

葎草雄性连锁的 ISSR 标记克隆 及 SCAR 标记的建立

高武军, 沙 涛, 姬艳克, 邓传良, 卢龙斗*

(河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 以雌雄异株植物葎草(*Humulus scandens* L.)为材料,通过优化扩增体系中的退火温度、 Mg^{2+} 浓度及模板浓度等主要影响因素,利用简单重复序列间扩增标记对其雌雄株性别的基因组差异进行研究。结果表明,62条ISSR引物中有40条引物能扩增出稳定的条带,共产生302条带。引物I64扩增出1条雄性连锁标记,经克隆测序,该片段长度为553 bp,AT含量为64.3%,根据测序结果设计特异引物,将该标记转化为稳定性更好的SCAR标记。

关键词: 葎草; ISSR; 雄性连锁; SCAR

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)03-0283-05

Clone and Development of ISSR and SCAR Markers Linked to Male *Humulus scandens* L.

GAO Wu-jun, SHA Tao, JI Yan-ke, DENG Chuan-liang, LU Long-dou*

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The sex differences in *Humulus scandens* were studied by using inter-simple sequence repeat (ISSR) technique. 40 primers from total 62 primers could produce stable bands, and amplified 302 bands. A male-linked fragment with about 553 bp was amplified by I64 primer which was abundant in AT (64.3%). Then the male-linked marker was converted into SCAR marker.

Key words: *Humulus scandens* L.; ISSR; Male-linked; SCAR

葎草(*Humulus scandens* L.)又名拉拉藤,为大麻亚科(Cannaboideae)葎草属植物,是我国广泛分布的1年生杂草。花单性,雌雄异株,其性别由基因平衡控制,雌株染色体组成是 $2n = 14 + XX$;雄株是 $2n = 14 + XY_1 Y_2$,其性染色体是最大的染色体^[1-2]。由于葎草染色体数目相对较少,性染色体较大,因此是研究雌雄异株植物的性别决定机制最有利的材料之一。

近十几年来,分子标记被成功应用在植物性别遗传研究中,尤其是基于PCR技术发展起来的分子标记技术,如RAPD^[3-4]、AFLP^[5]、SSRs^[6]和RFLP^[7]等。ISSR(inter-simple sequence repeat)是近年来发展起来的一类新型的分子标记技术^[8]。它

是以PCR技术为基础,利用真核生物基因组中广泛存在的简单重复序列来设计引物,对两个相距较近、方向相反的SSR序列之间的基因组片段进行扩增,比RFLP、RAPD、SSR等更多地揭示基因组中的多态性^[9]。因此,ISSR技术也被用来进行雌雄株基因组差异的分析^[10]。Danilova利用22个ISSR引物对雌雄异株植物啤酒花(*Humulus lupulus*)的雌雄基因组差异进行研究,获得1个雄性植物连锁的标记,并将其转换为雄性特异的序列标签,用来检测不同来源啤酒花幼苗的性别^[11]。

性别连锁标记的序列及定位分析有助于揭示性别决定及性染色体进化的理论机制。Stehlik等报道叶蓼(*Rumex nivialis*)1个长度为164 bp的雄性

特异性 AFLP 标记是位于 Y 染色体的串联重复序列^[12]。而重复序列在性染色体上的累积被认为是性染色体进化的重要环节。因此,利用分子标记快速获得雌雄性别基因组差异及性别连锁的分子标记,可以为植物性别形成提供重要的理论依据。本研究首次利用 ISSR 技术对与葎草性别相连锁的特异性片段进行了克隆和分析,为其性别决定、性别分化以及性染色体进化机制的研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

葎草(*Humulus scandens* L.)取自河南师范大学生物园地,待葎草开花后,取雌性、雄性各 10 株葎草的幼嫩叶片提取单株 DNA,同时将雄性、雌性各 10 株的叶片等量混合后提 DNA,分别组成雌、雄 DNA 池。

1.2 基因组 DNA 提取

葎草基因组 DNA 提取参照 CTAB 法^[13]进行。

1.3 ISSR 标记扩增反应

用 ISSR 引物(表 1)分别对葎草雌、雄基因组 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系为 10 × 扩增缓冲液 2.5 μL; MgCl₂ (25 mmol/L) 0.5 μL; dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL; 引物 (25 μmol/L) 0.5 μL, 模板 DNA (1.25 ~ 20 ng μL⁻¹) 1 μL; *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U μL⁻¹) 0.3 μL; 加入 ddH₂O 补齐到 25 μL。PCR 反应程序为预变性 95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 2 min, 38 个循环; 72℃ 延伸 8 min。反应结束后 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 5 V cm⁻¹ 的电压下电泳 3 h 左右,紫外透射反射仪中观察,拍照分析。

将扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后,于紫外灯下切取含有目的片段的凝胶,参考所用 UNIQ-10 DNA 凝胶回收试剂盒的说明书回收目的片段,回收产物用电泳方法估计浓度。

感受态细胞的制备、转化、阳性克隆的筛选鉴定参照 Sambrook 等^[14]方法,样品送上海生工生物

表 1 ISSR 引物序列

Table 1 Sequence of ISSR primers

引物 Primers	序列(5'~3') Sequence	引物 Primers	序列(5'~3') Sequence	引物 Primers	序列(5'~3') Sequence
11	(AC) ₈ T	127	(TG) ₈ CG	154	(TG) ₈ GT
12	(AC) ₈ AT	128	(TG) ₈ CC	155	(TG) ₈ GG
13	(AC) ₈ TT	129	(TG) ₈ CT	156	(AG) ₈ TT
15	(AC) ₈ TG	130	(TG) ₈ TC	157	(AG) ₈ TG
17	(TG) ₈ TA	131	(TG) ₈ TT	158	(AG) ₈ GA
18	(ATG) ₆	133	(AG) ₈ AT	159	(AG) ₈ GC
19	(CTC) ₆	134	(AG) ₈ AA	160	(AG) ₈ GG
110	(GAA) ₆	135	(AG) ₈ TA	161	(AG) ₈ GT
111	(GAT) ₆	136	(AG) ₈ TC	162	(AG) ₈ CA
112	(GAG) ₆	137	(AT) ₈ TA	163	(AG) ₈ CT
113	(GGT) ₆	138	(AT) ₈ TC	164	(AG) ₈ CG
114	(TCT) ₆	139	(ACG) ₆	165	(AG) ₈ CC
116	(TGT) ₆	140	(ACC) ₆	166	(TC) ₇ CG
117	(GACA) ₄	143	(AC) ₈ CT	167	(TC) ₇ CC
121	(ACC) ₃	144	(AC) ₈ GA	168	(TC) ₇ AG
122	(AC) ₈ AA	146	(AC) ₈ GG	169	(TC) ₇ TG
123	(AC) ₈ TA	147	(AC) ₈ GT	170	(TC) ₇ GA
124	(AC) ₈ TC	148	(TG) ₈ AA	171	(TC) ₇ GG
125	(AC) ₈ CA	149	(TG) ₈ AC	172	(AGAT) ₄
126	(AC) ₈ CC	151	(TG) ₈ AT	173	(ACAT) ₄
153	(TG) ₈ GC	152	(TG) ₈ GA		

有限公司进行测序。

1.4 SCAR 标记的引物设计及扩增

根据测序结果, 分别合成两对 24 个碱基的 SCAR (sequence characterized amplified region) 引物(表 2)。

随机取雌雄葎草各 10 株, 以其基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为 ddH₂O 17 μL, 10 × 扩增缓冲液 2.5 μL, dNTPs (10 mmol/L)

0.5 μL, 引物 F (25 μmol/L) 0.5 μL, 引物 R (25 μmol/L) 0.5 μL, 模板 DNA (25 ng μL⁻¹) 1.0 μL, Taq DNA 聚合酶(2.5 U μL⁻¹) 0.3 μL。混匀并稍加离心后, 按预变性 94℃, 5 min; 94℃, 30 s; 60℃, 45 s; 72℃, 90 s; 45 个循环; 延伸 72℃, 7 min 的程序进行 PCR 扩增。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

表 2 雄性连锁的葎草 SCAR 标记的引物

Table 2 Primer of SCAR marker linked to male plant in <i>Humulus scandens</i>			
ISSR 引物	SCAR 引物	序列 Sequence	退火温度
ISSR primer	SCAR primer	(5'~3')	Annealing
I64	SEX I64F	AGAGAGAGAGAGAGCGGAAAAG	60℃
	SEX I64R	AGAGAGAGAGAGAGCGGAAATG	

2 结果和分析

2.1 ISSR 引物的筛选

根据优化的 PCR 扩增体系, 对 ISSR 引物进行了初筛(图 1)和复筛(图 2), 选择能够在雌雄株间扩增出清晰差异条带的引物进行雌雄单株扩增。结果表明, 本实验所选用的 62 个 ISSR 引物中, 22 个引物没有扩增出任何条带, 其余 40 个引物均扩增

出了稳定的条带, 最多扩增出 9 条带, 最少的 3 条带, 共扩增出 302 条带, 每个引物平均扩增 7.55 条带。

2.2 ISSR 雄性相关片段的克隆与测序

用复筛后的引物进行扩增, 结果引物 I64 (AGAGAGAGAGAGAGCG) 扩增出 1 条雄性连锁的条带(图 3)。将该特异片段回收、克隆进 pUCm-T

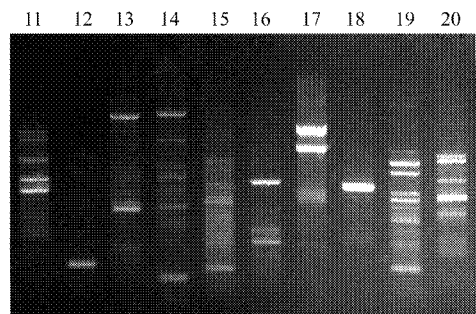
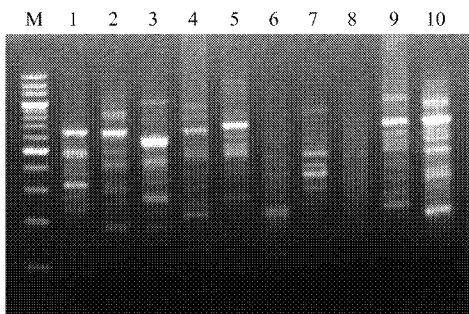


图 1 部分 ISSR 引物的初筛

Fig. 1 The primary screen of ISSR primer

M: 分子量标记 Molecular marker (D514A, TaKaRa); 1~20: 不同的引物 Different primers.

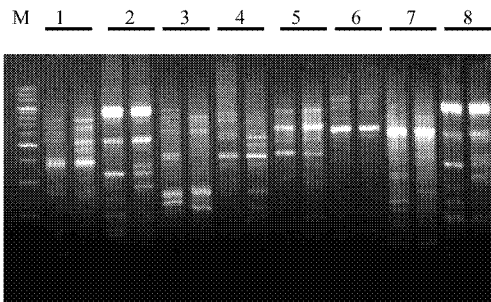


图 2 部分 ISSR 引物的复筛

Fig. 2 The second screen of ISSR primer

M: 分子量标记 Molecular marker (D514A, TaKaRa);

1~8: 不同的引物 Different primers.

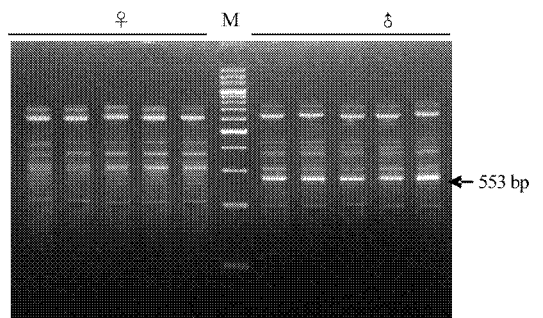


图 3 引物 I64 扩增的雄性特异性片段(箭头)

Fig. 3 Male-specific DNA fragments (arrow) by I64 primer

M: 分子量标记 Molecular marker (D514A, TaKaRa).

色体上过度累积,进而导致了 X 染色体之间的重组,促进性染色体的起源。因此,进一步的基因组杂交及 FISH 技术可以更好地分析所获得标记的详细信息及染色体定位,为性染色体的进化及性别差异的分子机制研究提供参考。

参考文献

- [1] Park J S. Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants [J]. *Chrom Today*, 1990, 10: 104-111.
- [2] 王连军, 邓传良, 卢龙斗, 等. 葎草的核型和性染色体研究 [J]. *河南农业科学*, 2007(10): 61-63.
- [3] Sakamoto K, Shimomura K, Komeda Y, et al. A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 1549-1554.
- [4] Gao W J, Li R L, Li S F, et al. Identification of two markers linked to the sex locus in dioecious *Asparagus officinalis* plants [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2007, 54(6): 816-821.
- [5] Peil A, Flachowsky H, Schumann E, et al. Sex-linked AFLP markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 102-109.
- [6] Sachiko O, Takefumi S, Masaki F. The Y chromosome in the liverwort *Marchantia polymorpha* has accumulated unique repeat sequences harboring a male-specific gene [J]. *PNAS*, 2001, 98(16): 9454-9459.
- [7] Biffi R, Restivo F M, Tassi F, et al. A restriction fragment length polymorphism probe for early diagnosis of gender in *Asparagus officinalis* L. [J]. *HortSci*, 1995, 30: 1463-1464.
- [8] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [9] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 95: 408-417.
- [10] Gangopadhyay G, Roy S K, Ghose K, et al. Sex detection of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD [J]. *Curr Sci*, 2007(4): 524-526.
- [11] Danilova T V, Karlov G I. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.) [J]. *Euphytica*, 2006, 151(1): 15-21.
- [12] Stehlik I, Blattner F R. Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex nivālis* (Polygonaceae) and implications for the evolution of sex chromosomes [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 238-242.
- [13] Xiao L H(肖理慧), Gao W J(高武军), Zhang X L(张小莉), et al. DNA extraction and establishment of AFLP marker reaction system of *Humulus scandens* [J]. *Mol Plant Breed(分子植物育种)*, 2008, 6(2): 393-398.(in Chinese)
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 55-59.
- [15] Charlesworth B. The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation [J]. *Curr Biol*, 1996, 6: 149-162.
- [16] Nagaoka T, Oghihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 93: 133-139.
- [17] Chowdhury M A, Vandenberg B, Warkentin T. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Euphytica*, 2002, 127: 317-325.
- [18] Wang Z, Weber J L, Zhong G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeats [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 1-6.
- [19] Li C, Zhang Y, Ying K, et al. Sequence variations of simple sequence repeats on chromosome-4 in two subspecies of the asian cultivated rice [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 392-400.
- [20] Vijayan K, Chatterjee S N. ISSR profiling of Indian cultivars of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs [J]. *Euphytica*, 2003, 131: 53-63.
- [21] Charlesworth B. The evolution of sex chromosomes [J]. *Science*, 1991, 251: 1030-1033.
- [22] Shibata F, Hizume M, Kuroki Y. Chromosome painting of Y chromosome and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequences in the dioecious plant *Rumex acetosa* [J]. *Chromosoma*, 1999, 108: 266-270.
- [23] Fukashi S, Masahiro H, Yuzo K. Differentiation and the polymorphic nature of the Y chromosomes revealed by repetitive sequences in the dioecious plant, *Rumex acetosa* [J]. *Chrom Res*, 2000, 8: 229-236.
- [24] Liu Z Y, Moore P H, Ma H, et al. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution [J]. *Nature*, 2004, 427: 348-352.