

梨矮化基因 *pcDw* 的一个 SCAR 标记

贾彦利, 王彩虹*, 田义轲, 戴洪义, 王 亮

(青岛农业大学园艺学院, 山东青岛 266109)

摘要: 以‘矮化梨’ (*Pyrus communis* L.) 与‘荏梨’ (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) 的杂交后代共 111 个单株为试材, 采用分离群体分组分析法 (bulked segregate analysis, BSA), 通过对 412 个随机引物的筛选, 获得了一个与控制梨树矮化性状基因 *pcDw* 连锁距离为 8.3 cM、长度为 940 bp 的 RAPD 标记 $S_{1172-940}$, 并将其转换成了 SCAR (sequence characterized amplified region) 标记, 即 $SCAR_{940}$ 。这一研究结果, 为该矮化性状的标记辅助选择提供了有效工具。

关键词: 梨; 矮化; RAPD; SCAR

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1531-04

A SCAR Marker Linked to *pcDw* Gene in Pear

JIA Yan-li, WANG Cai-hong*, TIAN Yi-ke, DAI Hong-yi, and WANG Liang

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: To identify molecular markers linked to *pcDw* gene determining the dwarf character of pear tree, a population of 111 individuals from the cross of ‘Aihuali’ (*Pyrus communis* L.) × ‘Chili’ (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) was tested using 412 random primers by the way of bulked segregate analysis (BSA). A RAPD marker, $S_{1172-940}$, linked to *pcDw* gene at a distance of 8.3 cM, was detected. This RAPD marker was converted into a SCAR (sequence characterized amplified region) marker, $SCAR_{940}$, which would provide an effective tool for marker assisted selection for the dwarf trait.

Key words: Pear; Dwarf; RAPD; SCAR

矮化是与果树栽培模式密切相关的重要农艺性状, 果树矮化栽培模式的发展, 迫切需要优良的矮化砧木和矮化品种。因此, 对矮化性状的研究具有重要的现实意义。以往已见一些关于苹果矮化性状遗传规律和分子标记的研究, 但对梨的矮化性状研究很少, 也未见有关其分子标记的报道。1991 年, 作者从英国东茂林试验站 (East Malling Research) 引入西洋梨矮化型实生变异品种 ‘Le Nain Vert’ 的种子, 播种后获得具有母本矮化性状的实生后代, 将其定名为 ‘矮化梨’。意大利的 Rivalta 等 (2002) 已研究表明该矮化性状受控于一个显性基因 (*pcDw*)。本研究以 ‘矮化梨’ 与 ‘荏梨’ 杂交后代群体为试材, 通过分离群体分组分析 (BSA) 方法, 用 RAPD 技术筛选与该矮化基因相关的标记, 在此基础上, 开发简单稳定的 SCAR 标记, 为该性状的辅助选择提供简便快速的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

试材取自青岛农业大学果树实验站。矮化梨 (矮型)、荏梨 (正常型) 及其杂交后代群体 111 株。

收稿日期: 2007-04-09; 修回日期: 2007-09-07

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (Y2003D01); 青岛市科技攻关项目 (05-2-NS-18); 山东省良种产业化项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: chwang@qau.edu.cn)

1.2 基因组 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA (Tian et al., 2004)。用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 质量, 并估算其浓度, 将最终浓度调至 25 ng/ μ L 左右。

1.3 近等基因池构建

根据 BSA 法的原理, 将杂交后代个体按高矮性状分为矮型组和高型 (即正常型) 组。从两组中分别抽取 10 个单株, 将其 DNA 样品等量混合, 组成矮型基因池和高型基因池。

1.4 RAPD 及产物鉴定

RAPD 在 PTC-200 基因扩增仪上进行。反应体系和扩增程序参考 Tian 等 (2004) 的方法。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液为 $1 \times$ TAE, 电压为 4 ~ 5 V/cm, 于 UVP 成像系统中观察照相, 记录观察结果。

1.5 梨矮化性状标记的筛选

先用大量的随机引物在两个对比基因池上进行 RAPD 扩增, 筛选出在基因池间具有多态性的引物, 然后再用这些多态性引物在杂交后代的分离群体上作进一步验证分析, 以确定所获得的多态性片段是否为与梨矮化性状相关的分子标记。统计群体上的共分离分析结果, 计算标记与目标性状间的重组率, 并根据 Kosambi 函数估算遗传连锁距离 (莫惠栋, 1996)。

1.6 RAPD 标记片段的回收、克隆与测序

用玻璃珠 (Silver Beads) DNA 回收试剂盒 (购自上海 Sangon 公司) 从琼脂糖凝胶上回收标记 DNA 片段。将其连接到 pGEM-T easy vector 载体, 用热激法将其转化到大肠杆菌细胞, 扩大繁殖。用碱法提取质粒, 通过酶切鉴定确定克隆片段的正确性。将含克隆质粒的菌液送至上海 Sangon 公司测序。

1.7 SCAR 标记的转换

根据 RAPD 标记片段的测序结果, 设计特异引物。引物合成由上海 Sangon 公司完成。SCAR - PCR 反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

2 结果与分析

2.1 矮化性状 RAPD 标记的筛选

通过对 412 个引物在两对比基因池间的筛选以及群体上的验证分析, 最后发现来自引物 S₁₁₇₂ 的扩增片段 (约 900 bp) 为与矮化性状相关的标记片段 (图 1)。在 111 株杂交后代的 55 株矮型个体中, 有 4 株表现重组; 56 株高型个体中有 5 株表现重组。即标记与矮化性状的重组率为 8.1%。用 Kosambi 函数计算表明该标记与矮化基因 *pcDw* 的遗传距离为 8.3 cM。

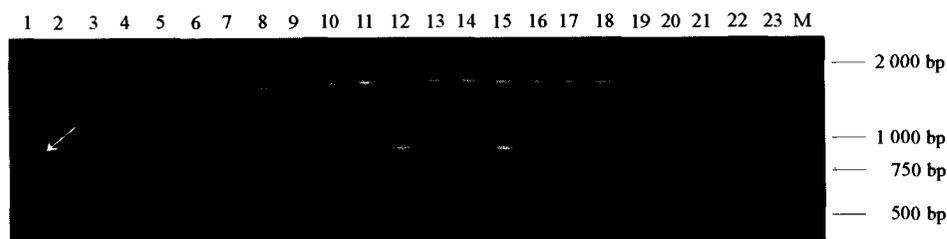


图 1 引物 S₁₁₇₂ 在两基因池及 F₁ 部分个体上的扩增结果

1. 矮型基因池; 2. 高型基因池; 3 ~ 14. 矮型个体; 15 ~ 23. 高型个体; M. DNA marker DL 2000; 箭头所指为标记片段。

Fig. 1 The amplification result of primer S₁₁₇₂ in the two bulks and several F₁ progenies

1. Bulk of dwarf type; 2. Bulk of normal type; 3 - 14. The progenies with dwarf character; 15 - 23. The progenies with normal character; M. DNA marker DL 2000; The specific fragment was indicated by the arrow.

2.2 RAPD 标记片段克隆的酶切鉴定

回收 PCR 产物时, 由于易受一些非特异性带的干扰, 克隆的很可能不是目标带。因此对所获得的克隆片段必须检测, 以确定其正确性。在含 Amp 的蓝/白斑选择平板上, 共挑取 5 个白色克隆菌斑和 1 个蓝色菌斑 (对照), 扩大繁殖后提取质粒, 用 *EcoR* I 酶切鉴定。结果发现, 来自 5 个白色菌斑的质粒均切出了约 600 bp 和 300 bp 的两条带 (图 2), 两者之和与原 RAPD 片段大小相近。

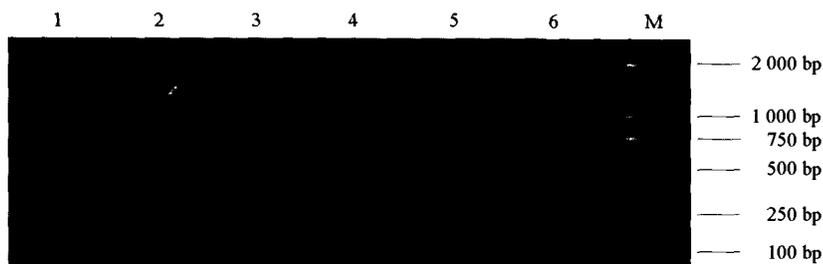


图 2 重组质粒的 *EcoR* I 酶切检测

1~5. 重组质粒; 6. 空白质粒 (对照); M. DNA marker DL 2000。

Fig. 2 Recombinant plasmids digested by *EcoR* I

1-5. Recombinant plasmids; 6. Control; M. DNA marker DL 2000.

2.3 RAPD 标记序列及 SCAR 标记转换

2.3.1 RAPD 标记测序结果 从 1~5 号克隆中抽取 2 个进行测序。结果表明, 两个克隆的测序结果完全相同, 片段序列如下:

```

GTCTTACCCCTTCCCATCTTCTAGCATCCATCCTGCTGTGCTGTTAACAGTCACACTCCGTCATCTTCCAGTCA
CCACCTTTCTCAACTTCAGTTATCTTTGTGCATGCTTTACAGCTTATTTGTTGAAGTTGTTGGAACAATAAAATTTT
TAGCATGTAGTCTTCAAACCTAATGAAAGTTGTTTAAATCAATTACGGTTAGTGAATGTGATTAATGATTTTGTTC
TGTTGTTAACTGAGTAATAAAATTTGGTCAAGTGATATGTTGAATTTTCTTTTATGCTCTGTAGGTTGAAGACAC
TGCAAAATTTCAAGGACATGAGGCTGGTGATAGCCAATCGAGTCATATAGAGGAATTCAGAAGGTGCTCTTAGCT
TAGCGTTCGACAGATTCTTCTTGTGTTATCAITTCACCTTCAATCTTTTGGAAATTCATCTAGTTTATGAAATGT
GGGAGGTTATTGCTTTTGCAGGATGAAGTGGTGACCGAATATCCGTCGGAGGCTGTTTCAGCTCAACAAGAAGAA
GTTTCAGCTAGAAACAGAAGCAGACTACAACCAGAGAGATGTAGAAATTCGAGCAACAGCATGCTTCTCGCAGACCA
TATCAAAACCAAAAGAGGCGGTCGTGGGGGGGAGGTGGCCGAGAGGTTACACTAATGGCCGTGGAGGCCGAGGC
AATGGCAGAGGAGGTGTTCTTCCAGAATGGTCGTAACCAGTATTACGACCAGCCTGGAAATATTATCAAGAC
CCCCTATAACAATAGGGGTAGGGGCGGGTAGGGGTGGCGCGGCATCTTACAACCACCAAGGTGCAGCTCAAGAG
GGTCATGCCCTCGCCAACGTTGGAGTTGCTTCGTAACGGTACATTCAGTCTCTGCAGAATGCTTCTTCTAGTTTT
TGATGGGGCGGTGGGGTAAGAC
  
```

分析发现, 该片段内部确实含有一个 *EcoR* I 酶切位点 (双下划线部分), 可以将该片段分成 583 bp 和 357 bp 两个片段, 这与质粒的酶切检测结果相吻合。单下划线部分为 S_{1172} 引物结合位点。

2.3.2 SCAR 引物的设计与 PCR 扩增 根据序列特点用 DNAMAN 软件设计一对用于 SCAR-PCR 的特异引物。上游引物序列为: 5'-GTC TTA CCC CTT CCC ATC TTC-3'; 下游引物序列为: 5'-AC CGC CCC ATA CAA AAA CT-3'。序列中的粗体部分为 SCAR 引物结合位点。通过优化分析, 确定 SCAR-PCR 的最佳反应体系为: 在 25 μ L 总体系中含有模板 DNA 25 ng, Mg^{2+} 2.25 mmol/L, *Taq* 酶 1.0 U, 反应程序中的退火温度为 62 $^{\circ}$ C, 25 个循环。

用该对特异引物在两亲本、两对比基因池及总群体上进行分析, 扩增结果表明该 RAPD 标记已成功转换为 SCAR 标记 (图 3), 即 SCAR₉₄₀。SCAR₉₄₀ 在分离群体中与目标性状的分离重组行为与原 RAPD 标记的表现完全一致。



图3 SCAR₉₄₀特异引物在亲本、基因池及部分F₁杂交后代个体上的扩增产物电泳图谱

M. DNA marker DL 2000; 1. 矮化梨; 2. 矮型基因池; 3. 荏梨; 4. 高型基因池; 5~13. 矮型后代个体; 14~23. 高型后代个体。

Fig. 3 The amplification result of SCAR₉₄₀ specific primers in parents, bulks and several F₁ progenies

M. DNA marker DL 2000; 1. 'Aihuali'; 2. Bulk of dwarf type; 3. 'Chili'; 4. Bulk of normal type; 5~13. Dwarf progenies; 14~23. Normal progenies.

3 讨论

目前生产上应用的果树矮化砧木和矮化品种的矮化性状多数遗传机制比较复杂,通过常规育种技术很难将其用于树体的遗传改良。然而,在果树中也发现了部分由质量性状控制的矮化性状,这些基因资源对果树树型改造有特殊意义。近年来,已有一些关于矮化基因标记的研究报道。如Tian等(2005)已用RAPD、SSR及SCAR标记对苹果的*Co*基因进行了标记及区域作图。毕晓颖等(2002)曾获得了1个与苹果显性矮化主基因*Dw*连锁距离为0.69 cM的RAPD标记。

将RAPD标记转换为SCAR标记,可以很好地解决其稳定性的问题。因此,这一方案已在众多性状的分子标记研究中得到实施,如桃的有毛/无毛(姜立杰等,2005)、葡萄的无核性状(杨英军等,2002)。本研究将*pcDw*基因的RAPD标记S₁₁₇₂₋₉₄₀成功转换为SCAR标记,在矮型个体上扩增出一条目标带,而高型个体中目标带表现缺失,这非常便于性状的区分。此研究结果无疑对梨树该矮化性状的标记辅助选择(MAS)和*pcDw*基因的区域作图具有重要的意义。但MAS要求的分子标记与目标基因的连锁距离一般应在5 cM以内,因此,还应该继续开发与*pcDw*基因连锁更为紧密的分子标记。

References

- Bi Xiao-ying, Wu Lu-ping, An Li-jia. 2002. A RAPD marker linked to a dominant dwarf gene in apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (1): 1-4. (in Chinese)
- 毕晓颖, 吴禄平, 安利佳. 2002. 一个与苹果属显性矮生主基因*Dw*连锁的RAPD标记. *园艺学报*, 29 (1): 1-4.
- Jiang Li-jie, Yang Ying-jun, Zhang Xiao-ming, Li Wen-sheng, Zhang Kai-chun. 2005. SCAR marker linked to the peach/nectarine in peach. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (6): 1003-1007. (in Chinese)
- 姜立杰, 杨英军, 张晓明, 李文生, 张开春. 2005. 桃果实有毛/无毛性状的SCAR标记. *园艺学报*, 32 (6): 1003-1007.
- Mo Hui-dong. 1996. Advances in quantitative genetics - QTL mapping and its application. *Scientia Agricultura Sinica*, 29 (2): 8-16. (in Chinese)
- 莫惠栋. 1996. 数量遗传学的新发展——数量性状基因图谱的构建和应用. *中国农业科学*, 29 (2): 8-16.
- Rivalta L, Dradi M, Rosati C. 2002. Thirty years of pear breeding activity at ISF Forlì, Italy. *Acta Horticulturae*, 596: 233-238.
- Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Dai Hong-yi, Zhang Ji-shu. 2004. Screening of a RAPD marker tightly linked to *Co* gene in apple and the SCAR marker conversion. *Acta Genetica Sinica*, 31 (9): 919-925.
- Tian Y K, Wang C H, Zhang J S, James C, Dai H Y. 2005. Mapping *Co*, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers. *Euphytica*, 145 (1-2): 181-188.
- Yang Ying-jun, Wang Yue-jin, Zhou Peng, Wang Xi-ping, Zhang Jian-xia. 2002. SCAR marker linked to seedless genes in grapes and southern blot analysis. *Jour. of Northwest Sci. Tech. Univ. of Agri. For. (Nat. Sci. Ed.)*, 30 (6): 77-80. (in Chinese)
- 杨英军, 王跃进, 周鹏, 王西平, 张剑侠. 2002. 葡萄无核基因的SCAR标记及Southern blot分析. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 30 (6): 77-80.