

MITE 转座子在不同甘蓝型油菜品种中的多态性研究

安素妨¹, 李保全¹, 鲁丹丹¹, 李高原², 侯锦娜^{1*}

(1 河南省农业科学院 作物设计中心, 郑州 450002; 2 华中农业大学 信息学院, 武汉 430071)

摘 要: 微型反向重复转座因子(MITE)在真核生物基因组中普遍存在, 其活动能够在物种内形成丰富的多态性, 在基因组进化和基因调控中均发挥重要作用。该研究利用 286 对不同 MITE 家族侧翼序列筛选的特异引物, 对 101 个中国油菜、27 个加拿大油菜和 29 个合成油菜品系(共 157 个品系)的基因组 DNA 进行多态性研究, 以明确 MITE 家族的插入/缺失多态性以及在不同油菜品种之间插入的遗传多样性, 进而探讨他们之间的亲缘关系。结果显示: (1) 286 对引物中筛选出 60 对条带清晰重复性高的多态性引物, 多态性比例 21.0%; 其中 *Stowaway-like* 家族和 *Tourist-like* 家族特异引物的多态性比例分别为 24.6% 和 20.0%。(2) PCR 扩增结果显示, 60 对多态性引物对中国、加拿大、合成油菜品系的基因组 DNA 分别扩增出 4 029、1 044、1 087 条清晰可辨的条带。(3) UPGMA 聚类显示, 中国油菜品种间遗传相似系数在 0.59~0.95, 加拿大油菜品种间遗传相似系数在 0.73~0.95; 合成油菜品种间遗传相似系数在 0.64~0.93。研究表明, MITE 在基因组中大量随机插入, 形成种内丰富的多态性, 利用 MITE 家族引物检测不同地区的油菜种质资源的多态性, 可为油菜的育种找到许多尚未被开发的遗传变异。

关键词: 微型反向重复转座因子(MITE); 甘蓝型油菜; 遗传多样性

中图分类号: Q346⁺.5; Q789; S565.4 **文献标志码:** A

Polymorphism of MITE in Different *Brassica napus* L. Varieties

AN Sufang¹, LI Baoquan¹, LU Dandan¹, LI Gaoyuan², HOU Jinna^{1*}

(1 Crop Designing Center, Henan Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2 College of Informatics, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Miniature inverted repeat transposable elements (MITEs) are prevalent in eukaryotic genomes. Activities of MITEs induce abundant polymorphisms in species. They are known to critically influence genome evolution and gene regulation. In this research, 286 MITE family specific primers were developed for polymorphisms screening among 157 *Brassica napus* genotypes including 101 and 27 natural varieties collected from China and Canada, respectively and 29 synthesized lines. Polymorphisms produced from Insertion/deletion of MITEs were used to dissect genetic diversities and relationship between different *B. napus* lines. Results demonstrated that: (1) sixty pairs of primers displayed clear and repeatable polymorphism bands among genotypes, which occupied 21.0% of all developed primers; Polymorphic rate of primers developed from *Stowaway-like* and *Tourist-like* families are 24.6% and 20.0%, respectively. (2) These 60 polymorphic primers were selected to screen MITE induced polymorphisms among Chinese, Canadian *B. napus* genotypes and 29 synthesized *B. napus* lines. There are 4 029, 1 044 and 1 087 distinguishable bands amplified, respectively. (3) UPGMA analysis showed that, the genetic similarities are 0.59–0.95,

收稿日期: 2019-05-16; 修改稿收到日期: 2019-07-25

基金项目: 国家重点研发计划“七大农作物育种”专项(2018YFD0100600); 国家自然科学基金青年基金(31501341); 河南省重点研发与推广专项(科技攻关 182102110136); 河南省农业科学院优秀青年科技基金(2016YQ29)

作者简介: 安素妨(1986—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事油菜分子生物学研究。E-mail: ansf86@163.com

* 通信作者: 侯锦娜, 博士, 助理研究员, 主要从事油菜分子生物学研究。E-mail: houjinna_1982@163.com

0.73—0.95 and 0.64—0.93 in the populations of Chinese semi-winter, Canadian spring *B. napus* genotypes and synthesized *B. napus* lines, respectively. Our results indicate abundant inter-species polymorphisms are created by thousands of MITEs copies randomly insertion in genome. By using MITE family primers to detect the polymorphism of *B. napus* germplasm resources in different regions, we can find those polymorphisms provide resource for molecular marker assisted breeding of *B. napus*.

Key words: MITE; *Brassica napus*; genetic diversity

微型反向重复转座因子(MITE)是一类广泛存在于所有生物的非自主性 DNA 类(class II)转座子,不具有编码转座酶的能力。最早由 Bureau 和 Wessler 在玉米中发现并命名^[1-2],在随后的研究中逐步在拟南芥、蚊子、人类、水稻中均有发现^[3-7]。MITE 长度通常小于 600 bp,具有富含 A/T 碱基,末端反向重复(TIR,≥10 bp)和靶位点重复(TSD, 2~10 bp)等典型的结构特征^[8-9]。根据 TSD 的序列特征将 MITE 主要分为 *Stowaway-like* 类(TSD; TA)和 *Tourist-like* 类(TSD; TAA 或 TTA)两个大家族。随着研究的进展更清晰地认识了其结构特点,逐步发现了许多新的 MITE 家族,如 *hAT-like* (TSD)和 *Mutator-like* (TSD)等家族^[5, 10-12]。MITE 主要分布在基因组中的常染色质区域,并在基因调控方面发挥重要作用,MITE 插入到基因不同的功能区域并影响邻近基因的转录活性,从而导致基因表达沉默和基因的上调或下调的表达^[10, 13]。研究发现 MITE 虽然在不同物种中占整个基因组成分的比例不同,但均具有较高的拷贝数^[14-15],这一特征使其易于造成基因组的多态性并开发成分子标记,成为分子标记辅助育种的有益工具。MITE 转座子在基因组中通常处于沉默状态,转座子的激活可引起缺失、插入、易位等多种突变^[16],同时影响基因的表达,形成种内或种间的多态性,因此 MITE 活动对邻近基因的表达调控、表型基因性状、物种的进化动力学研究都起到了非常重要的作用^[17-18]。近年来 MITE 转座子在动物和植物基因组中的结构、扩增模式以及表观遗传水平的调控已被广泛研究,也有许多学者对 MITE 转座子的插入多态性进行了研究。学者们在水稻的研究中发现 MITE 家族的 *mPing* 的插入或缺失可造成品种间的多态性^[19-21]。Nouroz 等^[22]对新发现的 15 个 MITE 家族进行分析,在芸薹属的 3 个基本种(AA, BB, CC)中发现了 MITE 插入的多态性。Sampath 等^[12]对 289 个 MITE 家族进行插入多态性分析,在芸薹属植物基因组品种间的多态性达到 52%,在种内的多态性达到 23%。上述研究主要集中在探讨个别 MITE 家族在种间的多态性、MITE

在基因组之间的多态性或者 MITE 家族在物种中的多态性分析,缺乏对 MITE 转座子多个家族在油菜中的插入多态性及遗传多样性的深入研究和相关的实验数据。因此深入研究不同家族 MITE 转座子的插入多态性和其在品种间的遗传多样性可为将来利用 MITE 开发分子标记,辅助油菜的性状改良提供相关的理论依据。

油菜是世界上第三大油料作物,也是中国重要的经济作物,本研究以半冬性中国油菜、春性加拿大油菜以及半冬性合成油菜等共 157 份种质资源为实验材料,利用多态性的 *Stowaway-like* (*BraSto*) 类家族、*Tourist-like* (*BraTo*、*Mongkey King*) 类家族、*Hat* (*BraHAT*) 类家族以及 *Mutator* (*BraMu*) 类家族中筛选出 60 对多态引物,对收集的油菜种质资源进行基因型鉴定和聚类分析,以明确 MITE 家族的插入/缺失多态性以及在不同油菜品种之间插入的遗传多样性,进而探讨他们之间的亲缘关系,为以后的育种中杂交亲本选择、杂交组合的选配以及新品种的选育奠定了良好的基础,更为我们进一步研究 MITE 转座子在油菜中的扩增机制和功能提供了素材和参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料共有 157 份,中国半冬性油菜、加拿大春性油菜和合成油菜品系的数量分别为 101 份、27 份和 29 份。材料名称中同一品种的不同编号分别来自不同单株。材料编号及名称详见表 1。

1.1.1 材料种植 2014 年 10 月份将 157 个材料种植于河南省农业科学院作物设计中心原阳试验基地,每份材料种植 1 行,行长 2.5 m,行距 0.5 m,株距 0.20 m。随机种植,并进行常规田间管理。

1.1.2 取样 于油菜 6~7 片真叶时,每个材料随机取其最嫩叶片编号后,迅速放入液氮保存备用。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 MITE 引物侧翼序列的保守性,利用 Primer Premier 5 软件设计 23 对 *Tourist-like* 家族 *Monkey King* 引物(表 2),选取文献中

表 1 实验材料

Table 1 Materials

编号 NO	品种名称 Name	编号 NO	品种名称 Name	编号 NO	品种名称 Name
1	Huayouza6-1	46	Fuyou518-2	91	Shuangyou8-2
2	Huayouza6-2	47	Nanyouza1-1	92	Chaojiqinyou2
3	Huayouza9-1	48	Nanyouza1-2	93	Shanyou16
4	Huayouza9-2	49	Changyouza61	94	Chengyou1-1
5	Huayouza13-1	50	Rongyou11-1	95	Chengyou1-2
6	Huayouza13-2	51	Rongyou11-2	96	Shanyou803-1
7	Huayouza15-1	52	Rongyou13-1	97	Shanyou803-2
8	Huayouza15-2	53	Rongyou13-2	98	Peng1
9	Zhongyouza13-1	54	Rongyou13-3	99	Peng2-1
10	Zhongyouza13-2	55	Xianyou800-1	100	Peng2-2
11	Mainyou12-1	56	Xianyou800-2	101	Shanyou1-7
12	Mainyou12-2	57	Ningyou16-1	102	CS01-4
13	Mianyou14-1	58	Ningyou16-2	103	CS02-3
14	Mianyou14-2	59	Fengyou701-1	104	CS02-4
15	Mainyou17-1	60	Fengyou701-2	105	CS03-3
16	Mianyou17-2	61	Zheyou50-1	106	CS04-5
17	Qianhuangyou21	62	Zheyou50-2	107	CS05-2
18	Baoyou85-1	63	Zashuang2-1	108	CS05-4
19	Baoyou85-2	64	Zashuang2-2	109	CS06-2
20	Youyan9-1	65	Qinyou7-1	110	CS07-1
21	Youyan9-2	66	Qinyou7-2	111	CS08-4
22	Youyan10-1	67	Qinyou9-1	112	CS09-1
23	Youyan10-2	68	Qinyou9-2	113	CS10-1
24	Youyan50-1	69	Qinyou10	114	CS15-1
25	Youyan50-2	70	Qinyou19-1	115	CS16-1
26	Youyan817-1	71	Qinyou19-2	116	CS16-2
27	Youyan817-2	72	Suyou1	117	CS18-1
28	Qianyou18-1	73	Suyou4	118	CS18-2
29	Qianyou18-2	74	Nannongyou1	119	CS23-4
30	Qianyou22	75	Nannongyou3-1	120	CS23-5
31	Qianyou29	76	Nannongyou3-2	121	CS24
32	Qianyou30	77	Zhongshuang9	122	CS25
33	Mianyou11	78	Huayouza62-1	123	CS31-1
34	Mianyou12-3	79	Huayouza62-2	124	CS31-5
35	Mianyou12-4	80	Fuyouza108-1	125	CS32-1
36	Mianyou14-3	81	Fuyouza108-2	126	CS32-3
37	Mianyou14-4	82	Huayouza12-1	127	B001-1
38	Mianyou33-1	83	Huayouza12-2	128	B001-2
39	Mianyou33-2	84	Zhongyouza12-1	129	W01-1
40	Mianxinyou19	85	Zhongyouza12-2	130	W01-2
41	Mianxinyou28	86	Huashuang5-1	131	W01-3
42	Yuyou23-1	87	Huashuang5-2	132	W02-1
43	Yuyou23-2	88	Huashuang4-1	133	W02-2
44	Deyou8	89	Huashuang4-2	134	W02-3
45	Fuyou518-1	90	Shuangyou8-1	135	W02-4

续表 2 Continued Table 2					
编号 NO	品种名称 Name	编号 NO	品种名称 Name	编号 NO	品种名称 Name
136	W02-5	144	W03-5	152	W05-3
137	W02-6	145	W04-1	153	W06-1
138	W02-7	146	W04-2	154	W06-2
139	W02-8	147	W04-3	155	W07-1
140	W03-1	148	W04-4	156	W07-2
141	W03-2	149	W04-5	157	W09-3
142	W03-3	150	W04-6		
143	W03-4	151	W05-2		

注:1~101. 中国半冬性油菜;102~128. 加拿大春性油菜;129~157. 半冬性合成油菜
Note: 1—101. China semi-winter rapeseed; 102—128. Canada spring-type rapeseed; 129—157. Semi-winter synthetic rapeseed

表 2 *Monkey king* 引物序列
Table 2 Primer sequences of *Monkey king*

引物名称 Primer name	引物起源 Primer origin	序列来源 Sequence source	引物序列 Primer (5'→3')	
			上游 Forward	下游 Reverse
MT1	<i>B. rapa</i>	AB070625	GGATTATGGTTAACCCTATGAC	CAATCAAAAGCCAGTCCTC
MT2	<i>B. rapa</i>	AB180897	TGAGTGAGGGTGAATCTCTAGC	TTTGCATTTGTGCCTTGTGAAC
MT3	<i>B. rapa</i>	AB257127	CGGCAGACTATTAGAATCTCAC	TTACTATTACAACCGCACCAC
MT4	<i>B. rapa</i>	AB257128	ATGGCTTCCTATACCACTTC	TAACGCTGTCAACAAAACCTC
MT5	<i>B. rapa</i>	AC155340	GCTGAAAAGGGAAACATAC	AAACCACAACGAGACGATAC
MT6	<i>B. rapa</i>	AC172870	CCAACACTTAACTCTAAACCC	TGAGATGCATAAAGCACAAGT
MT7	<i>B. rapa</i>	AC172879	CCGTAGTTCAGGGCCACA	GACCTTCACCTCCGACCA
MT8	<i>B. rapa</i>	AC189195	ACGTTCGTTCTTTGGGTT	TCTCGTGAAGGAGGCATT
MT9	<i>B. rapa</i>	AC189197	AGTAAAGCAATGGGAGGAGCAG	TTTGTGCTGATCAAAACGAGAC
MT10	<i>B. rapa</i>	AC189200	CACCTATGCCAATCAAATGAAC	CCCTATCCAAACTATCCGAAAC
MT11	<i>B. rapa</i>	AC189218	CTTGCTCATTTCAGTTGT	AGCTTCTAATTGGTTTGCG
MT12	<i>B. rapa</i>	AC189221	GCGAAGATGCTATATACAGAC	CATGCACTCAGAATTAGATG
MT13	<i>B. rapa</i>	AC189222	GCCGTAAATGTTTAGCTG	ATTGGAGGTGATTGGTTGA
MT14	<i>B. rapa</i>	AC189225	TCAGGATAGCCGATTCAAG	AGAAGAACGAGAACACGCC
MT15	<i>B. rapa</i>	AC189237	CAAGAATTGGTTGGTAGC	AGCAAAAGATGGAGCACT
MT16	<i>B. rapa</i>	AC189263	TAACGAAAATTTTAGCGTG	TCTACTAAGGAGGCGACTG
MT17	<i>B. rapa</i>	AC189264-1	GAATTTGACACACACACTCTTG	AACACCCTAGTTTCAAAGACAC
MT18	<i>B. rapa</i>	AC189264-2	TTGGTCTGTTTGTTTCGTTG	TTGGGTTACTTTTCGATATGC
MT19	<i>B. rapa</i>	AC189264(1+2)	GTGGAGATTGGAGGATTA	TGGGTATTATTGGGTATTG
MT20	<i>B. rapa</i>	AC189275-1	CGGAATCGCAGGACTACAT	CGGGTCCACTGGTTTGATA
MT31	<i>B. rapa</i>	AC189448	GGCTGAATGTTTGATGTTA	GTCGGAACAAATTCTGACC
MT32	<i>B. rapa</i>	AC232556	TGGGAAGATGTAGATATGGT	CTAAACAACCTGCGTTCGTG
A03-7	<i>B. rapa</i>	KBrB057N22	AAAAGCACAGTGTATCACAGTT	ATCAAATTTTGTATGTTGCAGT

报道的 *Tourist-like* 家族中 *BraTo*、*Stowaway-like* 家族中 *Brasto*、*hAT* 以及 *Mutator* 中的各类亚家族特异引物 263 对^[11-12]。利用引物扩增不同油菜的叶片基因组 DNA,调查 MITE 转座导致的多态性。若有多态性,将通过 PCR 产物克隆测序进一步证实。

1.2.2 DNA 提取 DNA 的提取采用 CTAB 法:将大概 1 g 叶片放入预冷的研钵迅速研磨,叶片粉末装入 2 mL 离心管,加入 800 μ L 65℃ 预热的提取

液,充分震荡混匀后 65 ℃ 水浴 40 min,期间每 10~15 min 震荡混匀 1 次,室温放凉,加入 800 μ L 三氯甲烷混匀,摇床摇晃 10 min,离心 10 min (20 ℃, 12 000 g),取上清,小心不要吸到下层杂质,转入新的 1.5 mL 离心管,快速的加入上清 1.5 倍体积的无水乙醇,低速离心 1 min,弃上清,75%乙醇清洗沉淀 2 遍,晾干后将沉淀 DNA 溶于一定量水中-20 ℃ 保存备用。取 5 μ L 用于浓度检测和电泳

检测。

将提取的 DNA 样品,经过 1.2%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,结果在电泳谱带上呈现出相同大小的 DNA 带,说明无 RNA 污染。经测定,提取的 157 份油菜总 DNA 样本, OD_{260}/OD_{280} 为 1.75~1.90,说明得到的 DNA 质量较高,可满足 PCR 实验分析的要求,将其稀释 20 倍后低温保存备用。

1.2.3 PCR 扩增及检测 PCR 反应体系为 10 μ L:10 $\times$ Taq Buffer(Mg²⁺ plus)1 μ L, Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.1 μ L, dNTP Mix (10 mmol/L each) 0.15 μ L, ddH₂O 6.45 μ L,正、反向引物各 0.15 μ L,模板 DNA 2 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 低温保存。PCR 扩增结束后用 1.5%琼脂糖凝胶对

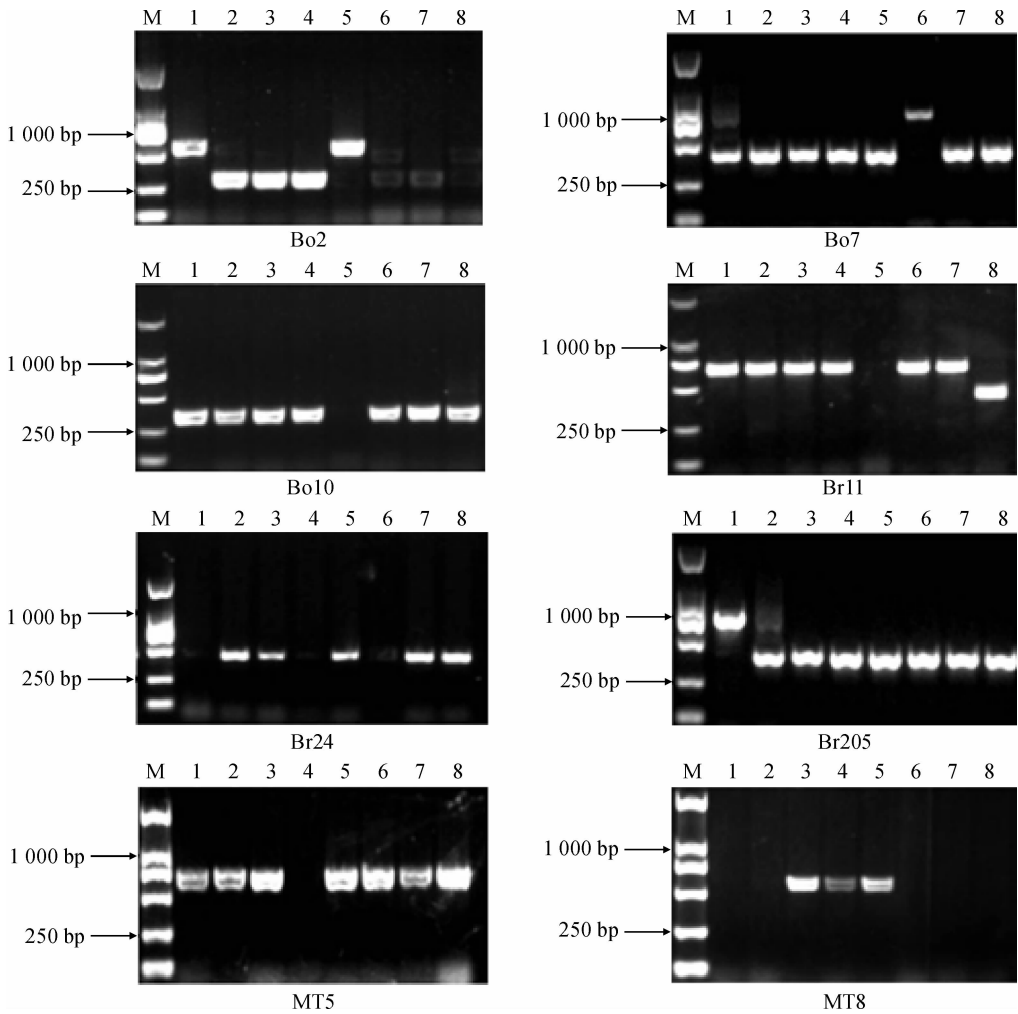
PCR 扩增产物进行电泳检测。

1.2.4 数据分析 扩增产物定性地按照同样长度的片段在各品种中出现的赋值为 1,缺失的赋值为 0,进行统计,建立 1、0 数据矩阵。利用 NTsys-pc2.1 软件,按照非加权平均法(UPGMA)进行聚类分析,构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 MITE 引物多态性的筛选

随机选取 8 份油菜 DNA 作为 PCR 扩增的模板,利用 286 对 MITE 特异引物进行扩增,筛选引物的多态性。琼脂糖凝胶电泳结果共检测到 434 条多态性条带,条带大小在 200~1 000 bp 之间,平均每对引物扩增出 7 条多态性条带,部分多态引物扩增结果见图 1。



M. DL2000;1~8. 部分供试油菜 DNA 样品(分别为 Huayouza6-2、Youyan9-2、Mianxinyou19、Shanyou16、CS03-3、CS25、W01-2、W06-1);Bo2、Bo7、Bo10、Br11、Br24、Br205、MT5、MT8. 引物组合

图 1 筛选引物部分结果凝胶电泳图

M. DL 2000; 1—8. Partial test *B. napus* DNA sample (Huayouza6-2, Youyan9-2, Mianxinyou19, Shanyou16, CS03-3, CS25, W01-2, W06-1); Bo2, Bo7, Bo10, Br11, Br24, Br205, MT5, MT8. Primer combination

Fig. 1 Partial gel electrophoresis of analysis primers

从中筛选出条带清晰、重复性高的多态性引物共 60 对(表 3),多态性比例 21.0%(表 4)。其中,从 130 对 *Stowaway-like* 家族引物中筛选出 32 对多态性较好的引物,多态性比例 24.6%;从 135 对 *Tourist-like* 家族引物中筛选出 27 对多态性较好的引物,多态性比例 20.0%。从 14 对 *hAT* 家族中筛选出 1 对多态引物,但从 *Mutator* 家族中设计的 7 对引物中未筛选出多态引物。

2.2 多态性引物在不同油菜品种间的遗传多样性分析

2.2.1 多态性引物与不同油菜品种组合 PCR 扩增结果 利用筛选出的 60 对 MITEs 引物对 101 个中国油菜、27 个加拿大油菜和 29 个合成油菜种质基因组 DNA 进行 PCR 扩增,分别扩增出 4 029、1 044、1 087 条清晰可辨的多态性条带,部分扩增结果见图 2,多态性比例在 62.5%~66.5%之间(表 5)。从结果中可看出这些引物在这三大类供试材料中的多态性比例处于相似水平,且都具有较高的多

态性。

2.2.2 MITE 转座子在不同油菜品种间的遗传多样性分析 根据筛选出的 60 对多态性 MITE 引物在 101 个中国油菜、27 个加拿大油菜和 29 个合成油菜群体中的插入缺失多态性数据,应用 NTSYS-pc 软件对试验的 157 份材料多态性数据进行了聚类,结果图 3 显示:101 份中国油菜遗传相似系数在 0.59~0.95(图 3,A),平均遗传相似系数为 0.77,在遗传相似系数为 0.71 水平上供试材料被划分为 6 大类群(从上到下),第 I 类由 86 个供试材料组成,第 II 类由 5 个供试材料组成,第 III 类由 7 个供试材料组成,第 IV 类、第 V 类和第 VI 类都为一个材料聚为一类;27 个加拿大油菜遗传相似系数在 0.73~0.95(图 3,B),平均遗传相似系数为 0.84,在遗传相似系数为 0.79 水平上被划分为 4 个类群,第 I 类由 15 个供试材料组成,第 II 类由 2 个供试材料组成,第 III 类由 9 个供试材料组成,第 IV 类只有一个材料被聚为一类;29 个合成油菜遗传相似系数在 0.64~

表 3 60 对多态引物信息
Table 3 The information of 60 pair polymorphic primers

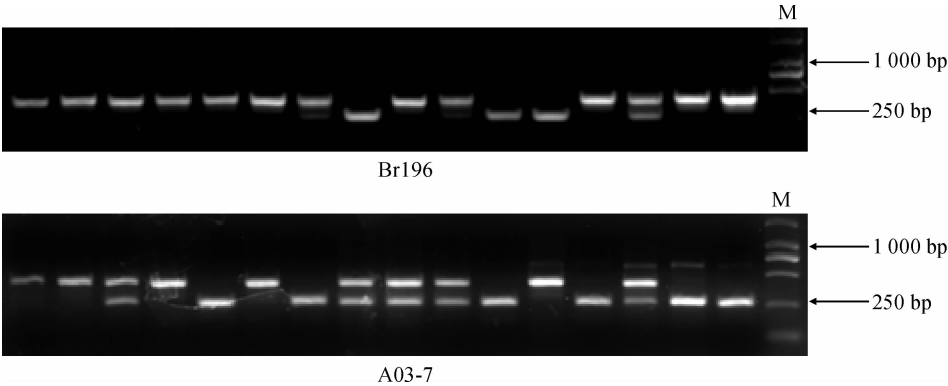
引物名称 Primer name	MITE 家族 MITE family	引物起源 Primer origin	引物序列 Primer (5'→3')	
			上游 Forward	下游 Reverse
Bo221	<i>hAT</i>	<i>B. oleracea</i>	CCATCGGAGGAGTAGCTCTG	GTCCCTTCCCTGTCACAAGA
Bo10	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	TGTGGGGACAAAAGTTGACA	ATGCAAAATCCAAAGGAACG
Bo101	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	CCTTCATCAAGCGATTTTGG	CGCACAAAGAGGACAGTTGA
Bo102	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	AGAGCTTACCACTTGCGCATC	AAAACATATAGGCCCTTGCTTTG
Bo103	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	ATATAGTGGAACATAACATTTGATACG	CAACTGTTTAAATACTACTCCTTCCA
Bo128	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	AAGTGATCGGTGACCAAAGG	TGTGACTGGTGACCATTTGAA
Bo135	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	GACTCTTGCTTCAAAAACGGTA	AATGTGTGGTGTGTGCCAAT
Bo139	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	CAAATTGCCCTTCCACTGGTT	CAGATTCCCAAAATGGGTTG
Bo15	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	ACGATACACCGAGCATTTGA	ACCAAAAGTTGCTTGCATCC
Bo157	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	GCAGGCTCGGTTGAACTTAT	GATCCGTCCCAGACCTATTG
Bo159	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	TCTCTCCGTTCTAATGAAATACTCC	TCGGAACATCAACATTTCTTAAA
Bo16	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	CGGGATTACCGACAGTAGA	AAGAAACGACTTCGGCTACG
Bo2	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	GGCGAATAATCGATTGGGTA	AGCGAACAAGCTGACTCTGAC
Bo21	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	GGGAAGCTTCGAGGAAAAAC	TCGAACCGAAAAATCCAGAG
Bo22	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	ATCGGGCAGTGCAAAATACT	ATGCCCCAAGATGGATACAG
Bo5	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	GCTTGGTGTGCTTCTCATCA	CAGAGAAAGGGAGAAAAATGGA
Bo6	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	GCAGAAATCTCCATCCCAAG	CCTTGACCACCATTTCCAAC
Bo7	<i>Stowaway</i>	<i>B. oleracea</i>	GCTCGGGTAGCTTTATTGAGG	TCCAAGCGTTGAAAGAAGAA
Br1	<i>Stowaway</i>	<i>B. rapa</i>	TGCGCAACTGATTTGAAGAC	CACCACTGCCTCAAAAACAA
Br102	<i>Stowaway</i>	<i>B. rapa</i>	TTCAACCTTTTTCTTTCAAACG	GGCGAAGAAGAGTGAGATG
Br11	<i>Stowaway</i>	<i>B. rapa</i>	CTTGAGCGGTGTGAATTTTG	GATTTGTGCTCCGATGGAT

续表 3 Continued Table 3				
引物名称 Primer name	MITE 家族 MITE family	引物起源 Primer origin	引物序列 Primer (5'→3')	
			上游 Forward	下游 Reverse
Br111	Stowaway	B. rapa	CCATGTCGTGGATCTCTATGAA	CTAAAGCTACCGGGTCATGC
Br12	Stowaway	B. rapa	GATACCGGGAGGAATCGAA	GCTCCGTCATCTTCCTCATT
Br130	Stowaway	B. rapa	TGGTGTGAGAGGAGAAGAACAA	CTCATAGCCACAGGAAGGTTG
Br147	Stowaway	B. rapa	CCCCATCAACGTCAAGAACT	ACAGGGCTGATGCTTCTGTT
Br16	Stowaway	B. rapa	CCCCATCAACGTCAAGAACT	ACAGGGCTGATGCTTCTGTT
Br166	Stowaway	B. rapa	TCATAATTGTCTTAAACCATGTCG	AACGTAAGTGGGCCTGAGAA
Br17	Stowaway	B. rapa	TAAAGGGACCACCACGACTT	AGATTCCGATTTGGTTCAGA
Br173	Stowaway	B. rapa	ATCCTGTTCATCGCGAAGTTT	GATGGGAATCAAGAATCAAGC
Br21	Stowaway	B. rapa	TGTGATTTCTCGAGCGTTTG	TGGGAATGAAACAGAGAGCA
Br23	Stowaway	B. rapa	CTGCATTCCCGTAGTGATT	AAAATGTATCCGCCACGAC
Br24	Stowaway	B. rapa	ATTCTGGCGTTTGCTGTTTT	CGTGTATCTCCGACAACCTG
Br8	Stowaway	B. rapa	GAGACCGTTTTGGCATGTTT	ATCGTGAAGAACGCAATGAA
Bo178	Tourist	B. oleracea	TGAGAACATTTCCAACCCATAA	TCTCCATCAGCAAACGAGAA
Bo179	Tourist	B. oleracea	GGCGTGTTCAAAACACAATC	AGACAAATGCGAGTACCGAAG
Bo184	Tourist	B. oleracea	CCAACCGCATAAACCTTAGC	TGGAGATGCTCTGAAGCACA
Bo187	Tourist	B. oleracea	TTCAAGGTAACCTGCCTCGAT	AATACACCGTCGGAGAATGC
Bo190	Tourist	B. oleracea	GGCTTGAGGAGTCCCATACA	AGCCACACCGTATAGTTCG
Bo197	Tourist	B. oleracea	CAATGGTTTGATCCCTATGTCA	GCCAAGGGGATGTTATTCAA
Bo201	Tourist	B. oleracea	CGAATCAGTGGTTCATGCTC	CATCAGGGCCACTGAAATTA
Bo206	Tourist	B. oleracea	GGGTCCTTTTAGCGAGGAC	ATGATAGGCTTTGGGTGCTG
Bo215	Tourist	B. oleracea	AGTCTAGCTTCGCCCTCTGA	GAGAGAGCGATTTAGGCATGT
Br177	Tourist	B. rapa	AGGAGCGTCTCTGCTCTCAG	TCGTCGTTGTATTTCCAAGC
Br196	Tourist	B. rapa	CTCGGAGATGGTTCGACATT	CTTCCTTTGCATCGCAATAA
Br199	Tourist	B. rapa	TCATTATGAACGGACGTGGA	CGAATCTTTGATTTTCGACACTTC
Br202	Tourist	B. rapa	TCACTTCACATAAAAAAGTGAAAATCT	TTGCAACTGCATCCAAGAAC
Br205	Tourist	B. rapa	CGGCTTTAAACAGGTAGCC	CCAGTAACTTCCGTCCCTGA
Br218	Tourist	B. rapa	AGAAACATTGGCGACGAAAT	TCCAAACTTTATTTAGCGTTATTGG
Br220	Tourist	B. rapa	CCAATTTGTTTCGTTTGATGC	CAGAAGGTGTCGGTCCAAAT
Br231	Tourist	B. rapa	CCAAGAGGACATTCCAACCT	CCATCATTTAGGGGATTAAAGG
Br232	Tourist	B. rapa	CCTTTGTTGATTCTTCTTTTGC	CGAAAGCTGACTGGGCTAAC
Br245	Tourist	B. rapa	AAATTTAGGCCAGACAGTCC	AGGCTGAAGAACAATATGCTTT
MT10	Tourist	B. rapa	CACCTATGCCAATCAAATGAAC	CCCTATCCAAACTATCCGAAAC
MT13	Tourist	B. rapa	GCCGTAAATGTTTAGCTG	ATTGGAGGTGATTGGTTGA
MT15	Tourist	B. rapa	CAAGAATTGGTTGGTAGC	AGCAAAAGATGGAGCACT
MT19	Tourist	B. rapa	GTGGAGATTGGAGGATTA	TGGGTATTATTGGGTATTG
MT5	Tourist	B. rapa	GCTGAAAAGGGAAACATAC	AAACCACAACGAGACGATAC
MT8	Tourist	B. rapa	ACGTTCGTTCTTTGGGTT	TCTCGTGAAGGAGGCATT
MT9	Tourist	B. rapa	AGTAAAGCAATGGGAGGAGCAG	TTTGTGCTGATCAAAACGAGAC
A03-7	Tourist	B. rapa	AAAAGCACAGTGTATCACAGTT	ATCAAATTTTGATGTTGCAGT

表 4 286 对引物扩增多态性信息结果

Table 4 The results of amplification polymorphism information with 286 pair primers

MITE 家族 MITE family	引物对数 No. of primer pairs	多态性引物对数 No. of polymorphic primer pairs	多态性比例 Ratio of polymorphic bands/%
<i>Stowaway-like</i>	130	32	24.6
<i>Tourist-like</i>	135	27	20.0
<i>hAT</i>	14	1	7.1
<i>Mutator</i>	7	0	0
总计 Total	286	60	21.0



M. DL2000;引物组合. Br196、A03-7

图 2 多态引物与供试材料的部分凝胶扩增结果

M. DL2000; Primer combination. Br196, A03-7

Fig. 2 Partial gel amplification results of polymorphic primers with tested materials

表 5 PCR 扩增的带型分析

Table 5 Analysis of band patterns produced by PCR

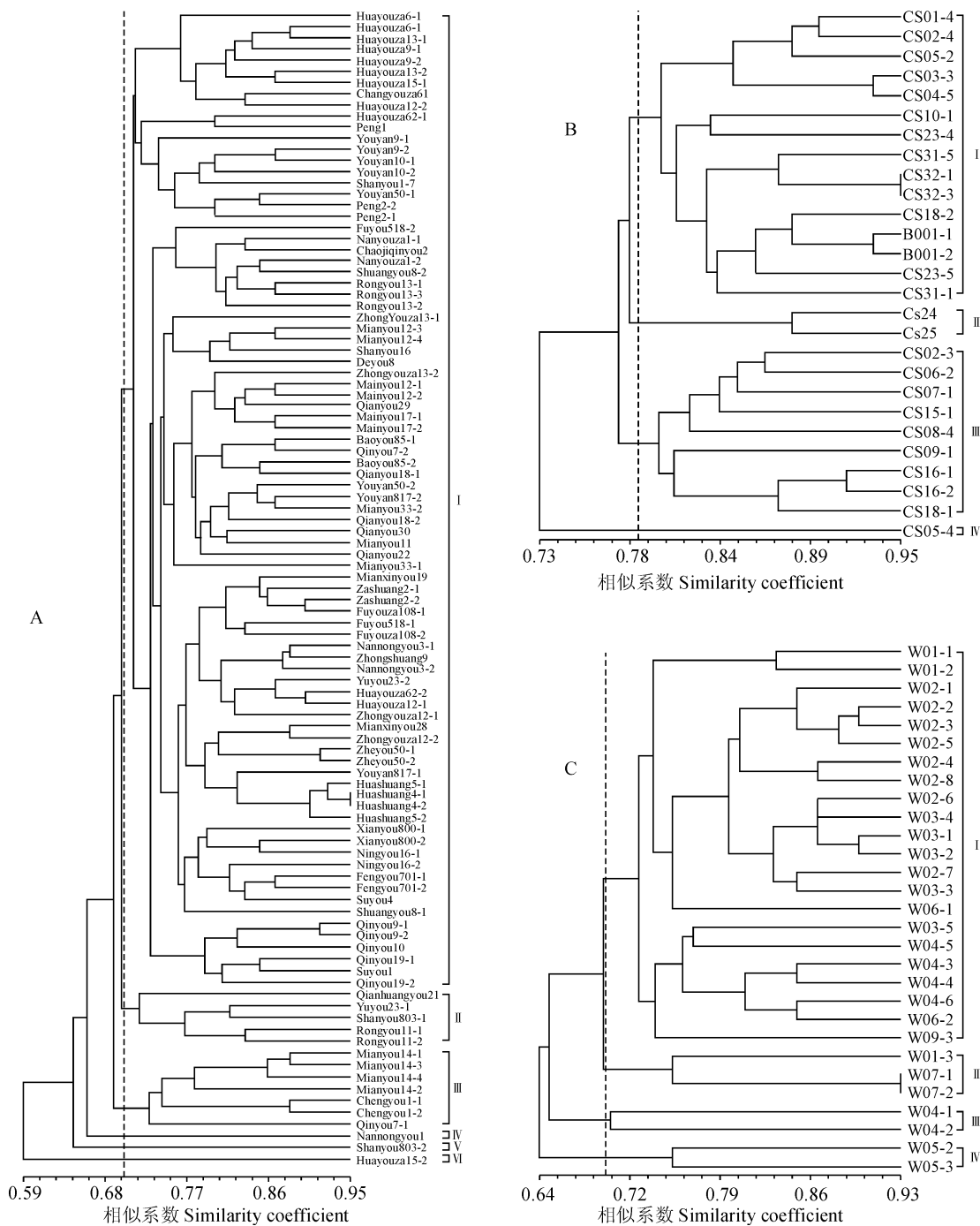
材料 Material	材料个数 NO. of material	总带数 Total No. of bands	多态性带数 NO. of polymorphic bands	多态比例 Ratio of polymorphic bands/%	每个引物产生的多态性带数 NO. of polymorphic bands per assay unit
中国油菜 China	101	6 060	4 029	66.5	67.2
加拿大油菜 Canada	27	1 620	1 044	64.4	17.4
合成油菜 Synthesized	29	1 740	1 087	62.5	37.5

0.93(图 3,C),平均遗传相似系数为 0.79,在遗传相似系数为 0.69 水平上被划分为 4 大类群,第Ⅰ类由 22 个供试材料组成,第Ⅱ类由 3 个供试材料组成,第Ⅲ类由 2 个供试材料组成,第Ⅳ类由 2 个供试材料组成。结果表明 3 个聚类图中显示有部分同一品种多代自交衍生出的不同株系被聚集在不同的遗传类群中,有较远的遗传距离,说明在这些品种经多代自交变异比较快。它们的遗传相似系数变异都在 0.59~0.95 之间,说明这些油菜品种之间存在着丰富的变异和遗传多样性。

3 讨论

非自主性 DNA 类转座子在植物基因组中普遍

存在,这可作为相对快速和低成本开发分子标记的工具。而 MITEs 在基因组中拷贝数众多,易于产生丰富的遗传多样性,更易开发分子标记。同时, MITE 标记通常采用琼脂糖凝胶电泳就能扩增出清晰、稳定并且具有明显差异的条带,因此本研究利用琼脂糖凝胶电泳技术筛选 286 对 MITE 引物的多态性,并分析筛选出的 60 对 MITE 引物的多态性进而发掘其不同油菜品种间的多态性差异。结果表明,在设计 MITE 四个家族的引物中 *Stowaway-like* 家族和 *Tourist-like* 家族的多态性比例近于相似水平,表现出了丰富的多态性,这些多态性可用来开发分子标记,用于品种鉴定、遗传连锁图谱构建以及生物多样性研究;MITE 转座子同物种进化、



A. 中国油菜;B. 加拿大油菜;C. 合成油菜
图3 157份油菜种质资源聚类树状图
A. China; B. Canada; C. Synthesized

Fig. 3 Dendrogram of 157 *B. napus* germplasm resources

基因功能变异有密切的关系,其多态性分析有助于育种学和进化动力学的研究^[23-24]。在 *hAT* 类家族中多态性比例极低, *Mutator* 类家族中没有筛选出多态性的引物,这可能与所选引物有关。

由于 MITE 在不同的家族中扩增模式有差异,且在基因组中大量的随机插入,从而影响基因表达,

形成物种内或种间的多态性。本研究中 157 个油菜品种的平均遗传相似系数变异为 0.80,该聚类结果能较好地反映材料间的亲缘关系。在聚类图中可以看出由于 MITE 转座子的插入,有一部分非姊妹系的品种被聚为一类,也有来源相同油菜品种不同株系的姊妹系品种间分别聚为一类,表现出比较远的

遗传距离,出现较大的遗传变异,说明这些材料在品种间也存在明显的多样性。综合分子标记和聚类分析结果表明,MITE 转座子在油菜中具有丰富的遗传多样性,这与前人在芸薹属植物中的研究结果一致^[11-12],其中遗传多样性最高的是中国油菜,其次是加拿大油菜和合成油菜。因此 MITE 在基因组中的活动为油菜引入了多样性,这也表明了通过对 MITE 家族引物序列与不同地区的油菜种质资源的组合分析分子遗传信息,可以为油菜的育种找到许多尚未被开发的遗传变异,在提高杂交油菜的杂种优势方面也具有极其重要意义。本研究在探索转座子不同家族在国内外以及合成油菜群体中的多态性分布情况做出了初步的判断,为后期的油菜收集、分类以及油菜育种改良提供一定的理论参考数据。

随着研究的深入,越来越多的 MITE 家族将在不同的生物中被发掘,并且转座子在宿主基因中的功能和结构、表达调控机理以及基因组中的扩增机制在不同的物种中被验证,其结构和功能逐渐变得清晰,因此 MITE 不再被认为是基因组中的“垃圾”。同时 MITE 转座子插入多态性与农艺性状紧密相关的研究也多有报道。玉米中 MITE 转座子插入 NAC 基因启动子区后,显著提高了玉米苗期的抗旱能力^[25]。李静婷等^[26]研究发现,在对小麦高温、低温处理时,具有 MITE 插入的基因型中

sHSP16.9 转录水平较无 MITE 插入的基因型显著提高,表明 MITE 可能在植物耐热性、耐冷性方面发挥重要作用。Patel 等^[17]发现,在花生 *ah-FAD2B* 基因编码区插入 MITE 转座子,提高了花生的含油量。在油菜中,MITE 转座子插入 *Bn-FLC.A10* 启动子区后,使油菜获得了春化需求^[27]。水稻中调控重要农艺性状(如粒数、株高、抽穗期等)的关键基因-CCT 基因家族成员 *Ghd2* 的 3'-UTR 区域嵌入 *stowaway-like* MITE 后,其蛋白质翻译水平受到抑制^[28]。Morata 等^[29]的研究结果表明,MITE 转座子能将新的基因重新连接到负责重要适应性的转录调控网络和育种特性中,如应激反应、开花时间或果实成熟等。上述结果都表明了利用 MITE 转座子的多态特性可以改良作物农艺性状,提高优良品系选育的效率。

MITE 在真核生物基因组中广泛存在,且大量的 MITE 拷贝使它们成为多态性的重要来源^[30]。本研究中 MITE 转座子在不同的油菜品种的表现是多元化的,这也为将来的 MITE 插入引起的新功能的基因鉴定以及分子育种提供有用的资源,值得进一步探索研究,由于多数的转座子在生物基因组中变化大、拷贝数较多的特点^[31],因此也在将来全基因组的鉴定工作中对发现新的 MITE 转座子及其探究更多的功能带来新的机遇和可能。

参考文献:

[1] BUREAU T E, WESSLER S R. Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes[J]. *Plant Cell*, 1992,**4**(10): 1 283-1 294.

[2] BUREAU T E, WESSLER S R. Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants[J]. *Plant Cell*, 1994,**6**(6): 907-916.

[3] FESCHOTTE C, MOUCHES C. Evidence that a family of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) from the *Arabidopsis thaliana* genome has Arisen from a po-go-like DNA Transposon[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000,**17**(5): 730-737.

[4] TU Z. Eight novel families of miniature inverted repeat transposable elements in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. *Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America*, 2001,**98**(4): 1 699-1 704.

[5] JIANG N, FESCHOTTE C, ZHANG X, *et al.* Using rice to

understand the origin and amplification of miniature inverted repeat transposable elements (MITEs)[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004,**7**(2): 115-119.

[6] OKI N, YANO K, OKUMOTO Y, *et al.* A genome-wide view of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in rice, *Oryza sativa* ssp. *japonica*[J]. *Genes & Genetic Systems*, 2008,**83**(4): 321-329.

[7] JITTIMA P, KING J I, ALAN C. A family of human MicroRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements[J]. *PLoS One*, 2007,**2**(2): e203.

[8] FESCHOTTE C, JIANG N, WESSLER S R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2002,**3**(5): 329-341.

[9] WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2007,**8**(12): 973-982.

[10] LU C, CHEN J, ZHANG Y, *et al.* Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) have been accumulated through amplification bursts and play important roles in gene

expression and species diversity in *Oryza sativa*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012,**29**(3): 1 005-1 017.

[11] SAMPATH P, LEE S C, LEE J, *et al.* Characterization of a new high copy Stowaway family MITE, BRAMI-1 in Brassica genome[J]. *BMC Plant Biology*, 2013,**13**(1): 56.

[12] SAMPATH P, MURUKARTHICK J, IZZAH N K, *et al.* Correction: genome-wide comparative analysis of 20 miniature inverted-repeat transposable element families in *Brassica rapa* and *B. oleracea*[J]. *PLoS One*, 2014,**9**(7): e103757.

[13] ZHOU M, CHEN A, ZHOU Q, *et al.* A moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) miniature inverted-repeat transposable element (MITE): the possible role of a suppressor[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2017,**13**(6): 129.

[14] HU T T, PATTYN P, BAKKER E G, *et al.* The Arabidopsis lyrata genome sequence and the basis of rapid genome size change[J]. *Nature Genetics*, 2011,**43**(5): 476-481.

[15] PATERSON A H, BOWERS J E, REMY B, *et al.* The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses[J]. *Nature*, 2009,**457**(7 229): 551-556.

[16] SLOTKIN R K, MARTIENSSEN R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2007,**8**(4): 272-285.

[17] PATEL M, JUNG S, MOORE K, *et al.* High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the FAD2 gene [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, **108** (8): 1 492-1 502.

[18] 韩民锦. 家蚕 MITE 转座子的鉴定、进化和功能以及家蚕转座子的进化动力学研究[D]. 重庆:西南大学, 2013.

[19] NAITO K, CHO E, YANG G, *et al.* Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication [J]. *Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America*, 2006,**103**(47): 17 620-17 625.

[20] MONDEN Y, NAITO K, OKUMOTO Y, *et al.* High potential of a transposon mPing as a marker system in japonica x japonica cross in rice[J]. *DNA Research*, 2009, **16** (2): 131-140.

[21] ROFFLER S, WICKER T. Genome-wide comparison of Asian and African rice reveals high recent activity of DNA transposons[J]. *Mobile DNA*, 2015,**6**(1): 8.

[22] NOUROZ F, NOREEN S, HESLOP-HARRISON J S. Evolutionary genomics of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in Brassica[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015,**290**(6): 2 297-2 312.

[23] CASA A M, BROUWER C, NAGEL A, *et al.* The MITE family Heartbreaker (Hbr): Molecular markers in maize[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000,**97** (18): 10 083-10 089.

[24] LYONS M, CARDLE L, ROSTOKS N, *et al.* Isolation, analysis and marker utility of novel miniature inverted repeat transposable elements from the barley genome[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008,**280**(4): 275-285.

[25] MAO H, WANG H, LIU S, *et al.* A transposable element in a NAC gene is associated with drought tolerance in maize seedlings[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8 326.

[26] 李静婷, 王健胜, 杨风岭. 小麦 MITE 转座子对 sHSP 基因的表达调控研究[J]. 江苏农业科学, 2015,**43**(12): 29-32.

[27] JINNA H, YAN L, HARSH R, *et al.* A Tourist-like MITE insertion in the upstream region of the BnFLC. A10 gene is associated with vernalization requirement in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2012,**12**(1): 238-238.

[28] SHEN J, LIU J, XIE K, *et al.* Translational repression by a miniature inverted-repeat transposable element in the 3' untranslated region [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14 651.

[29] MORATA J, MARIN F, PAYET J, *et al.* Plant lineage-specific amplification of transcription factor binding motifs by miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) [J]. *Genome Biology & Evolution*, 2018, **10** (5): 1 210-1 220.

[30] KUMAR A, HIROCHIKA H. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology[J]. *Trends in Plant Science*, 2001,6: 127-134.

[31] 卢 辰. 微小反向重复转座子(MITE)对水稻基因表达和基因组分化的作用及番茄特有 miRNA 基因的演化[D]. 武汉:华中农业大学, 2013.

(编辑:宋亚珍)