

梅单瓣复瓣花的相关分子标记初探

高志红^{1,2} 韩振海¹ 章 镇^{2*} 张玉明²

(¹ 中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094; ² 南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘 要: 应用 RAPD 分子标记技术和 SCAR 分子标记技术研究了梅单瓣花与复瓣花相关的分子标记。结果表明从 34 个随机引物中筛选到一个多态性引物 OPP01, 扩增出只有单瓣花类型具有的分子量为 1899 bp 的 DNA 特异片段, 即 OPP01-DS-1899; 根据该序列设计大小分别为 25 bp 和 24 bp 的一对引物 SSD-1 和 SSD-2, 将 RAPD 标记转为 SCAR 标记, 该标记大小为 1079 bp。

关键词: 梅; 复瓣; 单瓣; 分子标记

中图分类号: S 685.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0612-03

1 目的、材料与方 法

以梅 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) 单瓣花基因型和复瓣花基因型为试材, 筛选与复瓣、单瓣花基因相关的分子标记, 为梅杂交育种提供早期选择标记, 也为研究单瓣、复瓣花调控基因打下良好基础。

试材取自南京农业大学果梅种质园和南京梅花研究中心, 包括宫粉型 (淡妆宫粉、宫粉)、垂枝型 (绿萼垂枝、绯司垂枝)、绿萼型 (小绿萼、重瓣绿萼)、朱砂型 (寒红)、杏梅型 (云南丰后、杨贵妃)、玉碟型 (三轮玉碟、小玉碟)、品字梅等复瓣基因型 12 株, 以及酒盅梅、甲洲小梅、早花、南高、晚红、小叶猪肝、横核、大粒种、四川黄梅、桃形梅、云南杏梅等单瓣基因型 11 株。采集供试材料的嫩叶, 分别提取基因组 DNA^[1]。将两种基因型各样品 DNA 等量混合, 对这两个混合的 DNA 进行 PCR 扩增筛选多态性引物, RAPD 反应体系及反应程序见参考文献 [2], 对筛选到的可能与单瓣花复瓣花性状相关的多态性引物, 再以每个样品的 DNA 为模板进行扩增, 检验所得到的分子标记的可靠性。反应引物及生化试剂购自上海生工生物工程公司。

从 1.4% 的琼脂糖回收 RAPD 特异片段, 回收产物与 PUCm-T 连接, 转化到 TOP10 大肠杆菌之中, 经蓝白斑筛选, 并经 PCR 鉴定得到阳性克隆后进行测序 (测序由上海博亚公司完成)。根据 RAPD 特异片段的测序结果设计一对引物, 正向引物为 5'-CAAGTAGTATGCCAGATGTGACCAT-3', 代号为 SSD-1; 反向引物为 5'-TACAAAGCCAAAGGCCACAAATGA-3', 代号为 SSD-2。PCR 反应体系为: 总体积为 25 μL , 其中 Mg^{2+} 25 mmol L^{-1} , 10 \times 缓冲液 2.5 μL , dNTP 0.25 mmol L^{-1} , 引物 0.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, Taq 聚合酶 1U, 模板 DNA 60 ng; 反应程序为: 94 预扩增 8 min, 然后 94 40 s, 52 1 min, 72 1 min, 35 个循环, 最后 72 延伸 10 min。PCR 反应采用美国 MJ 公司生产的 PTC-100 基因扩增仪。扩增产物经 1.4% 的琼脂糖电泳, EB 染色后, 在紫外透射仪上观察, 拍照。

2 结果与分析

2.1 与单瓣、复瓣花性状相关的 RAPD 分析

以单瓣、复瓣相对基因型梅的 DNA 等量混合, 作为模板进行 RAPD 扩增, 从 34 个随机引物中筛

收稿日期: 2002-11-29; 修回日期: 2003-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070530); 国际基金资助项目 (D/3232-1)

* 通讯作者 Corresponding author; Tel: (025) 4395724; E-mail: zhangzhen_nj@hotmail.com

选到一个引物即 OPP01 具有多态性，引物序列为 GTAGCACTCC，多态性片段约为 1900 bp。单瓣基因型混合 DNA 样品的 RAPD 扩增产物具有该片段，而复瓣基因型混合 DNA 样品的 RAPD 扩增产物不具有该片段（图 1），该片段可能是与单瓣花和复瓣花相关的 RAPD 标记。随机取梅 11 个复瓣花基因型与 10 个单瓣花基因型为材料进行检测，结果表明，11 个复瓣类型除了 1 个样品有扩增产物外均没有该特异片段，而 10 个单瓣花类型中除了 1 个（泳道 19）没有扩增出特异片段外，其他均有该扩增片段（图 2）。证明该片段与梅花的单复瓣性状有关。

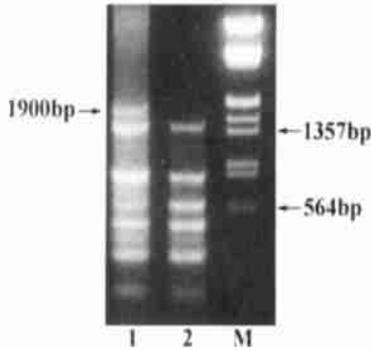


图 1 引物 OPP01 对扩增单瓣与复瓣混合 DNA 的扩增结果
1: 单瓣基因池; 2: 复瓣基因池; M: DNA 分子量标准。

Fig. 1 RAPD amplified patterns of the primer OPP01 in single flower pool and double flower pool

1: Single flower pool; 2: Double flower pool; M: DNA marker.

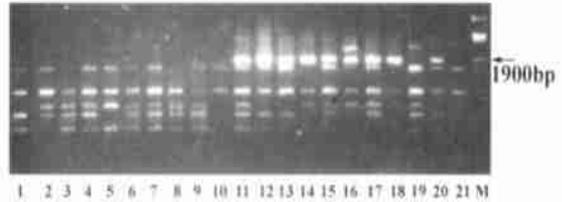


图 2 引物 OPP01 对不同基因型单株 DNA 的扩增结果

1~10, 21: 复瓣花基因型; 11~20: 单瓣花基因型;

M: DNA 分子量标记。

Fig. 2 RAPD amplified patterns from the different genotype individual plant of Japanese apricot using the primer OPP01

1 - 10, 21: Double flower genotype; 11 - 20: Single flower genotype;

M: DNA marker.

2.2 特异片段的克隆与测序

将得到的 RAPD 标记回收、克隆和测序，结果表明：该片段大小为 1899 bp，碱基序列如下所示。黑体标记的碱基序列为将该 RAPD 标记转为 SCAR 标记所设计的引物 SSD-1 和 SSD-2 相匹配的位点，预计得到的 SCAR 标记的 DNA 片段序列为上述引物序列之间的一段碱基序列。

```

5-GTAGCACTCCCAACACATTTGAGCCTAATCCCAAAAGGCAAAATCTTCTATTAATCATTTAGCGGGCGGTATTTATCACCTTAA
GGAGGAAGATAGTCTCAAAGCTCAATTGGCAACAATGGCTAGGGAAGTTGAAACTCTAAAACCAAAATTCGCTCAAAAAGTTAATTC
AATTGCAAGTCAAGAAATTTTGGAGATTTGTAAAGTTTGCTGGGTCAATGGGACATGTAACAAAAGAGTGTCCAAGACTTCTCGCTTT
TAGACAAATGTTGCATGATCAAGCAAATTTGTGAATCAATTTAAAAAACCATCCACTTTTCTGAACTTATAATCCAGGATGGAG
AAACCACCCAAATTTCAAGTTGGAGAAATAACTAATAAATGTGCCCAACAAAATCTAATTCCTTTTATTAATTCACAGGT
GGAAGGACGATCACTGTTAACAAATTTGGAAGATGTTATGAAGCAATTCATACAAAGCCAAAGGCCACAAATGAAAGAATGCACAA
GACATTTGGTGAATTAAGAGCAGTCTTTCCAACTCACTTCTTCACTGTCAATTCAGAAAAGGGTAAATTTCTCTCAAGTCCAA
CCTAATCCACATGCACAGTTAGAGGCAACTACCCCTTCTTCTTCTTCTTGAATGAAAAAAGCATGAAATATGTAAGGCTATCACT
ACTCTTCGTAGTAGAAAAATAATGGGAAAGATGATTTAGTAACAGTTGAAAAAAGAAATTCAGAAAAATCCAAAAATAATGAA
AAAGAAAATAATGGTTCTGAAATTTGTAAGTGCCTTTTCTGCTCCATCCCAAGCCTTAAGGCTATAAGAAAAATCAAAAT
CCTGAAATTTTGGAGGTTTGTAGACAAGTGAATAATACCTCTTTTGGATGCTATAAAACAAATTCCTTCATATTCAAAATTT
TAAAAGGATTAATGCACATCAAAAAGAAAGCACAATGTTGATAAGACCGCATTTTAACTGAAAAATGTAAGTGCAATTTCTCAA
AATACTCCACCAAGTACAAGATCCAGGTTGCCCATATTTCTTGTATTTAGGGAATTTAGCATTGAACAAGCTTTATGGATT
TAGGTGCTAGTGTAAATTTGCTTGGCTTGGCTCGGTTGATAAGCAATTTGGTCTTGGTGAATTAAGCACTCACTCAATAACATGGCAAT
TGGCTGACCGTTTGTCAAAATCCCAAGAGATATTAATAAATGAGATTTATCAGAAGATCAAGAAAGAACAACCTTTTACTTGCC
ATTTGGAATTTGCTTTAGATAAATGCCTTTTGGTCTTTGCAATGCACCAACCACATCCAACGTTGCATGATAACATATTTAGT
GACATGGTAGAAAAATTTAGAAGTTTTCATGTATGATTTACTGTGTTGGTGAATTAATTTCTGATGTTTACTAATTTAGAG
AATGTTCTTATCAGGTGATAAAGAGAAAAATTTGGTGTCAATTTGGGAGAAATGCAATTCATGGTTCACATCTGGCATACTACTTGG
CACATTTGTTCTCACAAGGAATGAAAGTGGATAAGTCAAAAATGATTTAATGCTTATTTTCATATTTCTAAAACCTGTTAAAGAA
ATTAGATCTTTTGGAGATGTAGGTTTCTACCGGAGATTCATACAAAATTTAGTGCAATTTGCAAGGCAATGAAATAATCTCCTG
GAAAAAGATGCTAAATTTGATTTGAAATTTGCAATGTCAGAGCAATTTGAGAAATGATTAATAATGCTAACATCAACTCTGTAAT
CAGCCCCAGATTTGCTATGCCATTTGAAATAATGTGTGATGCTAGTGATGGTGTATTTGGGGAGTGTCTAC-3

```

2.3 将 RAPD 标记转为 SCAR 标记

根据测序结果，设计一对引物 SSD-1: 5'-CAA GTA GIATGCCA GATGTGACCAT -3' 和 SSD-2: 5'-TACAAA GCCAAA GCCCAAAATGA -3'，以单瓣基因型和复瓣基因型单株的 DNA 为模板进行 PCR 扩增，结果

表明, 11 株单瓣花型除 1 株外 (泳道 13), 在 1079 bp 处均有一特异扩增片段, 12 株复瓣类型则没有该 DNA 扩增片段 (图 3), 扩增片段的有无与表现型的符合率为 91%, 这可能和材料的基因杂合性有关。

Lammerts^[2]以桃为试材研究指出, 单瓣 (D) 对重瓣 (d) 为完全显性; 至于花瓣的数量, 则是由累加效应的两对基因控制。根据 ABC 模型, 花瓣是由 B 类 MAD-box 同源异形基因调控的。随着开花分子生物学研究的深入, 通过对拟南芥和金鱼草无瓣花突变体的研究表明, 花瓣的决定基因为 *AP3* 和 *PI*, 但同时这两个基因又决定了雄蕊的表达, 许多被子植物存在着这两个基因的同源异形基因, 但这两个基因如何作用还不清楚^[3~5]。由于梅的花瓣类型多, 无瓣、单瓣、复瓣、重瓣类型均有, 本文以梅为材料从分子标记的角度探讨了与梅单复瓣花相关的调控基因, 得到了与梅单复瓣花相关的分子标记, 该标记很可能与花瓣的调控基因有关, 相关基因是否为 *AP3* 或 *PI* 基因, 还有待进一步研究。

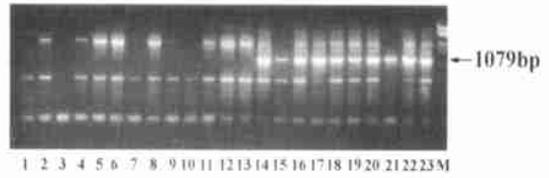


图 3 引物 SSD-1 和 SSD-2 对单复瓣梅基因型的扩增
1-12. 复瓣花基因型; 13-23. 单瓣花基因型; M. DNA 分子量标记。
Fig. 3 Amplification patterns of the SCAR marker linked to single
-double flower gene in Japanese apricot
1-12. Double flower genotype; 13-23. Single flower genotype; M. Marker.

参考文献:

- 1 高志红, 章 镇, 盛炳成, 等. 果梅随机扩增多态 DNA 技术的研究. 植物生理学通讯, 1999, 35 (3): 214~218
- 2 Lammerts W E. The breeding of ornamental edible peaches for mild climates (I) Inheritance of tree and flower characters. Amer. J. Bot., 1941, 32: 53~61
- 3 Purugganan M D, Suddith J I. Molecular population genetics of floral homeotic loci: departures from the equilibrium neutral model at the *APETALA3* and *PISTILLATA* genes of *Arabidopsis thaliana*. Genetics, 1999, 151: 839~848
- 4 Kramer E M, Dorit R L, Irish V F. Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. Genetics, 1998, 149: 765~783
- 5 Kramer E M, Irish V F. Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. Nature, 1999, 399: 144~148

Identification of RAPD and SCAR Markers Linked to the Single-double Flower Gene in Japanese Apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)

Gao Zhihong^{1,2}, Han Zhenhai¹, Zhang Zhen², and Zhang Yuming²

(¹ Institute for Horticultural Plant, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ² College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence characterized amplified region (SCAR) marker were performed to detect markers linked to the single double flower in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). Primer OPP01 was identified from 34 10-mer primers examined. The fragment was cloned and sequenced as 1899 base pairs. According to the sequence, one primer pairs were designed to convert the RAPD marker to SCAR marker. The length of the amplified fragment of SCAR marker was 1079 base pairs.

Key words: Japanese apricot; Double flower; Single flower; Molecular marker