

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.09.006

火龙果 MSAP 体系的优化及 组培苗 DNA 甲基化检测^①

刘鹏飞¹, 乔光¹, 刘涛²,
彭志军², 蔡永强², 文晓鹏¹

1. 贵州大学 农业生物工程研究院山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025;
2. 贵州省果树科学研究所, 贵阳 550006

摘要: 以火龙果组培苗为材料, 采用正交实验设计, 优化了适用于火龙果的 MSAP 体系. 结果表明, 基因组 DNA 约 300 ng, 采用 *EcoR* I 10 U 和 *Msp* I/*Hpa* II 2.5 U 两步酶切法, 酶切较充分; 使用 20 μ L 预扩增体系, 含酶连产物 1.0 μ L, Mix 10 μ L, 上下游引物 E+A/HM+T 各 2.0 μ L; 选择性扩增反应体系 20 μ L, 含稀释 50 倍的预扩增产物 3.0 μ L, Mix 5 μ L, 上下游引物 E+ANN/HM+TNN 各 2.0 μ L. 选用 17 对引物检测发现, 组培苗 CCGG 位点的甲基化程度约为 24%, 平均多态性比率为 1.8%, 表明火龙果组培苗在短期无性系繁殖中, 存在一定程度的 DNA 甲基化差异.

关键词: 火龙果; 组培苗; MSAP; DNA 甲基化

中图分类号: Q343.1; S667.9

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)09-0034-07

DNA 甲基化作为最重要的表观遗传学现象之一, 在调控基因表达, 抵御外来入侵 DNA、转座子元件以及转基因沉默从而维持基因组稳定等方面具有重要作用^[1]. 在植物的正常生长发育过程中, DNA 甲基化水平与模式的改变会对植物的代谢、花期、植株形态等产生重要影响^[2], 通过研究植物基因组甲基化位点变化, 分离相关基因, 探索植物生长、发育、代谢调控机理, 揭示植物表观遗传调控机制, 对植物的改良、育种具有重要意义. 作为一种分子标记, DNA 甲基化也可用于检测表观遗传变异、进行种质资源评估等, 通过研究植物遗传多样性, 区分不同种质资源, 进而推测其进化关系. 对变异品种的辅助筛选将有助于种质资源开发, 而在遗传关系检测、杂种优势分析等方面 DNA 甲基化也有应用^[3].

MSAP(methylation-sensitive amplification polymorphism)技术最初由 Reyna-López^[4]建立, 因其操作简便、可靠性高等特点, 已被广泛用于植物发育调控、逆境胁迫、体细胞无性系变异等方面 DNA 甲基化模式变化的研究^[5-7]. 火龙果(*Hylocereus undatus*)为仙人掌科(Cactaceae)量天尺属(*Hylocereus*)植物, 原产于拉丁美洲地区, 因营养丰富, 具有较高的经济价值^[8], 已在我国南方部分省份广泛种植. 前期工作表明, 火龙果组培苗存在高频率的体细胞变异. 本研究拟以火龙果组培苗为材料, 利用正交设计建立和优化火龙果的 MSAP 检测体系, 为表观遗传分析奠定技术基础.

① 收稿日期: 2015-04-23

基金项目: 国家自然科学基金(31560549); 贵州省留学人员科技活动项目(2014-04); 贵州大学研究生创新基金(研农 2014020).

作者简介: 刘鹏飞(1988-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事分子遗传的研究.

通信作者: 文晓鹏, 教授.

1 材料与方 法

1.1 材 料

以贵州地方品种紫红龙 (*Hylocereus undatus* ‘Zihonglong’) 组培苗为材料, 优化适用于火龙果的 MSAP 体系, 并检测组培苗 DNA 甲基化水平. 实验材料为切取幼嫩茎尖约 1~2 cm, 继代约 3 个月后, 达到稳定生长期的组培苗.

1.2 基因组 DNA 提取

以组培苗幼茎为材料, 利用 Plant Genomic DNA Kit(DP305-03, 天根生化科技有限公司)提取基因组 DNA, BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪(Eppendorf)测定基因组 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值, 用于计算 DNA 纯度和浓度; 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 质量(120 V, 20~30 min), DNA 保存于 -20 °C 备用.

1.3 MSAP 体系建立

酶切连接体系: 用 *EcoR* I 和 *Msp* I/*Hpa* II(Fermentas), 通过两步法对基因组 DNA 进行双酶切. 第一步为 *EcoR* I 酶切, 采用 300 ng 基因组 DNA, 1.0 μ L *EcoR* I(10 U/ μ L), 4.0 μ L 10 \times Buffer *EcoR* I, ddH₂O 补足至 40 μ L, 混匀后于 37 °C 酶切 4 h; 第二步为 *Msp* I/*Hpa* II 酶切, 采用 10 μ L *EcoR* I 酶切产物, 0.25 μ L *Msp* I or *Hpa* II(10 U/ μ L), 2.0 μ L 10 \times Buffer Tango, ddH₂O 补足至 20 μ L, 混匀后 37 °C 酶切 5 h. 然后, 取 5.0 μ L 酶切产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 以确定酶切是否完全. 接着取双酶切产物 20 μ L, 加入 0.5 μ L T4 DNA Ligase(5 U/ μ L), 3.0 μ L 10 \times T4 DNA Ligase buffer, 10 pmol/ μ L *EcoR* I 接头和 50 pmol/ μ L *Msp* I/*Hpa* II 接头(表 1)各 1.0 μ L, 以双蒸水补足 30 μ L, 22 °C 连接反应 5 h, -20 °C 保存备用.

预扩增反应体系: 为得到最佳预扩增反应体系, 对模板 DNA、2 \times Taq PCR MasterMix(天根生化科技有限公司)用量、引物 E+A/HM+T(表 1)3 个因素的最佳水平, 采用 L9(3⁴)正交试验, 各因素体积水平见表 2. 预扩增程序为 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min. 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测. 扩增产物置于 -20 °C 冰箱保存备用.

选择性扩增体系: 选择性扩增体系中模板 DNA、2 \times Taq PCR MasterMix 用量、引物 E+ANN/HM+TNN(表 1)3 个因素仍采用正交 L9(3⁴)进行试验, 各因素体积水平见表 3. 选择性扩增程序为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 以后每轮循环退火温度递减 0.7 °C, 直至 56 °C (12 个循环); 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min(27 个循环); 72 °C 延伸 10 min. 取 3 μ L 扩增产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染参考梁宏伟等人^[9]的方法进行.

表 1 MSAP 接头及引物序列

接头/引物	序列(5'-3')	接头/引物	序列(5'-3')
E I	CTCGTAGACTGCGTACC	HM I	GACGATGAGTCCTGAG
E II	AATTGGTACGCAGTC	HM II	CGCTCAGGACTCAT
E+A	GTAGACTGCGTACCAATTCA		
HM+T	GAGTCCTGAGCGGT		
E P1	GTAGACTGCGTACCAATTCAAG	HM P1	GAGTCCTGAGCGGTCA
E P2	GTAGACTGCGTACCAATTCACA	HM P2	GAGTCCTGAGCGGTCC
E P3	GTAGACTGCGTACCAATTCAC	HM P3	GAGTCCTGAGCGGTCT
E P4	GTAGACTGCGTACCAATTCACC	HM P4	GAGTCCTGAGCGGTAC
E P5	GTAGACTGCGTACCAATTCACG	HM P5	GAGTCCTGAGCGGTGG
E P6	GTAGACTGCGTACCAATTCAGC	HM P6	GAGTCCTGAGCGGTGA
E P7	GTAGACTGCGTACCAATTC AAC	HM P7	GAGTCCTGAGCGGTAG
E P8	GTAGACTGCGTACCAATTCAGA	HM P8	GAGTCCTGAGCGGTTA
E P9	GTAGACTGCGTACCAATTC AAT	HM P9	GAGTCCTGAGCGGTGT

表 2 火龙果 MSAP 预扩增反应各因素体积水平

水平	模板 DNA	2×Taq PCR MasterMix	引物	μL
1	1.0	5.0	1.0	
2	1.5	7.5	1.5	
3	2.0	10.0	2.0	

表 3 火龙果 MSAP 选择性扩增反应各因素体积水平

水平	模板 DNA	2×Taq PCR MasterMix	引物	μL
1	2.0	5.0	1.0	
2	3.0	7.5	1.5	
3	4.0	10.0	2.0	

1.4 组培苗 DNA 甲基化水平检测

对已有的 81 对选择性扩增引物进行筛选, 选择条带数量多、清晰、重复性好的引物共 17 对, 对本实验室保存的火龙果组培苗进行了初步的 DNA 甲基化检测, 以验证本实验 MSAP 体系的可靠性并初步分析火龙果组培苗 DNA 甲基化水平及变异情况。

1.5 数据统计与分析

只对清晰、重复性好、能明显分辨的条带进行统计, 对每一个单株来说, 有条带记为“1”, 没有条带记为“0”, 以利于后续计算。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 质量检测

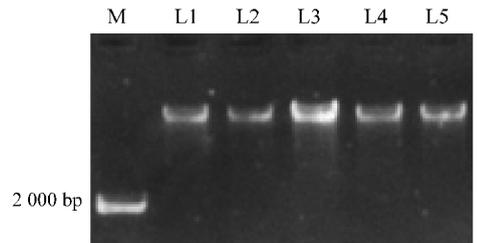
结果显示, 提取的基因组 DNA 带型较好, 无点样孔残留, 泳道清晰(图 1)。经检测, OD 260/OD 280 值大多在 1.75~1.85 之间, 说明提取的 DNA 质量好、纯度较高, 满足 MSAP 实验要求。

2.2 酶切和预扩增反应

用 *EcoR* I 和 *Msp* I/*Hpa* II 两步酶切法酶切基因组 DNA, 经检测, 在 3~5 h 均可以达到较好的酶切效果, 本实验选用 5 h 为最佳酶切时间。在预扩增的 9 个处理组合中, 模板 DNA, 2×Taq PCR MasterMix 用量、引物 3 个因素浓度不同, PCR 扩增结果存在明显差异(图 2)。处理泳道 1, 6, 8 由于 Mix 过少, 扩增产物相对较少, 处理泳道 3, 5, 7 扩增产物相对较多, 但处理泳道 7 由于引物过少, 得到的片段偏大, 而处理泳道 3 条带最亮的区域集中在 100~1 000 bp 范围内, 且在 700 bp 附近能看到明显的主带。故本实验以采用第 3 体系, 即 20 μL 反应体系中, 模板 DNA 1.0 μL, 2×Taq PCR MasterMix 10 μL, 上下游引物 E+A/HM+T 各 2.0 μL 为最佳预扩增反应体系。

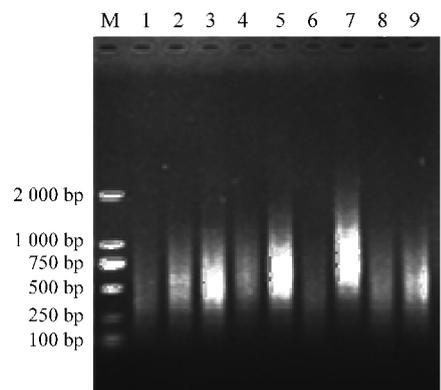
2.3 选择性扩增反应体系

取预扩增产物稀释 100 倍, 依表 3 进行选择性的扩增, 扩增引物为 E P2/HM P3。9 个选择性扩增处理的 PCR 扩增结果存在明显差异(图 3), 其中处理 6 的条带相对较为清晰, 易于分辨。故处理 6 为本实验选择性扩增最佳反应体系, 即 20 μL 反应体系中, 模板 DNA



M: DL 2000; L1-L5: 组培苗的 5 个单株

图 1 火龙果茎基因组 DNA

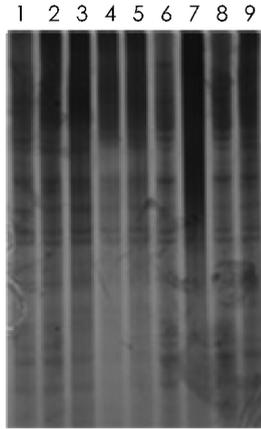


M: DL 2000; 1-9: 正交试验中 1-9 处理

图 2 正交优化预扩增产物电泳图谱

3.0 μL , $2\times\text{Taq PCR MasterMix}$ 5 μL , 上下游引物 E+ANN/HM+TNN 各 2.0 μL 为最佳选择性扩增反应体系。

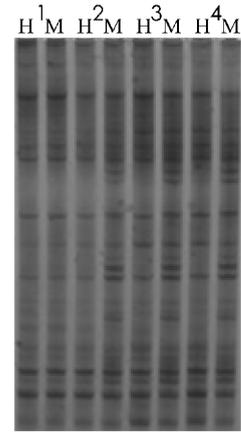
预扩增产物稀释倍数的影响: 预扩增产物分别经稀释 10, 20, 50 和 100 倍后用于选择性扩增, 扩增引物为 E P2/HM P4(图 4)。随着稀释倍数的增加条带越清晰整齐, 尤以 50 倍时得到的条带最为清晰。所以, 本实验采用预扩产物稀释 50 倍(处理 3)进行选择选择性扩增。



1—9: 正交试验中 1—9 处理。

图 3 正交优化选择性

扩增产物电泳图谱(6% PAGE)



1—4 分别代表稀释 10, 20, 50 和 100 倍的预扩增产物;

H 代表 *EcoR* I/*Hpa* II 酶切组合; M 代表 *EcoR* I/*Msp* I 酶切组合。

图 4 预扩增产物不同

稀释倍数扩增产物电泳图谱(6% PAGE)

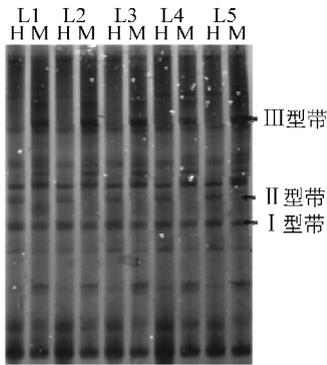
2.4 火龙果组培苗 DNA 甲基化水平检测

对 5 个火龙果组培苗单株进行甲基化水平检测, 以验证本实验 MSAP 体系的可靠性。利用 17 对引物, 总共扩增得到 533~536 条带(表 4), 平均每对引物 31.3~31.5 条带, 引物 E P5/HM P3 扩增条带数最多, 为 44 条, 引物 E P2/HM P8 扩增条带数最少, 为 15 条。火龙果组培苗 5 个单株的 DNA 甲基化水平见表 4, 其中, I 型带 406 条, II 型带 115~118 条, III 型带 11~13 条, I 型带(H 和 M 均有)表示 CCGG 位点未甲基化或内部胞嘧啶半甲基化, II 型带(H 有 M 无)表示 CCGG 位点外部胞嘧啶半甲基化, III 型带(H 无 M 有)表示 CCGG 位点内部胞嘧啶全甲基化, 部分选扩产物电泳图谱见图 5。火龙果组培苗 CCGG 位点总甲基化比率约为 24%(II+III/I+II+III), 其中内部胞嘧啶全甲基化比率为 21.6%~22.1%(III/I+II+III)明显高于外部胞嘧啶半甲基化比率 2.1%~2.1%(II/I+II+III); 引物对 E P3/HM P7 和 E P2/HM P9 显示的甲基化多态性带最多, 为 2 条, 有 13 对引物未显示有甲基化多态性。 P 为多态性比率(P = 甲基化多态性带数/总带数), P 值(0~100%)显示甲基化多态性的高低, 在各单株间, 当甲基化模式发生改变时, 称之为一个甲基化多态性位点(图 6)。本试验中引物 P 值最低为 0, 即未显示有甲基化多态性, 最高为 15.4%(E P3/HM P7), 平均 P 值为 1.8%。

表 4 组培苗 5 个单株的 DNA 甲基化水平

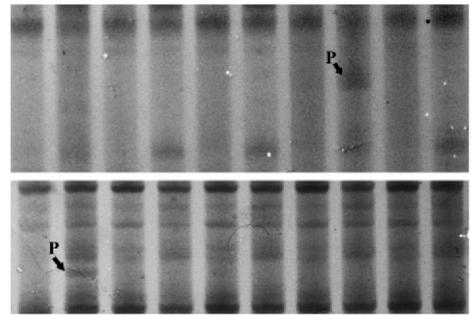
编号	I 型带	II 型带比率/%	III 型带比率/%	总条带	甲基化水平/%
L1	406	11(2.1)	118(22.1)	535	24.1
L2	406	13(2.4)	117(21.8)	536	24.3
L3	406	13(2.4)	117(21.8)	536	24.3
L4	406	12(2.3)	115(21.6)	533	23.8
L5	406	12(2.2)	117(21.9)	535	24.1

注: II 型带代表(1, 0)位点, 即 CCGG 外胞嘧啶半甲基化形式; III 型带代表(0, 1), 即 CCGG 内胞嘧啶全甲基化形式; I 型带代表(1, 1)位点, 即 CCGG 未甲基化或内胞嘧啶半甲基化形式。



L1—L5: 组培苗的 5 个单株.

图 5 不同单株甲基化检测电泳图谱 (E P2/HM P8)



P: 甲基化多态性位点.

图 6 选择性扩增电泳图谱

3 讨论

3.1 MSAP 体系的优化

MSAP 分子标记是在 AFLP 基础上建立起来的一种用于全基因组甲基化水平检测的技术^[4], 被认为是一种有效的、方便的检测全基因组 CCGG 位点甲基化水平的手段. 同 AFLP 体系一样, 高质量的基因组 DNA 的获取是整个实验的基础和关键^[10], 植物基因组中含有的多糖、酚类、色素等物质会影响后续的酶切反应^[11], 而 DNA 浓度对实验结果的影响较小. 本实验采用试剂盒提取 DNA, 方便且省时, 从电泳图片及后期实验结果来看, 用试剂盒提取的 DNA 纯度较高, 质量较好, 浓度适宜, 完全能够满足后续试验的需要.

基因组 DNA 经两步酶解后, 酶切结果较好, 酶切不完全会使基因组上的酶切位点不能充分检出, 影响实验的准确性. 整个 PCR 扩增实验采用天根公司 $2 \times$ Taq PCR MasterMix, 经过反复多次试验, 利用 Mix 扩增得到的结果清晰、可靠、重复性好, 可满足 MSAP 实验的需要. 褚会娟等人^[12]对丹参 MSAP 分子标记体系的优化表明, 预扩增 PCR 反应中, Taq 酶、dNTPs、 Mg^{2+} 、模板 DNA 和引物 5 个因素都会对结果产生明显影响. 前期多次实验表明, 当 PCR 体系中 Mix 过多或引物较少时, 扩增得到的片段较大, 说明 Mix 和引物浓度是影响扩增实验的最主要因素, 模板浓度对 PCR 的影响相对较小, 而预扩增稀释倍数则会影响选择性扩增条带的清晰度. 从整个 PCR 结果及多次重复试验表明, 利用此方法建立的 MSAP 体系条带清晰、结果稳定、重复性好, 适用于火龙果基因组 DNA 甲基化水平的检测.

3.2 火龙果组培苗 DNA 甲基化水平检测

目前, 火龙果品种培育主要通过实生苗及芽变选种^[13], ISSR 分子标记的应用为品种鉴定与选育提供了重要的理论依据和检测手段. DNA 甲基化在维持基因组稳定, 调控基因表达以保证植物正常生长发育过程中具有重要作用^[1], 而且在植物亲远源杂交^[14], 抗逆境胁迫反应中^[15], 都检测到 DNA 甲基化的广泛改变. 因此, 对植物不同组织细胞、不同发育时期和生活环境以及遗传过程中 DNA 甲基化变化的研究, 对揭示植物遗传与生长发育的表观遗传调控机制具有重要意义, 对作物育种具有重要的理论指导意义. ISSR^[16-17], AFLP^[18]等技术作为一种遗传变异的检测手段已被广泛应用, 而 MSAP 则是以 AFLP 为基础发展而来的一种全基因组 DNA 甲基化检测技术. 作为一种有效的、方便的检测全基因组 CCGG 位点甲基化水平的手段, MSAP 技术已被广泛应用于拟南芥、水稻、小麦、棉花、葡萄、烟草等多种植物资源的全基因组甲基化水平的检测^[19].

本实验对随机选取的 5 个火龙果组培苗无性系单株进行了甲基化水平检测, 结果表明, 火龙果组培苗的 CCGG 位点的甲基化程度约为 24%, 主要以内部胞嘧啶全甲基化的形式存在, 这一比例要高于一些高等植物中 CCGG 位点的甲基化比率, 例如脐橙 (4.7%~15.0%)、水稻 (16.3%)、葡萄 (12.0%~20.0%)

等^[19,20-21],而不同生态型的拟南芥中,DNA 甲基化比率则高达 35.0%~43.0%^[22].在 5 个单株的 MSAP 检测结果中,总共得到 6 个多态性位点,平均多态性比率为 1.8%,表明火龙果组培苗在短期无性系繁殖中,存在一定程度的 DNA 甲基化差异.

火龙果 MSAP 体系的建立,不仅为火龙果遗传变异的研究提供了一种新的分子标记手段,有利于火龙果种质资源的鉴定与保存;同时,为今后深入展开火龙果表观遗传变异研究和种质资源多样性评价奠定了技术基础,为品种改良、新种质培育提供了新的途径和理论思路.

参考文献:

- [1] BENDER J. DNA Methylation and Epigenetics [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 41-68.
- [2] MARTIENSSEN R, COLOT V. DNA Methylation and Epigenetic Inheritance in Plants and Filamentous Fungi [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1070-1074.
- [3] 李卫国,常天俊,龚红梅. MSAP 技术及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. *生物技术*, 2008, 18(1): 83-87.
- [4] REYNA-LÓPEZ G E, SIMPSON J, RUIZ-HERRERA J. Differences in DNA Methylation Patterns are Detectable During the Dimorphic Transition of Fungi by Amplification of Restriction Polymorphism [J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 253: 703-710.
- [5] 陆光远,伍晓明,陈碧云,等. 油菜种子萌发过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. *科学通报*, 2005, 50(24): 2750-2756.
- [6] 李雪林,林忠旭,聂以春,等. 盐胁迫下棉花基因组 DNA 表观遗传变化的 MSAP 分析 [J]. *作物学报*, 2009, 35(4): 588-596.
- [7] ALISON L, CALUM R. Comparative Assessment of Genetic and Epigenetic Variation Among Regenerants of Potato (*Solanum tuberosum*) Derived from Long-Term Nodal Tissue-Culture and Cell Selection [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(4): 631-639.
- [8] 谢国芳,周俊良,韩秀梅,等. 火龙果营养研究及开发现状 [J]. *食品工业*. 2013, 34(6): 171-173.
- [9] 梁宏伟,王长忠,李忠,等. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立 [J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1379-1382.
- [10] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M. AFLP: a New Technique for DNA Fingerprinting [J]. *Nucleic acids res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [11] 张鹏远. 云南大理地区不同地域环境下烟草基因组甲基化的 MSAP 分析 [D]. 昆明: 云南大学, 2012.
- [12] 褚会娟,张今今,王品,等. 丹参 MSAP 分子标记技术体系的优化及其应用 [J]. *西北植物学报*, 2011, 31(5): 920-928.
- [13] 袁亚芳,陈明贤,陈清西,等. 福建地区火龙果种质资源调查及 ISSR 分析 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(34): 216-220.
- [14] 李象松,魏丽华,李炫丽,等. 萝卜-芥蓝异源四倍体 F_4 和 F_{10} 世代 DNA 甲基化变异的 MSAP 分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(1): 96-100.
- [15] 黄菲,李雪梅,王文生,等. DNA 甲基化在植物抗逆反应中的研究进展及其育种应用 [J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(6): 83-91.
- [16] 孙雪梅,乔爱民,孙敏,等. 27 个菜心品种遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 35(1): 119-123.
- [17] 陈业,石建明,陈文华,等. 23 种中国兜兰属植物亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2013, 35(6): 15-21.
- [18] 倪书邦,毛常丽,吴裕. 橡胶树部分种质资源的荧光 AFLP 分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2012, 34(2): 53-58.
- [19] SCHELLENBAUM P, MOHLER V, WENZE G, et al. Variation in DNA Methylation Patterns of Grapevine Somaclones (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Biology*, 2008, 8: 78.
- [20] XIONG L Z, XU C G, MAROOF M A, et al. Patterns of Cytosine Methylation in An Elite Rice Hybrid and Its Parental

Lines, Detected by a Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism Technique [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 439–446.

[21] 洪 柳, 邓秀新. 应用 MSAP 技术对脐橙品种进行 DNA 甲基化分析 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(11): 2301–2307.

[22] CERVERA M T, RUIZ-GARCIA L, MARTINEZ-ZAPATER J M. Analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis Thaliana* Based on Methylation-Sensitive AFLP Markers [J]. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268(4): 543–552.

On Optimization of MSAP Analysis System and Assessment of DNA Methylation in *In Vitro* Pitaya

LIU Peng-fei¹, QIAO Guang¹, LIU Tao²,
PENG Zhi-jun², CAI Yong-qiang², WEN Xiao-peng¹

1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Guizhou University), Ministry of Education, Institute of Agro-bioengineering, Guiyang 550025, China;

2. Guizhou Institute of Fruit Tree Science, Guiyang 550006, China

Abstract: The MSAP-PCR system has been optimized through orthogonal design on several key factors with *in vitro* pitaya. The optimum conditions for restriction digestion were 300 ng genome DNA, 10 U *EcoR* I, 2.5 U *Msp* I (*Hpa* II) through two steps. The 20 μ L pre-amplification reaction mixture contained 1.0 μ L digest-ligation products, 10 μ L Mix, and 2.0 μ L Primers E + A/HM + T. The pre-amplification products were diluted 50 times for the selective amplification. The 20 μ L selective amplification reaction mixture including 3.0 μ L pre-amplification diluted products, and 5 μ L Mix, and 2.0 μ L Primers E + ANN/HM + TNN. The level of methylated CCGG was up to 24% among the *in vitro* plants of pitaya, as detected by 17 primer pairs, and the mean ratio of polymorphism was 1.8%. Therefore, the methylated sites of DNA sequence remains some variance among the different *in vitro* pitaya.

Key words: pitaya; *in vitro* plant; MSAP; DNA methylation

责任编辑 潘春燕

