

两种 SNP 分型方法的比较及其在柚品种鉴定中的应用

杨润婷^{1,2}, 吴波^{1,2}, 李翀¹, 曾培¹, 曾继吾², 钟云², 姜波², 周碧容², 钟广炎^{2,*}

(¹西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; ²广东省农业科学院果树研究所, 农业部热带亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广州 510640)

摘要: 用两种常用的 SNP 分型方法, 等位基因特异性 PCR 法 (Allele-specific PCR, AS-PCR) 和高分辨率熔解曲线分析 (High resolution melting analysis, HRMA), 对 16 个柚栽培品种和 8 个柚杂种后代材料进行了 7 个 SNP 位点的分型研究。结果表明这两种方法所得的分型结果相同, 都将 24 个样本分成了 22 种基因型。值得一提的是, 样本‘八朔’与‘红八朔’, ‘红甘夏’与‘川野夏橙’之间在所测位点无差别, 表明其应当是同一来源的无性系变异。‘早熟真龙柚’和‘中熟真龙柚’的分型结果表明它们的基因型不同, 看来并非是起源同一基因型的不同芽变品种, 也不存在亲子关系。可见, AS-PCR 和 HRMA 均适用于柚类品种的区分和鉴定。AS-PCR 法是一种准确、低成本的 SNP 分型方法, 适合普通实验室使用, 惟对 PCR 反应体系要求严格。HRMA 分型法具有准确、快速、简便、分析量大的特点, 但需要专门的设备, 试剂成本也高。

关键词: 柚; 单核苷酸多态性; 等位基因特异性 PCR; 高分辨率熔解曲线分析; 基因分型

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 06-1061-10

Comparison of Allele-specific PCR and High Resolution Melting Analysis in SNP Genotyping and Their Application in Pummelo Cultivar Identification

YANG Run-ting^{1,2}, WU Bo^{1,2}, LI Chong¹, ZENG Pei¹, ZENG Ji-wu², ZHONG Yun², JIANG Bo², ZHOU Bi-rong², and ZHONG Guang-yan^{2,*}

(¹College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400715, China; ²Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture, Fruit Tree Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Allele-specific PCR (AS-PCR) and high resolution melting analysis (HRMA) are two widely used SNP genotyping methods but no research has been done to compare them in terms of genotyping efficiency. In this study, 16 pummelo cultivars and 8 pummelo hybrids were genotyped using AS-PCR and HRMA respectively on two different sets of 7 SNP loci. It was shown that both methods generated the same genotyping results in which 24 accessions were assigned into 22 genotypes. It was noteworthy that Hassaku and Red Hassaku were identical at all SNP loci, indicating both accessions should

收稿日期: 2013-03-07; 修回日期: 2013-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971992); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2011CB100600)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gy_zhong@163.com)

have originated asexually from the same mother cultivar, as was the same case for the two Japanese summer orange cultivars, Beni Amanatsu and Kawano Natsudaidai. Interestingly, the early- and middle-season ‘Zhenlong’ pummelo cultivars possessed different genotypes, indicating clearly that they unlikely had the same origin as bud mutations as was thought before, and further analysis of HRMA results showed there is no direct hereditary relationship between them. Our results showed that both AS-PCR and HRMA were suitable methods for the identification of pummelo-related accessions. AS-PCR is a reliable and low-cost SNP genotyping method and easily accessible to ordinary laboratories though the method was found to be sensitive to changes in PCR conditions. HRMA is proven to be a reliable, quick, simple and high throughput SNP genotyping method; However, it uses special equipment and expensive reagents.

Key words: pummelo; single nucleotide polymorphism; allele specific-PCR; high resolution melting analysis; genotyping

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指单个核苷酸的变异导致的 DNA 序列多态性, 且等位基因频率不低于 1% (Brookes, 1999)。SNP 在动植物基因组中数量多, 分布广, 遗传稳定, 通常是二等位性 (个别位点有三等位、四等位), 故易于进行自动化分析 (Brookes, 1999)。作为第 3 代分子标记的代表, SNP 标记被广泛用于遗传图谱构建 (Deleu et al., 2009; Nayak et al., 2010)、性状关联分析 (Hill et al., 2010; Myles et al., 2011)、分子标记辅助育种等研究中 (Shirasawa et al., 2006)。目前常见的 SNP 分型方法有单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP) (Glavač & Dean, 2005)、变性高效液相色谱技术 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) (Nickerson et al., 2000)、基因芯片技术 (Syvänen, 2005)、DNA 测序 (Ahmadian et al., 2000)、高分辨溶解曲线分析 (high resolution melting analysis, HRMA) (Liew et al., 2004)、等位基因特异 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) (Newton et al., 1989) 等。AS-PCR 法是利用引物 3' 端的错配会大大减低 PCR 扩增效率的特性, 在 SNP 位点设计 3' 末端与不同等位基因互补的等位基因特异扩增引物, 通过凝胶电泳等方法检测目标 PCR 扩增产物的有或无, 来确定样本基因型。HRMA 是根据实时监测升温过程中荧光染料与 PCR 扩增产物的结合数量进行 SNP 分型, 原理是单碱基改变可引起 DNA 双链溶解温度 (melting temperature, T_m) 变化, 而 T_m 的变化可导致升温时双链解链提早或延迟, 这种解链时间的变化可从与双链结合的荧光染料解结合的提早或延迟中反映出来 (Liew et al., 2004)。这两种方法均已得到了广泛的应用 (Casado-Díaz et al., 2007; Wu et al., 2008; López-Villar et al., 2010; Lee et al., 2011), 目前尚未见对这两种方法作出具体比较。

柚类 [*Citrus maxima* (Burm.) Osbeck] 是栽培柑橘的 3 个基本种之一, 具有单胚和自交不亲和等特性。由于引种频繁、栽培历史悠久, 柚同名异物和同物异名现象很普遍。利用分子标记对不同柚品种进行准确区分, 对品种的产权保护和育种利用具有十分重要的意义。本试验中选取以柚为主的 24 个供试材料, 用 AS-PCR 法和 HRMA 在 7 个 SNP 位点上对它们进行基因分型, 结果显示通过这两种方法利用 SNP 进行柚品种鉴定是完全可行的。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

2012 年 9 月从国家柑橘种质资源圃取以柚为主的 24 份柑橘 (表 1) 叶片材料, 用 Easy-Pure Plant Genomic DNA Kit (Transgen Biotech) 提取全基因组 DNA。所得 DNA 终浓度为 $20 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 供试柚及杂种材料

Table 1 Pummelos and hybrids used in this study

编号 ID	样本名称 Accession name	所属物种 Species	编号 ID	样本名称 Accession name	所属物种 Species
1	囊内柚 Nangnei Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	13	红肉蜜柚 Red Flesh Guanximiyou	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck
2	平阳拉柚 Pingyangla Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	14	索马里柚 Somalia Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck
3	裴江柚 Peijiang Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	15	杭晚蜜柚 Hangwanmiyou	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck
4	爱柚-1 Aiyou-1	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	16	永嘉早香柚 Yongjia Zaoxiang Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck
5	绿肉 Green Flesh Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	17	星路比葡萄柚 Star Ruby Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfayden
6	真龙柚 (中熟) Zhenlong Pummelo (middle season)	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	18	鸡尾葡萄柚 Cocktail Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfayden
7	棉絮柚 Mianxu Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	19	八朔 Hassaku	<i>Citrus hassaku</i> Hort. ex Tanaka
8	18-12 柚 18-12 Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	20	红八朔 Red Hassaku	<i>Citrus hassaku</i> Hort. ex Tanaka
9	真龙柚 (早熟) Zhenlong Pummelo (early season)	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	21	川野夏橙 Kawano Natsudaikai	<i>Citrus natsudaikai</i> Hayata
10	绿柚 Green Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	22	红甘夏 Beni Amanatsu	<i>Citrus natsudaikai</i> Hayata
11	岩井柑 Yanjinggan	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	23	建阳桔柚 Jianyang Juyou	<i>Citrus maxima</i> × <i>Citrus reticulata</i>
12	垫江白心柚 Dianjiang White Flesh Pummelo	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Osbeck	24	株檬 Lime	<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle

1.2 柚 SNP 的获得

采取测序和分析 EST 数据两种方法来寻找柚 SNP。第 1 种方法依据克里迈丁红橘 (*Citrus clementina* L.) 的基因组序列 (<http://www.phytozome.org>) 设计引物来扩增‘沙田柚’和‘琯溪蜜柚’的 4 个基因, 即玉米黄质环氧化酶 (Zeaxanthin epoxidase, ZEP)、八氢番茄红素合成酶 (Phytoene synthase, PSY)、八氢番茄红素脱氢酶 (Phytoene desaturase, PDS)、 β -胡萝卜素羟化酶 (β -carotene hrdroxylyase, CHX) 基因的 DNA 片段, 挑选多个单克隆进行测序, 利用本地 blastn 直接比对序列来获得 SNP 位点 (Camacho et al., 2008)。第 2 种方法利用柑橘基因组内 SNP 密度高的特点, 对 EST 序列进行系统发生学分析, 推断出甜橙 (*C. sinensis* Osbeck)、酸橙 (*C. aurantium* L.)、葡萄柚基因组中的柚 haplotype (单体型), 从而获得柚种内 SNP。系统发生学分析在 MEGA5 软件 (Tamura et al., 2011) 上进行, 进化树用 Neighbour-joining 算法 (Saitou & Nei, 1987) 获得, 遗传距离计算使用 Tajima-Nei 算法 (Tajima & Nei, 1984), bootstrap 2 000 次 (Felsenstein, 1985)。

1.3 AS-PCR 引物设计

分别在克里迈丁基因组 cl_sca7: 3222996_T/C、cl_sca7: 2587191_A/T、cl_sca7: 2587286_G/C 这 3 个 SNP 位点设计了 3 个引物。其中一个为公用引物, 共用于两个等位基因的扩增。另外两个为等位基因特异性引物, 其 3' 末端碱基分别与相应 SNP 的两个不同碱基互补配对。例如在 cl_sca7: 3222996_T/C SNP 位点上, ZEP-6297a 为公用引物, ZEP-5899Cs 和 ZEP-5899Ts 为特异引物, 两特异引物的 3' 末端碱基分别与 SNP 的 T 和 C 互补配对。鉴于 CHX 基因测序片段较长, SNP 数量较多, 尝试利用同一个基因片段上两个相距较近的 SNP 位点作为正向和反向引物所对应的 3' 末端, 即正向引物对应上游 SNP 位点, 反向引物对应下游 SNP 位点, 来检测两个 SNP 组成的 haplotype (单体型)

组合。cl_sca6: 21394295_21394295ins7 是一个 7 bp 的插入/缺失位点, 对该位点同样利用等位基因之间因这个插入引起的序列差异设计了一对 AS-PCR 引物。在设计时, 为增强引物的特异性, 部分引物在 3' 末端倒数第 2 或第 3 个碱基位点引入错配 (Ye et al., 2001)。引物设计使用 primer3.0 软件 (Untergasser et al., 2012)。SNP 检测引物序列见表 2。利用柑橘基因组序列设计 PCR 阳性对照引物, 该对引物在所有已检测样本中对应一个 1 000 bp 的 DNA 片段, 引物序列分别为: P1000F (5' - 3'): GAGATCGTCACCACCATTTCCTACCATTG 和 P1000R (5' - 3'): TTGTTAGCAAATACAAG CAGCACAGCATCT。

表 2 AS-PCR 引物序列以及 PCR 产物大小
Table 2 The primers used in AS-PCR and the sizes of the expected PCR products

SNP 名称 SNP name	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	T _m / °C	产物大小/ bp Length of products
cl_sca7:3222996_T/C*	ZEP-6297a [^]	GGTCTGTGCTGTGCTCGCTACTCTG	68.87	398
	ZEP-5899Cs	GGGGTAGGATTGTAGCCGTTGTGCTTaC	68.53	
	ZEP-5899Ts	GGGTAGGATTGTAGCCGTTGTGCTgCT	70.19	
cl_sca6:21394295_21394295ins7	PSY-871s	GCCCCGCCTTCTTTCATCAATCCT	68.87	765
	PSY-1636-a	GGCAAAATGCTAATGATACAACATCCC	68.16	
	PSY-1636+a	GGTCAAAATGCTAATGATACAACATCC	65.02	
cl_sca9:29490045_G/C +	Hchx_1010G	GACTGCAATGAGATTCCCAAAATAACT	66.09	222
	Hchx_788Ts	TTTCAATGTGAAGGCCTTTTATGCAAAT	66.45	
	Hchx_1010C	GACTGCAATGAGATTCCGAAAATAACT	65.51	222
	Hchx_788Cs	TCAATGTGAAGGCCTTTTATGCAAATTG	67.11	
cl_sca9:29489677_C/T +	Hchx_1379C	CGACTCTCCGAAATAAGGCACGC	69.34	254
	Hchx_1125C	CAGTTCCAGCCATAGCCCTTCTCTCTG	68.69	
cl_sca7:2587191_A/T	ss1044-746a	TCAAATCACTCAAACCCATCACCGT	66.33	298
	ss1044-746A	TCGGAGGAGAGTTCCTGTACCATCA	66.77	
	ss1044-746T	TCGGAGGAGAGTTCCTGTACCATCT	65.17	
cl_sca7:2587286_G/C	ss1044-1031	TGGAACCTGGCTCCCATATCAGTA	65.41	380
	ss1044-651C	GACTATGCTGTGTGACAGTTCAGATGC	67.01	

注: * SNP 名称中 cl_sca7: 3222996T/C 指的是 Phytozome 克里曼丁基因组 (<http://www.phytozome.org>) 的第 7 个 scaffold 上第 3 222 996 个核苷酸位点的一个 T/C 转换, 其余依次类推; ^ 引物名称中的 a 和 s 分别代表反义和正义引物; # 引物序列中小写字母为错配碱基。

Note: * The SNPs were named as 'cl_sca', which means clementine scaffold (<http://www.phytozome.org>), plus the scaffold number, a semicolon ':', a number to indicate the location of the SNP on that scaffold and two letters, separated by "/", to indicate the two polymorphic nucleotides in the SNP. "a" a and s in primer names indicate the antisense and sense primers. # Lower case letters in primer sequences represent the mismatched bases.

1.4 AS-PCR 扩增及产物检测

PCR 扩增采用 10 μ L 反应体系, 其中含基因组 DNA 40 ng, Hot Start DNA 聚合酶 (TaKaRa) 0.5 U, 1 \times PCR 缓冲液 (含 1.5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺), dNTP mix (各 200 μ mol \cdot L⁻¹), 阳性对照正、反向引物各 0.1 ~ 0.2 μ mol \cdot L⁻¹, 等位基因特异性正、反向引物各 0.1 ~ 0.2 μ mol \cdot L⁻¹, 引物浓度需要根据阳性对照引物和等位基因特异引物的扩增效率差异进行适当调节。为了提高特异性, 降低错配率, PCR 扩增采用下触 PCR (Touchdown PCR) 法, 步骤如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 70 $^{\circ}$ C 退火 90 s 以 2.5 $^{\circ}$ C 递减, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 2 个循环; 紧接着在 95 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s 下循环 38 次; 最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min。用 1.0% ~ 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。每个样本分型试验重复 3 次。

1.5 HRMA SNP 分型

本研究对 24 个样本在 7 个 SNP 位点上进行了小片段扩增法对 SNP 进行 HRMA 分型 (Liew et al.,

2004)。引物设计、内参 (Gundry et al., 2008)、PCR 反应条件均与前报 (吴波 等, 2012) 一致, 退火温度的设定仍遵循比引物对平均 T_m 值高 3 °C 的原则。

1.6 信息学分析

多态信息含量值 (polymorphic information content, PIC) 的计算使用 PowerMarker version 3.25 (Liu & Muse, 2005) 分析得到。PIC 值是从群体中随机抽取的两个个体在某一多态性位点上基因型不同的概率, 反映了分子标记位点在身份鉴定、品种区分等方面应用的效率。

2 结果与分析

2.1 柚种内 SNP 筛选

分别扩增沙田柚和琯溪蜜柚的 *ZEP*、*PSY*、*PDS*、*CHX* 基因, 获得了相应长度为 1 600、800、800、2 200 bp 的基因片段, 克隆后测序, 在序列覆盖度 ≥ 5 时进行序列比对分析, 结果一共找到 33 个疑似 SNP。已知酸橙是橘柚一代杂种 (Scora, 1975; Barrett & Rhodes, 1976; Nicolosi et al., 2000), 甜橙的起源牵涉到两个柚和两个宽皮柑橘 (待发表), 葡萄柚是甜橙与柚的杂种 (Webber, 1943; Scora, 1975; Barrett & Rhodes, 1976; Nicolosi et al., 2000), 克里迈丁是甜橙与地中海橘的杂种 (待发表)。通过分析它们的 EST 序列, 获得了一些基因片段上的两个单体型, 其中的柚单体型则依据它们的遗传背景推测得到。然后通过比对所得的柚单体型, 就获得柚种内 SNP。

如图 1, A 所示, 葡萄柚的两个等位基因 *gfA* 和 *gfB* 中的 *gfB* 来自柚, 因为另一个等位基因 *gfA* 与椪柑的等位基因 (PA 和 PB) 聚成一簇, 故来自橘。由于柚簇 (*gfB*、CB、SB) 中等位基因之间没有差异, 在该片段区域未能得到柚种内 SNP。

在图 1B 中, 酸橙的 *sourA* 等位基因来自宽皮柑橘, 而 *sourB* 来自柚, 柚簇中 *sourB* 与 SB 之间的差异单核苷酸即柚种内 SNP。通过该方法一共获得了 30 多个柚种内 SNP。

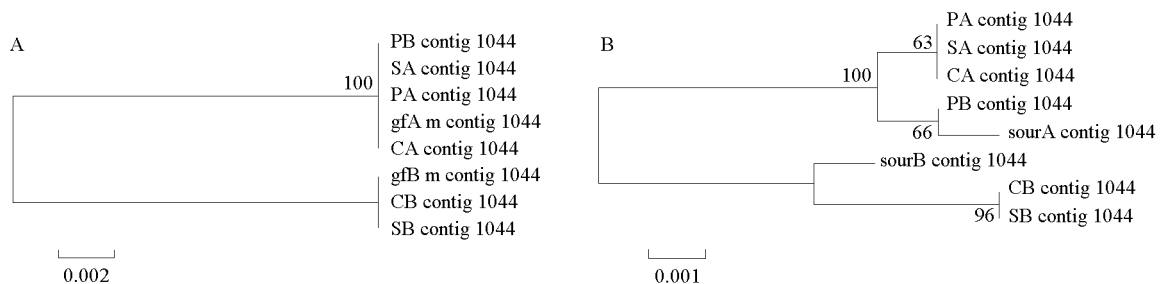


图 1 代表性柑橘同源单型体的相似性聚类树

SA 和 SB、PA 和 PB、CA 和 CB、*gfA* 和 *gfB*、*sourA* 和 *sourB* 分别是对应甜橙、椪柑、克里迈丁、葡萄柚、酸橙的两个单体型序列。

A: 无柚种内 SNP 的同源单体型序列片段聚类树。B: 有柚种内 SNP 的同源单体型片段聚类树。

标尺指示进化树分支长度代表的遗传距离。

Fig. 1 Representative phylogenetic trees for homologous haplotypes of *Citrus*

SA and SB, PA and PB, CA and CB, *gfA* and *gfB*, *sourA* and *sourB* are the two haplotypes of sweet orange, ponkan, clementine,

grapefruit and sour orange, respectively. A: No pummelo intra-specific SNPs were identified from clustered

haplotypes; B: SNPs were identified from clustered pummelo haplotypes.

The scale bar indicates the genetic distance represented

by the branch length of the tree.

2.2 AS-PCR 扩增及电泳分析

用 AS-PCR 法对 7 个 SNP 位点和 1 个插入/缺失位点进行分型。图 2 为 ZEP-6297a 和 ZEP-5899Ts 的扩增结果。结果显示阳性对照扩增子 (1 000 bp) 在 1~12 样品均正常。目标条带 (398 bp) 亮度差别很大, 样本 1、3、5~9、11、12 拥有正常亮度的带, 表明均有正常扩增子, 即含有与等位基因特异引物的互补等位基因, 也即等位基因 T (在表 3 中记为“+”)。2、4、10 号样本的条带微弱, 表明不能高效扩增, 应含有错配, 即无目标等位基因 (记为“-”)。

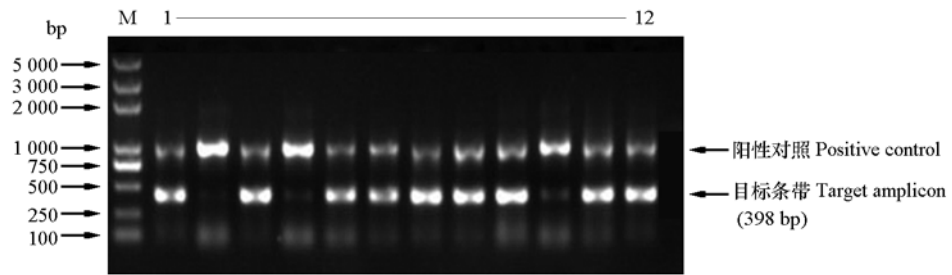


图 2 12 个样品用引物 ZEP-6297a 和 ZEP-5899Ts 的 AS-PCR 扩增结果
Fig. 2 AS-PCR results using primers of ZEP-6297a and ZEP-5899Ts for 12 accessions

Hchx_1010Ca 和 Hchx_1010Ga 引物对应的 SNP 位点为 G/C, Hchx_788Ts 和 Hchx_788Cs 对应的 SNP 位点为 T/C (表 2)。用引物 Hchx_1010Ga 和 Hchx_788Ts 进行扩增, 得到 1~8、17、18 样品基因分型结果为“+”(表 3), 表明这些样品在扩增片段的第 1 个 SNP 位点上有 G, 第 2 个位点上有 T。Hchx_1010Ca 和 Hchx_788Cs、Hchx_1379Ca 和 Hchx_1125Cs 扩增结果以此类推 (表 3)。

表 3 24 个样品的 AS-PCR 分型结果

Table 3 The SNP genotypes of the 24 accessions determined by AS-PCR

引物对 Primer pairs	样品编号 Sample ID																								PIC
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
ZEP-6297a, ZEP-5899Cs	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.3680
ZEP-6297a, ZEP-5899Ts	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.2468
PSY-871S, PSY-1636+a	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.4545	
PSY-871S, PSY-1636-a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0.4156
Hchx-1379Ca, Hchx-1125Cs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	0.2468	
Hchx-1010Ca, Hchx-788Cs	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	0.4545
Hchx-1010Ga, Hchx-788Ts	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	0.5195	
ss1044-746a, ss1044-746As	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	0.5195	
ss1044-746a, ss1044-746Ts	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	0.5065	
ss1044-1031a, ss1044-651Cs	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0.4156	
平均值 Mean value																									0.4148

2.3 柚 SNP 的 HRMA 分型

吴波等 (2012) 的研究表明小片段扩增子 HRMA 试验成功的关键在于提高两种不同纯合型扩增片段之间的 T_m 值差异, 为此, 在本研究中, 尽量缩短扩增片段长度, 并避免选择 GC 含量高的区域作为扩增区域。结果显示所有 7 个 SNP 位点的 HRMA 均能清晰明确地区分 3 种不同的基因型。如图 3 所示, 在所分析的 4 个 SNP 位点 (chr2: 31491_T/C, chr3: 10462341_T/C, chr2: 30595627_T/C 和 chrUn: 19904498_A/G) 上, 杂合基因型均呈现双峰 (灰色曲线), 两种纯合型为单峰曲线 (红色和绿色曲线, T_m 值差 $> 1^\circ\text{C}$), 各自可明确区分开来。

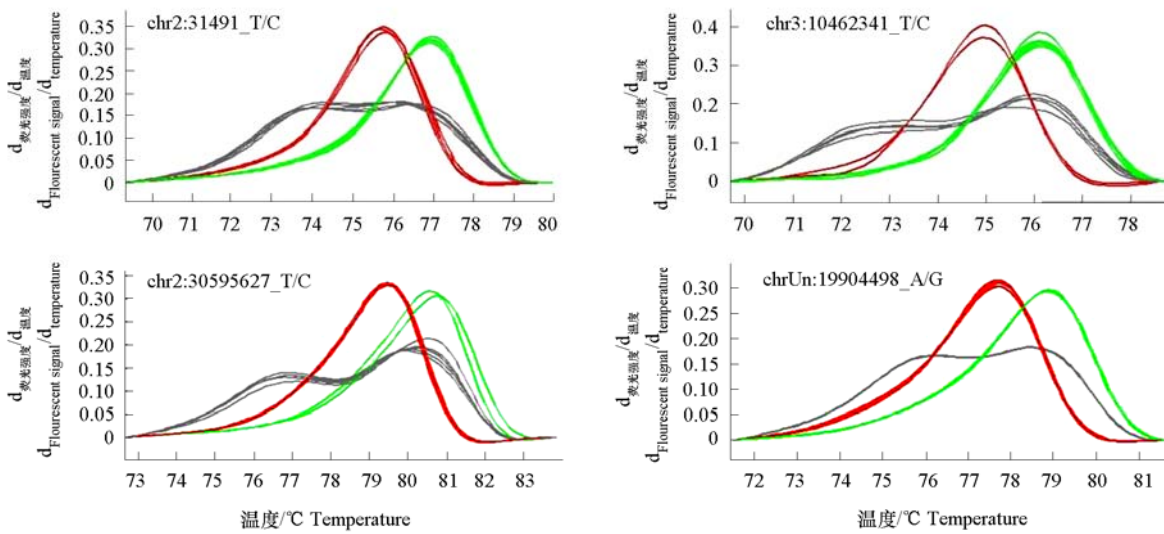


图 3 4 个 SNP 位点的高分辨率熔解曲线的一阶导数图

SNP 命名规则与表 2 中相同。参照序列使用甜橙基因组 (Xu et al., 2013), chr 代表染色体。灰色曲线代表杂合基因型, 红色曲线代表扩增片段 T_m 值较低即含等位基因 A 或者 T 的纯合基因型; 绿色曲线代表扩增片段 T_m 值较高即含等位基因 G 或者 C 的纯合基因型。

Fig. 3 Derivative melting curves of four representative amplicons from four different SNP loci

The nomination of SNPs followed the same rules as used in Table 2 except that the sweet orange genome instead of clementine genome was used here as reference (Xu et al., 2013). "chr" indicates chromosome. The grey curves indicate heterozygous genotypes while the red and green curves indicate homozygous A or T (low T_m amplicons), G or C (high T_m amplicons) genotypes respectively.

2.4 24 份材料的分型结果

用 10 对 AS-PCR 引物对 24 个样本进行分型的结果见表 3, 所有样本共有 22 种不同的基因型, 其中‘八朔’(19)和‘红八朔’(20)基因型相同, ‘红甘夏’(22)与‘川野夏橙’(21)基因型相同。分型数据显示, 实际只需 7 对引物(表 3 中黑体表示者)即可将该 22 种基因型区分开。早熟和中熟‘真龙柚’(9 和 6)在 3 个 SNP 位点上显示有不同的基因型, 应为不同的材料。就所用引物所含的多态性信息含量而言, 单对引物的多态信息含量 (PIC) 平均高达 0.4148, 其中有 3 对引物的 PIC 值超过了 0.5, 显示这些引物在品种区分上具有很高的效率。

24 个样本在 7 个 SNP 上的 HRMA 分型结果见表 4, 所有样本的分型结果和 AS-PCR 的结果一致, 同样可划分为 22 种基因型, 其中‘八朔’(19)和‘红八朔’(20)、‘红甘夏’(22)与‘川野夏橙’(21)仍分别具有相同的基因型。而两个‘真龙柚’(9 和 6)在 3 个 SNP 位点上具有不同的基因型, 此结果也与 AS-PCR 结果一致。

表 4 24 个样本的 HRMA 分型结果

Table 4 The SNP genotypes of the 24 accessions determined by HRMA

SNP	样品编号 Sample ID																								PIC
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
chr2:31491_T/C	T/C	T/T	C/C	T/C	T/T	T/T	T/C	T/T	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	C/C	T/C	C/C	T/C	T/C	T/C	T/C	C/C	C/C	C/C	T/C	0.3755
chr3:10462341_T/C	T/T	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	T/C	T/T	T/C	C/C	C/C	T/C	C/C	T/T	T/C	T/C	C/C	C/C	T/C	T/T	0.3732
chr2:30595627_T/C	T/T	T/C	T/C	T/C	T/C	T/T	T/C	T/T	C/C	T/T	T/T	T/C	T/C	C/C	T/T	T/T	T/C	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	0.3288	
ChrUn:19904498_A/G	G/G	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/G	A/G	A/G	A/G	A/A	G/G	G/G	A/A	A/A	A/G	A/G	0.3288
chr9:2379630_T/G	G/G	G/T	G/G	G/G	T/T	T/T	G/G	G/G	G/T	T/T	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	T/T	G/T	G/G	G/T	G/T	G/T	G/T	G/G	G/G	0.3538
chr4:14833122_T/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/T	0.2754
chr9:13716551_T/C	C/C	C/C	C/C	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/C	C/C	T/C	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	0.1692
平均值 Mean value																								0.3144	

分型结果(表4)显示,最少5个SNP位点(黑体表示者)能将22种不同基因型分开。HRMA使用的7个SNP平均PIC值为0.314,低于AS-PCR中SNP的PIC值。PIC值的高低只取决于使用的分子标记位点的多态程度高低,与使用的分型方法无关。

3 讨论

在品种区分研究中,传统多用SSR、RAPD等(Besnard et al., 2001; Aranzana et al., 2003)。但是SSR有一定的缺陷,其中最主要的问题是杂交过程中的重组会产生新的等位基因,此外,在DNA复制时的偶然滑动也会导致重复单元数发生改变(Barkley et al., 2009)。RAPD技术的问题是随机引物和模板的结合受诸多因素的影响,特异性不强,结果的重复性不太好(Pejic et al., 1998)。相较SSR标记而言,单个SNP分子标记的多态信息含量虽然较低,但由于SNP数量多,总体信息量就很大,区分能力就很强(Hamblin et al., 2007)。大多数SNP是两等位性,因此分型结果容易记录和分析解读,可数字化,适合共享和自动化分析(Rafalski, 2002)。而且SNP结果往往在不同检测技术间都有好的重现性(Jones et al., 2007)。随着DNA测序技术的进步和DNA数据的积累,SNP标记的开发也已经变得越来越容易。

本研究中用AS-PCR法和HRMA分型方法分别在两组各7个SNP位点上成功区分了24个以柚为主的柑橘材料,显示它们均可用于这些材料的SNP基因型检测,应该是柚类品种鉴定和区分的好方法。两种方法的结果完全一致,印证了它们的可靠性。

试验中发现AS-PCR对反应条件比较敏感,当PCR体系中dNTP和引物浓度偏低时目标条带偏弱,偏高时则易发生非特异性扩增导致假阳性或产生大量引物二聚体导致PCR失败。HRMA方法对PCR要求较低,只需用普通Taq酶即可,无需热启动酶。相较而言,HRMA分型更容易成功,产生错误结果的概率更低。为提高AS-PCR反应的特异性,本研究中采用热启动DNA聚合酶、提高退火温度、引入错配碱基等措施,同时还加入阳性对照来判断PCR效率以排除PCR失败导致的假阴性。关于在引物末端引入何种类型的错配碱基来提高PCR特异性的问题,有研究表明G/A、C/T为强错配类型,C/A、G/T为弱错配类型,A/A、C/C、G/G、T/T为中错配类型(Ye et al., 2001)。强错配碱基虽然可提高PCR的特异性,但也会相应降低PCR效率。不过,判定某基因型存在与否时,判断正确与否是关键,故应当优先考虑PCR的特异性,在设计引物时选择了强错配和中错配碱基。另外,HRMA分型方法虽然有简便、快速、高通量的优点,但仪器昂贵,试剂成本较高。比较而言,AS-PCR法只需要PCR仪和电泳仪,更适用于常规实验室进行小规模基因分型。

中国是柚类主要的起源中心和遗传变异中心之一,种质资源极其丰富。近几年来,由于生产和研究中品种鉴定和品种知识产权保护的需求日益增大,利用SNP分子标记进行品种鉴定与区分的应用越来越广泛(Yoon et al., 2007; Tokarska et al., 2009; Cabezas et al., 2011)。在本研究中,尝试利用AS-PCR技术,结合HRMA以及DNA测序技术为每个柚类品种创建独一无二的基于SNP的条形码,解决柚类品种快速鉴定、同名异物或同物异名等问题,并用SNP分析柚类资源的遗传多样性。本研究结果表明,上述思路和方法是完全可行的。在本研究中,无论使用哪种方法或哪组SNP,所得分型结果完全一致,24个样本均被归为22种基因型。没有检测到24种基因型是因为‘八朔’和‘红八朔’、‘红甘夏’与‘川野夏橙’的基因型两两相同,这表明,‘红八朔’应是‘八朔’的无性系突变,而‘红甘夏’的确是‘川野夏橙’的无性系突变(程绍南等, 2001)。意外的是,两个‘真龙柚’样本(即‘早熟真龙柚’和‘中熟真龙柚’)的基因型迥异,显然它们不可能起源于同源无性系突变,进一步检视表4,可以发现这两个‘真龙柚’之间也不存在亲子关系,其解释有二:样本有误,或者两者原本就不同。

References

- Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson A C, Sterky F, Nyrén P, Uhlén M, Lundeberg J. 2000. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Analytical Biochemistry*, 280: 103 - 110.
- Aranzana M, Carbó J, Arús P. 2003. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: Cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (8): 1341 - 1352.
- Barkley N A, Krueger R R, Federici C T, Roose M L. 2009. What phylogeny and gene genealogy analyses reveal about homoplasy in citrus microsatellite alleles. *Plant Systematics and Evolution*, 282: 71 - 86.
- Barrett H C, Rhodes A M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany*, 1: 105 - 136.
- Besnard G, Breton C, Baradat P, Khadari B, Berville A. 2001. Cultivar identification in olive based on RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 668 - 675.
- Brookes A J. 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234: 177 - 186.
- Cabezas J A, Ibanez J, Lijavetzky D, Velez D, Bravo G, Rodriguez V, Carreno I, Jermakow A M, Carreno J, Ruiz-Garcia L, Thomas M R, Martinez-Zapater J M. 2011. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biology*, 11: 153.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden T L. 2008. BLAST⁺: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10: 421.
- Casado-Díaz A, Cuenca-Acevedo R, Quesada J M, Dorado G. 2007. Individual single tube genotyping and DNA pooling by allele-specific PCR to uncover associations of polymorphisms with complex diseases. *Clinica Chimica Acta*, 376: 155 - 162.
- Cheng Shao-nan, Bei Zeng-ming, Ye Xing-yuan, Chen You-qing, Yang Xing-liang, Feng Xian-ju. 2001. A survey on the similarity of Huyou to Amanatsu and the development of canning Huyou. *South China Fruits*, 30 (6): 6 - 7. (in Chinese)
- 程绍南, 贝增明, 叶杏元, 陈友清, 杨兴良, 冯先桔. 2001. 胡柚与日本甘夏的同类型性及其胡柚罐头的开发. *中国南方果树*, 30 (6): 6 - 7.
- Deleu W, Esteras C, Roig C, González-To M, Fernández-Silva I, Gonzalez-Ibeas D, Blanca J, Aranda M A, Arús P, Nuez F, Monforte A J, Picó M B, Garcia-Mas J. 2009. A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. *BMC Plant Biology*, 9: 90.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783 - 791.
- Glavač D, Dean M. 2005. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutation*, 2 (5): 404 - 414.
- Gundry C N, Dobrowolski S F, Martin Y R, Robbins T C, Nay L M, Boyd N, Coyne T, Wall M D, Wittwer C T, Teng D H F. 2008. Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. *Nucleic Acids Research*, 36: 3401 - 3408.
- Hamblin M T, Warburton M L, Buckler E S. 2007. Empirical comparison of simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. *PLoS ONE*, 2: 9.
- Hill E W, McGivney B A, Gu J, Whiston R, MacHugh D E. 2010. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for thoroughbred racehorses. *BMC Genomics*, 11: 552.
- Jones E S, Sullivan H, Bhatramakki D, Smith J S C. 2007. A comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 361 - 371.
- Lee H Y, Park M J, Kim N Y, Yang W I, Shin K J. 2011. Rapid direct PCR for ABO blood typing. *Journal of Forensic Sciences*, 56 (Suppl 1): 179 - 182.
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*, 50: 1156 - 1164.
- Liu K, Muse S V. 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128 - 2129.
- López-Villar I, Ayala R, Wesselink J, Morillas J D, López E, Marín J C, Díaz-Tasende J, González S, Robles L, Martínez-López J. 2010. Simplifying the detection of MUTYH mutations by high resolution melting analysis. *BMC Cancer*, 10: 408.
- Myles S, Boyko A R, Owens C L, Brown P J, Grassi F, Aradhya M K. 2011. Genetic structure and domestication history of the grape. *PNAS*, 108 (9): 3530 - 3535.

- Nayak S N, Zhu H, Varghese N, Datta S, Choi H K, Horres R, Jüngling R, Singh J, Kavi Kishor P B, Sivaramakrishnan S, Hoisington D A, Kahl G, Winter P, Cook D R, Varshney R K. 2010. Integration of novel SSR and gene-based SNP marker loci in the chickpea genetic map and establishment of new anchor points with *Medicago truncatula* genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 120: 1415 - 1441.
- Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, Powell S J, Summers C, Kalsheker N, Smith J C, Markham A F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17: 2503 - 2516.
- Nickerson M L, Weirich G, Zbar B, Schmidt L S. 2000. Signature-based analysis of MET proto-oncogene mutations using DHPLC. *Human Mutation*, 16: 68 - 76.
- Nicolosi E, Deng Z N, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1155 - 1166.
- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1248 - 1255.
- Rafalski A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 94 - 100.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406 - 425.
- Scora R W. 1975. On the history and origin of *Citrus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102: 369 - 375.
- Shirasawa K, Shiokai S, Yamaguchi M, Kishitani S, Nishio T. 2006. Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 147 - 155.
- Syvänen A C. 2005. Toward genome-wide SNP genotyping. *Nature Genetics*, 37 (Suppl): 5 - 10.
- Tajima F, Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1: 269 - 285.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731 - 2739.
- Tokarska M, Marshall T, Kowalczyk R, Wójcik J M, Pertoldi C, Kristensen T N, Loeschcke V, Gregersen V R, Bendixen C. 2009. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: The case of European bison. *Heredity*, 103: 326 - 332.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth B C, Remm M, Rozen S G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40: 1 - 12.
- Webber H J. 1943. Cultivated varieties of citrus//Webber H J, Batchelor D L. The citrus industry. New Jersey: University of California Press: 475 - 668
- Wu Bo, Yang Run-ting, Zhu Shi-ping, Zhong Yun, Jiang Bo, Zeng Ji-wu, Zhong Guang-yan. 2012. Genotyping single nucleotide polymorphisms in mandarin cultivars using high resolution melting analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (4): 777 - 782. (in Chinese)
- 吴波, 杨润婷, 朱世平, 钟云, 姜波, 曾继吾, 钟广炎. 2012. 宽皮柑橘单核苷酸多态性的高分辨率溶解曲线分型. *园艺学报*, 39 (4): 777 - 782.
- Wu S B, Wirthensohn M G, Hunt P, Gibson J P, Sedgley M. 2008. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 1 - 14.
- Xu Q, Chen L L, Ruan X, Chen D, Zhu A, Chen C, Bertrand D, Jiao W B, Hao B H, Lyon M P, Chen J, Gao S, Xing F, Lan H, Chang J W, Ge X, Lei Y, Hu Q, Miao Y, Wang L, Xiao S, Biswas M K, Zeng W, Guo F, Cao H, Yang X, Xu X W, Cheng Y J, Xu J, Liu J H, Luo O J, Tang Z, Guo W W, Kuang H, Zhang H Y, Roose M L, Nagarajan N, Deng X X, Ruan Y. 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics*, 45: 59 - 66.
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins A R, Day I N M. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 29: e88.
- Yoon M S, Song Q J, Choi I Y, Specht J E, Hyten D L, Cregan P B. 2007. BARCSoySNP23: A panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 885 - 899.