

# S-SAP 分子标记开发及其在苹果芽变鉴别上的应用

何平<sup>1</sup>, 李林光<sup>1</sup>, 李慧峰<sup>1</sup>, 王海波<sup>1</sup>, 杨建明<sup>1</sup>, 王玉霞<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>山东省果树研究所, 泰安 271000; <sup>2</sup>沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866)

**摘要:** S-SAP(特异序列扩增多态性, Ssequence specific amplification polymorphism)是一种基于反转录转座元件的广泛应用于生物遗传多样性研究的分子标记。本研究从 34 对引物中筛选出 7 对具有谱带清晰、多态性高的引物组合,成功地开发了苹果基因组的 S-SAP 分子标记。27 个元帅系芽变品种中,共扩增出 588 条谱带,每对引物组合平均扩增出 84 条谱带,其中多态性谱带 48 条,多态性谱带占总扩增出谱带数的 8.2%,遗传相似系数介于 0.73~0.90 之间。对 15 个苹果芽变品种进行 S-SAP 分析,相似系数在 0.42~0.94 之间,以相似系数 0.80 为阈值,可以区分各芽变品系。开发的 S-SAP 分子标记可以有效地将苹果芽变品种区分,并为苹果生物遗传多样性与系统进化、品种鉴定提供新方法。

**关键词:** 苹果; S-SAP; 芽变

## Development and Application of S-SAP Molecular Marker for Identification of Apple Sports

HE Ping<sup>1</sup>, LI Lin-guang<sup>1</sup>, LI Hui-feng<sup>1</sup>, WANG Hai-bo<sup>1</sup>, YANG Jian-ming<sup>1</sup>, WANG Yu-xia<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Shandong Institute of Pomology, Taian 271000; <sup>2</sup>Colleges of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

**Abstract:** At the present time, the most popular retrotransposon-based molecular marker system is the sequence specific amplification polymorphism (S-SAP), which is widely used for phylogenetic analysis. In this study, a new S-SAP marker system based on Ty1-copia retrotransposon in apple genome were successfully developed. Among 34 primer combinations used to develop the S-SAP marker system, seven of which produced high-quality and reliable banding patterns. A total of 84 polymorphic bands from 588 amplified bands were detected in 27 delicious sport cultivars, with a polymorphic ratio of 8.2% and genetic coefficient ranged from 0.73 to 0.90. Phylogenetic analysis showed that the coefficient ranged from 0.42 to 0.94 for 15 apple sport cultivars, and the variety lines could be distinguished based on genetic coefficient 0.80. The available evidences proved S-SAP marker had high level of polymorphism in apple accessions and could be efficiently applied to genetic diversity, systematic evolution, and variety identification researches.

**Key words:** Apple; S-SAP; sport

苹果是世界上广泛栽培的果树,年产量约 6000 万 t。我国是苹果生产大国,2010 年我国苹果年产量达 2900 万 t,占世界苹果总产量的 48.33%。芽变选种是苹果育种的重要途径,世界苹果产量的大部分来自芽变品种,如富士、元帅、嘎拉等广泛栽培的苹果品种,目前生产上栽植的几乎全部是芽变品

种。截至 2010 年,国内报道选出的苹果芽变系品种有近 100 个,其中在近 10 余年间报道的就有约 30 个,芽变系品种已在生产上发挥了很大的作用。苹果品种中有着丰富的芽变类型,如富士的着色系、早熟系、短枝系,元帅的浓红型芽变等。尽管果树芽变选种已经有悠久的历史,但是对于果树芽变的分子机

收稿日期:2012-04-27 修回日期:2012-05-24 网络出版日期:2013-02-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130219.1432.001.html>

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-28);山东省农业良种工程(鲁科发 2009-103)

作者简介:何平,博士,主要从事果树育种和分子生物学研究。E-mail:heping024@163.com

通信作者:李林光,博士,研究员,主要从事果树育种研究。E-mail:llg6536@163.com

理目前尚知之甚少,所以至今果树芽变选种工作仍然主要是采用从生产园中寻找变异类型的方法。

反转录转座子具有分布普遍、多拷贝、高度异质、插入位点多态的特性,适合开发分子标记,目前应用较多的是由 R. Waugh 等<sup>[1]</sup>根据 AFLP 而改进的 S-SAP (Sequence specific amplification polymorphisms) 分子标记。该技术已在大麦<sup>[1]</sup>、豌豆<sup>[2]</sup>、玉米<sup>[3]</sup>、小麦<sup>[4]</sup>、葡萄<sup>[5]</sup>、黄槿<sup>[6]</sup>、甘薯<sup>[7]</sup>等多种植物上应用于基因作图、生物遗传多样性与系统进化、品种鉴定等方面。本研究在建立苹果 S-SAP 分子标记的基础上,探讨其在苹果品种间遗传分析、芽变品种鉴别等领域的应用,旨在为苹果芽变的鉴定提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试材料为 37 份苹果芽变系品种(表 1),来自中国农业科学院果树研究所国家果树种质苹果圃(兴城,CAAS) 27 份、山东省苹果产区(SD) 3 份、自选芽变品种(ZC) 2 份和辽宁省果树研究所(LNAS) 5 份。

表 1 本研究所用试材

Table 1 List of 37 apple cultivars used in this study

品系 Variety line	来源 Origin			
	CAAS	SD	ZC	LNAS
嘎拉系 Gala line		烟嘎 1#、泰山 皇家嘎拉、嘎拉 普通嘎拉		
富士系 Fuji line			沂水 官藤富士、 富士 富优 3、 秋富 2、 长富 2、 普通富士	
元帅系 Delicious line	青岛 1#、红星、新元 帅、边墙子 2#、烟红、 南山 2#、矮壮、大尧短 枝、132、平阴短枝、泗 水短枝、红冠、康城短 枝、北京 0201、矮壮、 新红星、福山 4#、新金 矮红星、边墙子 1#、十 三陵短枝、爱威尔短 枝、张家口短枝、南山 4#、福山 1#			

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用改进 CTAB 法提取叶片总 DNA,参考 He

等<sup>[8]</sup>的方法。

### 1.3 S-SAP 分析

反转录转座元件引物来自 G. L Zhao 等<sup>[9]</sup>分离的 CTerm1 (GenBank 登录号:FJ705357)、CTerm2 (GenBank 登录号:FJ705356),引物序列见表 2。S-SAP 流程中的基因组双酶切反应、连接反应、预扩增反应和选择性扩增反应的配比和程序,以及接头和接头引物序列均参考 P. He 等<sup>[10]</sup>方法。与 AFLP 操作的不同之处在于 S-SAP 选择性扩增由末端带有 3 个选择性碱基的 *MseI* 或 *EcoRI* 接头引物和反转录转座元件引物组合完成。PCR 终产物由 6% 聚丙烯酰胺变性胶电泳分离,银染显色。限制性内切酶为 NEB 公司,PCR 试剂均为 TaKaRa 产品。

表 2 S-SAP 反应中引物及接头序列

Table 2 Primer sequences and adapter primer sequences tested in S-SAP analysis

名称 Name	引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
Adapters	<i>EcoRI</i> top strand	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i> bottom strand	AATTGGTACGCAGTCTAC
Adapters	<i>MseI</i> top strand	GACGATGAGTCTGAG
<i>MseI</i>	<i>MseI</i> bottom strand	TACTCAGGACTCAT
Primers	LTR1	ACGAGGAGGGAATTCTAACAA
LTR	LTR2	ATGGGCATTTAATTTCCAGCAG
Primers	E00	GACTGCGTACCAATTC
<i>EcoRI</i>	E17	GACTGCGTACCAATTCGG
	E22	GACTGCGTACCAATTCGT
	E32	GACTGCGTACCAATTCAAC
	E33	GACTGCGTACCAATTCAAG
	E36	GACTGCGTACCAATTCACC
	E37	GACTGCGTACCAATTCAGC
	E38	GACTGCGTACCAATTCACT
	E40	GACTGCGTACCAATTCAGC
	E41	GACTGCGTACCAATTCAGC
Primers	M00	GATGAGTCTGAGTAA
<i>MseI</i>	M13	GATGAGTCTGAGTAAAG
	M18	GATGAGTCTGAGTAACT
	M40	GATGAGTCTGAGTAAAGC
	M45	GATGAGTCTGAGTAAATG
	M47	GATGAGTCTGAGTAAACAA
	M59	GATGAGTCTGAGTAACTA
	M70	GATGAGTCTGAGTAAATAC
	M78	GATGAGTCTGAGTAAAGTT

## 1.4 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、重复性强的条带。扩增产物按同一位点条带有或无分别赋值,有带记为 1,无带记为 0;利用 NT-SYS-pc version 2.1 软件<sup>[11]</sup> 计算 SIMQUAL 相似指数,UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)法聚类,并通过 Treeplot 程序生成聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 S-SAP 分子标记的建立

基于 AFLP 的 S-SAP 分子标记,是将高质量的基因组 DNA 进行酶切,然后加上接头,再经过预扩增和选择性扩增的一种分子标记技术。经过酶切加接头后的预扩增结果最好是在 50 ~ 600 bp 之间产生均匀的弥散。本试验采用 *EcoRI* 和 *MseI* 两种限制性内切酶对元帅苹果基因组 DNA 进行酶切,酶切后加上双接头,后用 *EcoRI* 和 *MseI* 预扩增引物进行预扩增,检测结果如图 1 所示,在 100 ~ 800 bp 之间产生均匀的弥散,且亮度较高,说明预扩增比较理想,可以进行选择性扩增。

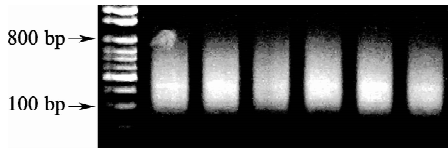


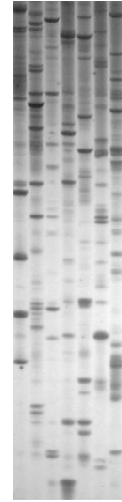
图 1 预扩增检测电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of pre-amplifying detection

在预扩增的基础上,将扩增的 PCR 产物稀释 10 倍与 LTR Primer 和 *EcoRI* 或 *MseI* 的选择性引物进行选择性扩增,再采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。结果表明:在 34 对引物中,含有 2 个选择性碱基的引物谱带太多,泳道呈弥散状,片段较集中,分布不均匀,而含有 3 个选择性碱基的引物多态性较高,谱带清晰,分布均匀。其中本试验选择了 LTR1 与 E33、E38、M59、M78 和 LTR2 与 E32、E41、M45 7 个引物组合作为后续的试验引物。7 个引物组合电泳检测如图 2 所示。

### 2.2 S-SAP 多态性分析

应用 7 对引物,对 27 个元帅系芽变品种进行 S-SAP 多态性分析,结果如表 3 所示,共扩增出 588 条谱带,每对引物组合平均扩增出 84 条谱带,其中多态性谱带 48 条,多态性谱带占总扩增出谱带数的 8.2%。每对引物组合均扩增出多态性谱带为 1 ~ 13 条不等,其中以 LTR2/E32 引物组合扩增的谱带



从左到右引物组合依次是 LTR2/E32、LTR1/E33、LTR1/E38、LTR2/E41、LTR2/M45、LTR1/M59、LTR1/M78

The primer combinations are LTR2/E32, LTR1/E33, LTR1/E38, LTR2/E41, LTR2/M45, LTR1/M59, and LTR1/M78 from left to right

图 2 引物筛选电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of primer selection

表 3 不同的引物对在元帅系芽变品种间的 S-SAP 多态性分析

Table 3 Polymorphic analysis based on S-SAP primer pair combinations among delicious sport cultivars

引物对 Primer pairs	扩增谱带数 No. of amplified bands	多态性谱带数 No. of polymorphic bands	多态性谱带率(%) Polymorphism band ratio
LTR1/E33	64	4	6.2
LTR1/E38	98	7	7.1
LTR1/M59	82	9	10.9
LTR1/M78	86	6	6.9
LTR2/E32	107	13	12.1
LTR2/E41	72	1	1.3
LTR2/M45	79	8	10.1
总体 Total	588	48	8.1

数最多(107),多态性谱带也最多(13)。图 3 为 LTR1/E33 引物组合在 15 个苹果芽变品种间 S-SAP 扩增电泳图谱。

### 2.3 S-SAP 相似系数及聚类分析

应用 NTSYS 软件对 15 个苹果芽变品种(包括 4 份嘎拉系、5 份元帅系和 6 份富士系)7 对引物组合的 S-SAP 扩增结果进行聚类分析,结果如图 4 所示,供试样品相似系数在 0.42 ~ 0.94 之间,以相似系数 0.80 为阈值,将 15 份不同苹果品系分为 3 类,嘎拉系、元帅系和富士系各为一类。

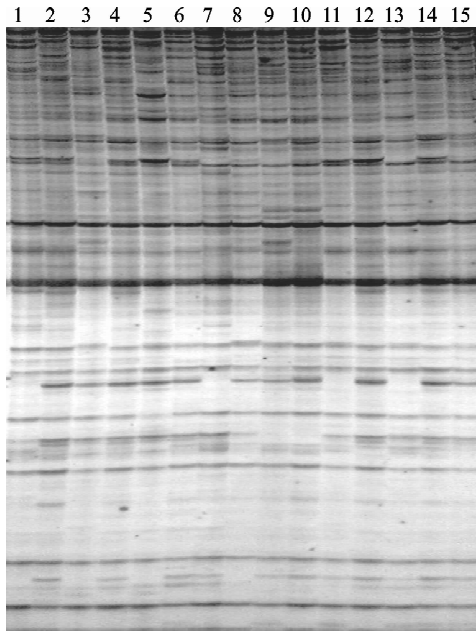


图3 15个苹果芽变品种 S-SAP 扩增电泳图谱 (LTR1/E33 引物组合)

Fig. 3 S-SAP electrophoretogram with LTR1/E33 primer combination in 15 apple sports varieties

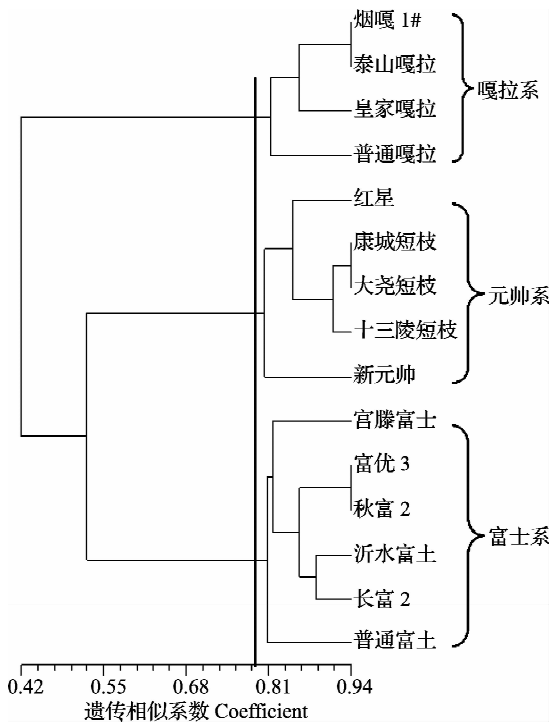


图4 15个苹果芽变品种 S-SAP 聚类图

Fig. 4 Cluster analysis of 15 apple sports used in experimentation by S-SAP

为了进一步检验 S-SAP 分子标记在同一品系间的应用,对 27 份元帅系芽变品种的聚类结果如图 5 所示,相似系数在 0.73~0.90 之间,供试 27 份试材除青岛 1#和烟红、阿兹威短枝和大尧短枝在相似系

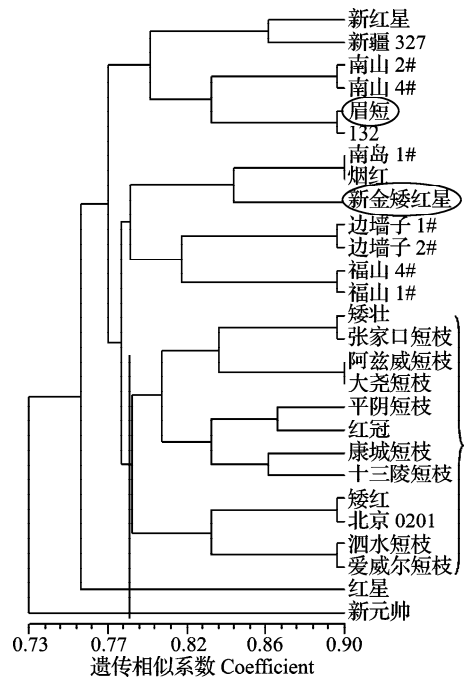


图5 27份元帅系芽变品种 S-SAP 聚类图

Fig. 5 Cluster analysis of 27 delicious sport cultivars used in experimentation by S-SAP

数 0.90 处没有区分外,其他均有很好区分。以相似系数 0.78 为阈值,短枝性状除眉短和新金矮红星外都聚成一组。

总的来看,开发的 S-SAP 分子标记可以有效地将苹果芽变品种区分,并为苹果生物遗传多样性与系统进化、品种鉴定提供新方法。

### 3 讨论

S-SAP 是一种基于反转录转座元件 LTR 序列的锚定的 AFLP 技术<sup>[1]</sup>,用以检测反转录转座元件插入位点与邻近限制性内切酶位点之间的 DNA 多态性。从技术上看,S-SAP 分子标记的多态性来源有 3 个:一是限制性内切酶位点其两侧序列的变异;二是 LTR 5'末端序列的差异;三是反转录转座元件插入位点的不同。而后 2 种变异都是由反转录转座元件产生的。T. H. Eills 等<sup>[2]</sup>、E. D. Nagy 等<sup>[12]</sup>、R. A. Queen 等<sup>[4]</sup>试验发现,在多数植物中 S-SAP 的多态性比 AFLP 高。本试验采用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *MseI* 对苹果基因组 DNA 进行双酶切,并选用该 2 种内切酶的选择性碱基进行选择性扩增,从 34 对引物中选出 7 对多态性较高的引物组合,可以有效地将供试的苹果芽变品种区分开来,并为苹果生物遗传多样性与系统进化、品种鉴定提供新方法。

A. Kumar 等<sup>[13]</sup>认为反转录转座元件分布的广

泛性及其高度的异质性表明其在早期植物界即已存在。H. Y. Sun 等<sup>[14]</sup>研究表明, Ty1-*copia* 类反转录转座元件不仅广泛分布于苹果基因组中, 而且具有丰富的多样性, 说明 Ty1-*copia* 类反转录转座元件在苹果中早已存在, 以后在长期转座的过程中不断地积累突变形成了现在这样高度异质的群体。已有研究表明, 反转录转座元件是引起体细胞无性系变异的重要因素之一<sup>[15-16]</sup>, 因此, 分离具有转座活性的反转录转座元件对研究体细胞无性系变异的分子机理以及利用其去创造符合要求的体细胞变异具有重要的理论意义和实际应用价值。由于苹果反转录转座元件的研究起步较晚, 目前尚未见有转座活性的反转录转座元件的报道。本研究基于 CTcrml 和 CTcrml2 LTR 序列开发的 S-SAP 分子标记, 对供试的 3 个苹果品系共 37 个品种能够很好区分, 并发现元帅系的短枝性状以高阈值聚为一类。因此, 可以推测反转录转座元件在苹果芽变发生过程中具有一定的作用。

#### 参考文献

- [1] 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: 687-694
- [2] Ellis T H, Poyser S J, Knox M R, et al. Polymorphism of insertion sites of Ty1-*copia* class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 260: 9-19
- [3] García-Martínez J, Martínez-Izquierdo J A. Study on the evolution of the grande retrotransposon in the Zea genus [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 831-841
- [4] Queen R A, Gribbon B M, James C. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat [J]. *Mol Gen Genet*, 2004, 271: 91-97
- [5] Labra M, Imazio S, Grassi F, et al. Vine-1 retrotransposon-based sequence-specific amplified polymorphism for *Vitis vinifera* L. genotyping [J]. *Plant Breeding*, 2004, 123: 180-185
- [6] Tang T, Huang H, Zhong Y. High-throughput S-SAP by fluorescent multiplex PCR and capillary electrophoresis in plant [J]. *J Biotechnol*, 2004, 114: 59-68
- [7] Berenyi M, Gichuki 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: 862-869
- [8] He P, Ma Y, Zhao G, et al. FaRE1: a transcriptionally active Ty1-*copia* retrotransposon in strawberry [J]. *J Plant Research*, 2010, 123: 707-71
- [9] Zhao G L, Dai H Y, Chang L L, et al. Isolation of two novel complete ty1-*copia* retrotransposons from apple and demonstration of use of derived S-SAP markers for distinguishing bud sports of *malus domestica* cv. Fuji [J]. *Tree Genet Genomes*, 2010, 6: 149-159
- [10] He P, Ma Y, Dai H, et al. Development of Ty1-*copia* retrotransposon-based S-SAP markers in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) [J]. *Sci Hort*, 2012, 137: 43-48
- [11] Rohlf F J. NTSYS-PC, Numerical taxonomy and multivariate analysis system Version 2. 10e [M]. New York: Eseter Software, 2000
- [12] Nagy E D, Lelley T. Genetic and physical mapping of sequence-specific amplified polymorphic (S-SAP) markers on the 1RS chromosome arm of rye in a wheat background [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 1271-1277
- [13] Kumar A, Pearce S R, McLean K, et al. The Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants: genomic organization, evolution, and use as molecular markers [J]. *Genetica*, 1997, 100: 205-217
- [14] Sun H Y, Dai H Y, Zhao G L, et al. Genome-wide characterization of long terminal repeat retrotransposons in apple reveals the differences in heterogeneity and copy number between Ty1-*copia* and Ty3-*gypsy* retrotransposons [J]. *J Int Plant Biol*, 2008, 50 (9): 1130-1139
- [15] Baja Y P S. Somaclonal variation—origin, induction, cryopreservation, and implications in plant breeding [M] // Baja Y P S. Somaclonal variation in crop improvement. Berlin: Springer-Verlag I, 1990: 3-48
- [16] Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, et al. Retrotransposons of rice involved in mutation induced by tissue culture [J]. *PNAS*, 1996, 93: 7783-7788