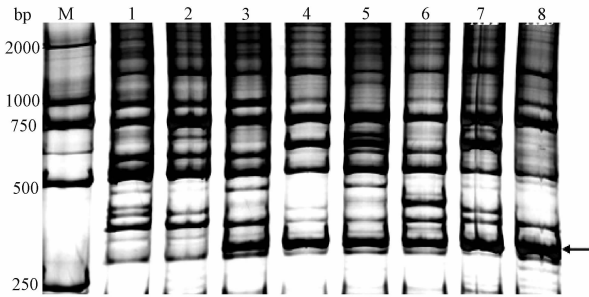


图 3 引物 UBC841 扩增结果

M. DL2000 Marker; 1, 2. 雄株 B1 和 B2 扩增结果; 3, 4, 5, 6, 7, 8. 雌株 A9、A22、A23、A27、A28 和 A29 扩增结果; 箭头表示所扩增出的雌株特异条带

Fig. 3 ISSR amplification results with primer UBC841

3.4 毛叶山桐子雌株特异条带的回收及测序

试剂盒回收得到的雌株特异的片段浓度为 $10\text{ng}/\mu\text{L}$, 二次 PCR 后, 得到的产物浓度为 $69\text{ ng}/\mu\text{L}$, 大小介于 $250\sim 300\text{ bp}$ 之间(图 4). 测序后共得到 10 条不同的序列, 推测 PAGE 电泳检测到的雌株特异的条带, 是由长度相近的条带组成的混合带.

4 讨论

毛叶山桐子为雌雄异株植物, 雌雄株种植比例直接决定了其结实率, 因此若能在幼苗期就能鉴别出其性别, 将会对农业生产产生重大意义. 但在生产实践中, 很难通过外部形态区分出毛叶山桐子幼苗的性别, 通常只有等到 $3\sim 5$ 年后的首次开花期, 才能加以区分, 这造成了生产上的极大不便, 因此有必要通过其他手段对毛叶山桐子进行早期性别鉴定. 目前鉴定植物性别的方法有很多种, 主要有外部形态差异鉴定, 化学物质差异鉴定^[8,9], 同工酶差异鉴定^[10], 核酸差异鉴定等. 其中核酸水平的差异鉴定被认为是最准确可靠的方法, 而这种鉴定方法中分子标记的开发又是一种高效且稳定的手段. 到目前为止 RAPD 分子标记^[11,12]、STS 分子标记^[13]、SRAP 分子标记^[14]、AFLP 分子标记^[15]、SSR^[16] 和 ISSR 分子标记^[5-7] 均有报道用来鉴定植物的性别. 另外一方面, 由于毛叶山桐子基因组的信息相当匮乏, 而 ISSR 引物不需要预先知道样品基因组的信息, 这一特点符合本实验的需求, 而且微卫星序列在植物中分布广泛, 利用 ISSR 技术扩增出来的条带多态性丰富, 更加有利于筛选特异性条带.

在进行山桐子 ISSR-PCR 反应体系优化时, 我们发现 Mg^{2+} 浓度对 PCR 的扩增结果影响很大, 推测可能是因为它可以通过影响聚合酶的活性

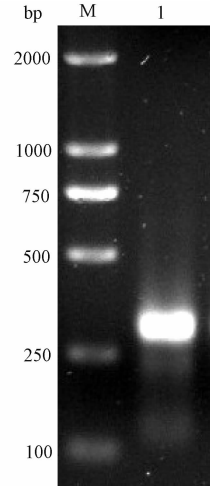


图 4 雌株特异片段扩增电泳检测结果

M. DL2000; 1. 雌株特异的片段

Fig. 4 PCR amplification of female-specific fragment

而影响 PCR 扩增效果. 大多数的 ISSR-PCR 反应体系优化实验都特别提到了 Mg^{2+} 浓度的重要性, 例如贾文杰等^[17] 对白木香, 金则新等^[18] 对腊梅 ISSR-PCR 反应体系优化时均发现 Mg^{2+} 对实验结果的重要影响. 在他们的实验中也提到 DNA 模板浓度和 Taq 酶的影响, 但是在本实验中这两者对 PCR 扩增结果的影响不大, 这有可能是本实验选取的这两个因素的浓度都在比较安全的范围, 不会对扩增结果造成重大的影响, 这与罗海燕等^[19] 总结出的, 一定范围内的模板浓度对 PCR 扩增效果影响不大这一结论相一致. 本研究筛选出引物 UBC841((GA)₈YC)可以在有限的材料中鉴别毛叶山桐子的性别, 并回收了雌株特异性条带, 不过在对此条带测序时, 发现它包含了许多大小相同或者接近的条带, 这可能是因为 UBC841 为简并引物, 电泳时条带不易分开的缘故. 虽然如此, 当精度要求不太高时, UBC841 仍可以作为毛叶山桐子性别相关的分子标记.

本实验最终获得了鉴别毛叶山桐子性别的分子标记, 但由于作为实验材料的雄株只有两棵且来自同一地域, 因此还需要寻找到更多的雌雄株进行实验结果的适用性验证. 另外对某些植物而言, 单一的分子标记有时不能实现鉴别植物性别的目的, 两种或多种分子标记方法相结合或许可以更容易实现对不同性别的鉴定, 因此今后我们可以尝试运用多种分子标记手段相结合的方式, 筛选精度更高的与毛叶山桐子性别相关的分子标记.

参考文献:

- [1] 刘根林,梁珍海,蒋泽平. 山桐子研究综述[J]. 江苏林业科技,2005,32(5):46.
- [2] 王金锡,吴宗兴. 山桐子开发与利用研究[J]. 四川林业科技,2010,31(1):26.
- [3] 岁立云. 山桐子果实性状自然变异及生殖生物学研究[D]. 陕西:西北农林科技大学,2009.
- [4] Zietkiewicz E,Rafalski A,Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics,1994,20:176.
- [5] Nanda S,Kar B,Nayak S, et al. Development of an ISSR based STS marker for sex identification in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) [J]. Scientia Horticulturae,2013,150 (1):11.
- [6] SarMah P, Sarma R N. Identification of a DNA marker linked to sex determination in *Calamus tenuis* Roxb., an economically important rattan species in northeast India [J]. Mol Breeding, 2011, 27 (1): 115.
- [7] Jakse J,Stajner N,Kozjak P, et al. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.) [J]. Mol Breeding, 2008, 21 (2):139-148.
- [8] 李国梁,林伯年,沈德绪. 酚类物质在鉴别园艺雌雄株植物中的应用 [J]. 园艺学报,1993,20 (4):397.
- [9] 熊宇婷,徐敏,顾蔚. 华中五味子雌雄株花期叶片中内源激素的比较 [J]. 植物生理学报,2012,48 (2):156.
- [10] 李国平,杨鹭生. 黄连木雌雄株叶水溶性酚类物质和两种氧化酶活性的比较 [J]. 基因组学与应用生物学,2012,31 (4):385.
- [11] Prakash S,Staden J V. Sex identification in *Encephalartos natalensis* (Dyer and Verdoorn) using RAPD markers [J]. Euphytica,2006,152 (2):197.
- [12] Agrawal V,Sharma K,Gupta S, et al. Identification of sex in *Simmondsia chinensis* (Jjoba) using RAPD markers [J]. Plant Biotechnology reprot, 20071 (4):207.
- [13] 周劲松,汤泳萍,罗绍春,等. DNA 分子标记早期快速鉴别芦笋雌雄株 [J]. 分子植物育种,2007,5 (3):363.
- [14] 吴文珊,朱晓东,陈友铃. 与薜荔性别相关的 SRAP 分子标记 [J]. 应用与环境生物学报,2008,14 (5):688.
- [15] 钟容,丁显平,李创,等. 金佛山特有杜鹃花遗传多样性分析 [J]. 四川大学学报:自然科学版,2015,52(2):388.
- [16] Parasnis A S,Ramakrishna W,Chowdari K V, et al. Microsatellite (GATA) n reveals sex-specific differences in Papaya [J]. Theoretical and Applied Genetics,1999,99 (6):1047.
- [17] 贾文杰,李恩香,杨柏云,等. 白木香基因组 DNA 的提取及 ISSR 反应条件的优化 [J]. 安徽农业科学,2008,36(24):10365.
- [18] 金则新,李钧敏. 濒危植物夏蜡梅 ISSR 扩增条件的优化 [J]. 植物研究,2007,27(1):68.
- [19] 罗海燕,陈业渊. ISSR 分子标记及其应用 [J]. 安徽农学通报,2008,14(19):45.