

桃花粉可育基因连锁的 RAPD 标记与 SCAR 标记的转化

王 成¹, 曹后男^{1*}, 宗成文¹, 赵成日², 庄得凤¹, 朴日子¹, 赵 恺¹

(¹ 延边大学农学院, 吉林龙井 133400; ² 岐阜大学应用生物科学部, 日本岐阜 5011193)

摘 要: 桃品种以重阳红 (花粉不育) × 大久保 (花粉可育) 的 52 株 F₁ 代群体为试材, 应用 RAPD 技术, 结合集群分组分析法 (Bulked Segregate Analysis, BSA) 构建花粉可育/不育基因池, 利用 180 个随机引物, 筛选在花粉可育基因池中稳定扩增的一个 RAPD 标记 OPW03-900。经过重复性验证和群体单株验证, 该标记仅在花粉可育个体 (重组型除去) 中出现, 与桃花粉可育/不育位点的连锁距离为 5.80 cM。将该特异性片段回收、克隆、测序, 并设计一对特异 SCAR 引物, 再对 F₁ 代个体进行 PCR 扩增, 发现该特异带的位点及重组型个体的数目与 RAPD 扩增结果一致, 片段大小为 906 bp, 命名为 SCW03-906, 表明 RAPD 标记已成功转化为与桃花粉可育基因连锁的 SCAR 标记。该序列已被 GenBank 收录, 登录号为 DQ659676。

关键词: RAPD 标记; BSA; SCAR 标记; 花粉可育基因

中图分类号: S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-0865-06

Identification of RAPD Marker Linked to Pollen Fertility Gene and Conversion to SCAR Marker in Peach

WANG Cheng¹, CAO Hou-nan^{1*}, ZONG Cheng-wen¹, ZHAO Cheng-ri², ZHUANG De-feng¹, PIAO Ri-zi¹, and ZHAO Kai¹

(¹ Agricultural College, Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China; ² Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu 5011193, Japan)

Abstract: In this study, a RAPD marker (OPW03-900) linked to pollen fertility gene was screened from 180 RAPD arbitrary primers in 52 F₁ individuals from the cross 'Chongyanghong' × 'Okuba', pollen fertility/sterility pool was constructed respectively by using RAPD technique and BSA method. After repeating tests and checking up individuals of population, this marker could only be amplified in the pollen fertility individuals (except recombinants), the linkage distance was 5.80 cM with the pollen fertility/sterility locus. This band was collected and sequenced to synthesize a pair of SCAR primer which was used to amplify the individuals of the F₁ progeny, the locus of the special band and the number of recombinants were the same as the result of RAPD amplification, the size of this marker was 906 bp, which was designated as SCW03-906, indicating the RAPD marker has been successfully converted into a SCAR marker which linked to pollen fertility gene in peach. This sequence was adopted by GenBank, the logging number was DQ659676.

Key words: RAPD marker; BSA; SCAR marker; Pollen fertility gene

桃的花粉育性是由一对单基因 P_s/p_s 控制, 可育 (P_s) 对不育 (p_s) 为完全显性, 花粉不育的品种和植株均属于隐性同质结合的基因型 (Connors, 1927; Blake, 1937)。

收稿日期: 2007 - 02 - 01; 修回日期: 2007 - 04 - 17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30160054); 吉林省教育厅项目 (吉教合字 00 第 36 号)

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

桃的花粉育性性状是衡量果实产量的一个重要指标。生产中一部分桃品种,如晚黄金、重阳红、深州蜜桃等,由于本身没有健全的花粉,栽培中必须配置授粉树,如果遇到花期阴雨、低温等不适于传粉昆虫活动时常导致减产(景士西和吴禄平,1996)。利用高信息量的分子标记技术,筛选与桃花粉育性基因紧密连锁的分子标记,不仅可以及早判断、淘汰不符合经济性状要求的植株,也可缩短桃的育种年限,为桃的果实产量提供保证。

目前,在苹果(Yang & Korban, 1996; 田义轲等, 2004)、桃(杨英军等, 2000; Jun et al, 2002)、葡萄(徐炎等, 2003)等果树上,已经找到了很多与主要性状基因连锁的分子标记。其中在桃花粉育性性状方面的研究中,根据拟南芥雄性不育序列标记设计的引物扩增出的两个片段 NNJ-I (600 bp) 和 NNJ-II (900 bp),与桃的花粉不育性状之间的遗传距离为 0 cM (Elisabeth et al, 2004)把桃的花粉育性基因 (*Ps/ps*) 定位在第 6 连锁群,与矮化基因 (*Dw/dw*) 的距离最近(俞明亮等, 2006)。但关于桃花粉可育/不育性状的 SCAR 标记未见报道。

本试验利用 RAPD 技术与 BSA 法相结合,寻找与桃花粉育性基因连锁的 RAPD 标记,再将其转化为更稳定而有效的 SCAR 标记,应用于桃的辅助选择育种中,旨在为今后及早期鉴定桃的花粉育性性状提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

桃品种为重阳红(花粉不育)和大久保(花粉可育)。1998年,以重阳红为母本,大久保为父本进行杂交,获得杂种 F_1 代 52 株,其中花粉可育 23 株,不育 29 株。试材采自河北科技师范学院。

1.2 基因组总 DNA 的制备

采用改良的 CTAB 法(Cheng et al, 1997)提取基因组 DNA。经过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测样品的纯度及浓度,然后用 TE 缓冲液稀释成 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.3 桃花粉育性基因池的构建

根据 BSA 法原理(Michelmore, 1991),分别从 F_1 代的可育、不育个体 DNA 样品中,随机选取 5 株,等量混合,构成花粉可育基因池和花粉不育基因池。

1.4 RAPD 技术体系

反应体系及扩增程序采用 Cao (1999) 的方法。利用 DB80240-33 型 PCR 仪进行扩增,并进行了优化。最终确定总反应体系 $25 \mu\text{L}$,其中模板 DNA 40 ng , $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液 $2.5 \mu\text{L}$, dNTP $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl_2 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq DNA 聚合酶 1 U , 引物 $20 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 余下用 ddH_2O 补充。

扩增程序为 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 1 min , 36°C 退火 1 min , 72°C 延伸 5 min , 40 个循环; 72°C 终延伸 5 min 。

扩增后的产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中(含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EB)电泳,制胶和电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$ (pH 8.0),在 $3 \sim 5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 恒压下电泳 $3 \sim 4 \text{ h}$,用 GDS-8000 凝胶成像系统照像,进行 RAPD 分析。

1.5 特异片段的回收、克隆及 SCAR 标记的转化

用 DNA 凝胶回收试剂盒(Takara)回收目的片段,经过与 T 载体的连接、转化及质粒 DNA 的 PCR 鉴定后,送上海博亚公司进行 DNA 测序。

利用软件 Oligo 6.0 对特异性片段的测序结果进行分析,将设计的一对特异 SCAR 引物送上海英骏公司合成。

扩增体系为 $25 \mu\text{L}$,其中包括模板 DNA 10 ng , MgCl_2 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 上游

引物 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 下游引物 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \times \text{PCR Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 1 U , ddH_2O $16.17 \mu\text{L}$ 。

PCR 扩增程序为 94°C 5 min ; 94°C 45 s , 68°C 45 s , 72°C 1 min , 35 个循环; 72°C 5 min 。扩增后的产物分析过程同上。

2 结果与分析

2.1 桃花粉育性基因池的 RAPD 引物筛选及分析

从 180 个随机引物中, 筛选出在花粉可育基因池和不育基因池之间具有较高多态性, 且扩增稳定、带型清晰的引物 15 个, 经重复性验证后, 只有引物 OPW03 在花粉可育/不育基因池中稳定的扩增出一条分子量大小为 900 bp 的差异带。

如图 1 所示, 大久保和可育基因池可以稳定的扩增一条 900 bp 特异带, 而重阳红和不育基因池无此带。由此推断, RAPD 标记 OPW03- 900 bp 与桃花粉可育基因可能存在一定的连锁关系。

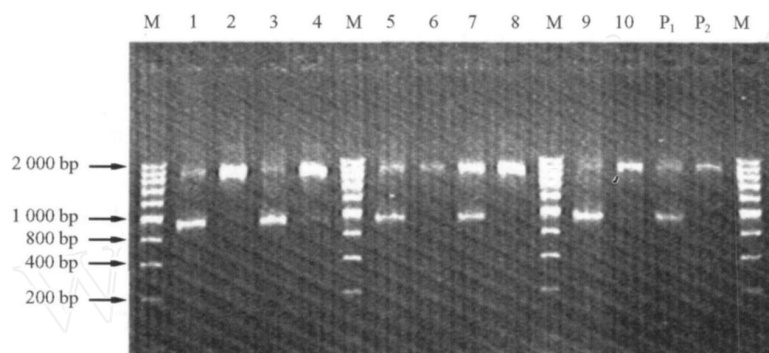


图 1 引物 OPW03 在不同花粉育性植株基因池中和亲本的 PCR 扩增结果

M: 200 bp DNA 标记; 1、3、5、7、9: 可育植株基因池;

2、4、6、8、10: 不育植株基因池;

P₁: 大久保; P₂: 重阳红。

Fig. 1 The result of PCR amplification with primer OPW03 in parents and different pollen sterility pools

M: 200 bp DNA marker; 1, 3, 5, 7, 9: Fertility pool of different individuals;

2, 4, 6, 8, 10: Sterility pool of different individuals

P₁: Okuba; P₂: Chongyanghong

2.2 桃花粉可育/不育性状的 RAPD 标记

利用引物 OPW03 对 F₁ 代 52 株个体进行 PCR 扩增, 其部分结果如图 2 所示。

从图 2 可知, RAPD 标记 OPW03- 900 bp 在 F₁ 代群体中发生了共分离。大久保扩增出一条 900 bp 的特异性带, 重阳红无此带; 23 株花粉可育个体中 22 株扩增出 900 bp 的特异性带, 1 株无此带; 29 株花粉不育个体中 27 株无 900 bp 的特异性带, 2 株有此带, 共有 3 株发生了重组, 重组率为 5.77% 。

利用 JoinMap[®] 3.0 软件, 调整 $\text{LOD} = 3.0$, $\text{REC} < 0.4$ 时, 计算得出该标记与花粉可育基因的连锁距离为 5.80 cM , 连锁较为紧密。

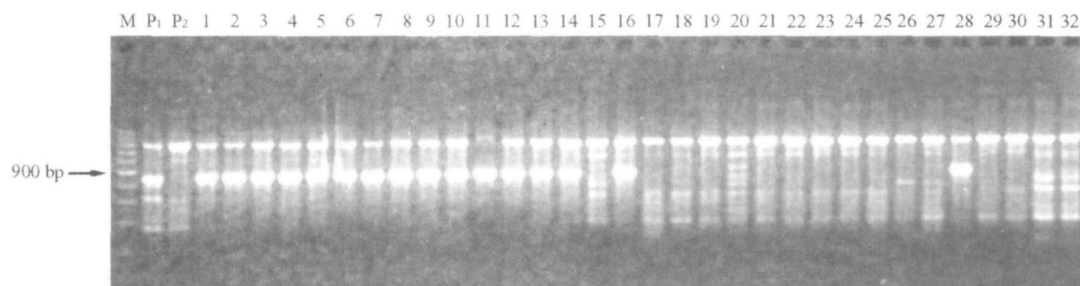


图 2 引物 OPW03 在分离群体中的 PCR 扩增结果

M: 200 bp DNA 标记; P₁: 大久保; P₂: 重阳红; 1~16: 可育个体;
17~32: 不育个体; 15, 28: 重组个体。

Fig 2 The result of PCR amplification with primer OPW03 in segregate population

M₁: 200 bp DNA marker; P₁: Okuba; P₂: Chongyanghong;

1 - 16: Fertility individuals; 17 - 32: Sterility individuals;

15, 28: Recombinant individuals

2.3 特异片段的序列测定及 SCAR 引物的设计

对该特异性片段进行回收、克隆、测序, 其结果如图 3 所示。从序列图的上下游找到了引物 OPW03 自身及其互补碱基序列的位置。除去接头部分序列后, 所得特异片段长度为 906 bp, 与引物 OPW03 扩增产生的回收片段 (900 bp) 的大小结果相一致, 且该序列已被 GenBank 收录, 登录号为 DQ659676。

```
5'-GTCCGGAGTGTCAACTATATCTATGTCCTAGATTATACTCTAAACCTTTGGGATGGATTTTGGACTTTTTTTATCAGTCAAAGA
TTTTGGACATAAAAAATGGAACAAAAACAAAAATATAACAAATCTTTTGGTGGGATATGCTTTGTATTGGTATGTTCTTCCC
ACTGAAGCAATTTAAATTTACTTTTATGCAATTTAATGTTCTTTTCAGCCAGTCTACCAGGTGTTTATGGATTGTCTACAGTTGGACT
TCAAGATTAATAATGTAAGTTTAACTTTTCCTTCAAATATAATTTCAAGCATCTACGGTGACGGCTAGAGCCAGCACCAACCCAGAAGG
TTCAAATGTAATGATTGAATGAAGATTGACTTTAGCTGCAGCATTACACTCAGTATTTATATTTGACTTGTGAAAAATGTTGATTTT
GTGACAGCAATTGTGTATGTACTGCCCTTTTGTACACCATCTTCTCATGTTATAGGCTTATGTTTCTTAAATATATCTGATAGCTT
TGGCTTTTTTCCCCCTCCTTGGTCTCCATATTGTTCTGGTTCGATATGTTTAGCGAAAAAATAAGGAGAAAAAGATGAAACAAAAAGT
ATGTTATAGAGAACTTATGGGATGCCATTTGGCCCTGGGATTTTAAATGGATTTCTTACCACCTTAACATTTAAATAAAAACTAA
AACTTGATGTGTATGTTATTCGGTAAAAATCTTAAAGACGGTGAAAAATTCAGTTATTATAAAATATTTTAAATATTGATTATTTAC
AAAATTCATATAATTATTTAATAATATGTGAAAAATATATATAAATATGAATGATATATATATATATAAGCTTATTTGAG
GGACACCCCTTGTAGCCCCACTCCGGAC-3'
```

图 3 特异性片段的测序结果

Fig 3 Sequencing result of specific fragment

根据测序结果, 应用 Oligo 6.0 软件进行分析, 考虑到引物设计中 GC 的含量, 设计了一对 26 bp 的正反链 SCAR 引物, 序列如下。

正链引物 SCW03: 5'-GTCCGGAGTGTCAACTATATCTATGT-3'; 负链引物 SCW03: 5'-GTCCGGAGTGGGGCTACAAGGGGTG-3'。

2.4 SCAR 标记在 F₁ 代群体中的验证

利用设计的 SCAR 引物——SCW03 对 52 株 F₁ 代群体 (23 株花粉可育, 29 株花粉不育) 进行 PCR 扩增、验证。部分结果见图 4, 表明大久保及 23 株花粉可育个体扩增出一条 906 bp 的特异性带,

重阳红及 29 株花粉不育个体无此带, 52 株后代中, 有 3 株重组, 且 3 株重组个体与 RAPD 引物 OPW03 扩增产生的重组个体完全一致, 说明此 RAPD 标记已被成功转化为 SCAR 标记, 是与桃花粉可育基因连锁的 SCAR 标记, 命名为 SCW03-906。

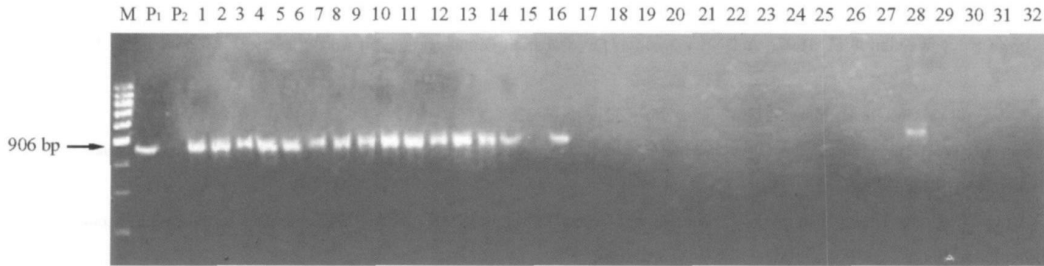


图 4 SCW03-906 引物在分离群体中 PCR 扩增结果

M: 200 bp DNA 标记; P₁: 大久保; P₂: 重阳红; 1~16: 可育个体; 17~32: 不育个体; 15、28: 重组个体。

Fig 4 The result of PCR amplification with primer SCW03-906 in separate population

M: 200 bp DNA marker; P₁: Okuba; P₂: Chongyanghong; 1 - 16: Fertility individuals

17 - 32: Sterility individuals; 15, 28: Recombinant individuals

3 讨论

我国桃的种质资源非常丰富, 但在基础研究方面, 如品种的选育、资源的开发和利用等与国外相比还存在一定的差距。目前, 在果树农艺性状基因分子标记的筛选和应用研究方面已取得了长足的发展, 将这些研究的成果充分应用到育种实践中, 可大大缩短育种年限, 提高育种效率, 解决果树育种过程中占地多、投资大的不足。

Warburton 等 (1996) 利用 BSA 法从桃与油桃杂交后代中筛选出与果肉硬质、离核、黄肉连锁的 RAPD 标记; 姚春潮等 (2005) 也利用 BSA 法获得了与猕猴桃雄性基因连锁的 RAPD 标记 S1032-850。

本研究获得的与桃花粉可育基因连锁的 RAPD 标记——OPW03-900, 经重复验证和 F₁ 代群体验证, 只有 3 株个体发生重组, 重组率较低 (5.77%), 符合分子标记辅助育种的要求, 这也是目前首次报道与桃花粉育性基因连锁 RAPD 标记转化成功的 SCAR 标记。

在利用特异引物 SCW03 扩增时, 发现退火温度对扩增的效果有一定的影响。该特异引物的 T_m 值分别为 58 和 69, 使用梯度 PCR 仪摸索最适宜的退火温度, 当退火温度在 60~67 时, 双亲及 F₁ 代群体全部或大部分都能扩增出特异性片段, 多态性消失; 当退火温度提高到 68 时, 在大久保、花粉可育 (除重组型个体) 的 F₁ 代群体中能稳定地扩增出一条 906 bp 的特异带, 而重阳红、花粉不育的 F₁ 代群体没有此带; 当退火温度高于 68 时, 双亲及 F₁ 代群体中有部分特异性片段消失, 甚至完全没有条带。因此, 最终确定退火温度为 68, 这与 Paran 和 Michelmore (1993) 研究的结果相似, 即将退火温度由 60 提高到 67 时, 多态性消失的片段又得到正确扩增。至于出现 SCAR 引物扩增对退火温度很敏感的原因可能由于引物的设计问题, 今后可以考虑在上、下游引物所测序列向内延伸一部分, 设计一对新的 SCAR 引物, 并优化反应体系中的各反应成分, 以便于将获得的 SCAR 标记更简便、稳定的应用。

由于获得的连锁标记位于桃花粉育性基因的一侧, 遗传距离大于 5 cM。今后的努力方向是寻找与其连锁更紧密的分子标记 (如 AFLP、SSR 等), 共同定位花粉育性基因, 最终实现早期对桃的花粉育性性状快速、准确的鉴定, 加速我国在桃花粉育性方面的选育进程。

References

- Blake M A. 1937. Progress in peach breeding. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 35: 49 - 53.
- Cao H N. 1999. Taxonomy of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] cultivars based on multivariate and RAPD analysis [Ph. D. Dissertation]. Korea: Hancheng Agriculture Life & Science University.
- Cheng F S, Brown S K, Weeden N F. 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *HortScience*, 32 (5): 921 - 922.
- Connors. 1927. Sterility in peaches. *Mem. Hort. Soc. NY*, 3: 215 - 222.
- Elisabeth D, Enrique G, Tarek J, Francesc G C, Patrick C. 2004. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *NAS*, 101 (26): 9891 - 9896.
- 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.
- Jing Shi-xi, Wu Lu-ping. 1996. Genetic basis of breeding in peach. In: Zhang Da-peng, Han Zhen-hai, Fang Zhi-yuan eds. *Year review in horticulture* (2). Beijing: Science Press. 15 - 46. (in Chinese)
- 景士西, 吴禄平. 1996. 桃育种的遗传学基础. 见: 张大鹏, 韩振海, 方智远主编. *园艺学年评* (2). 北京: 科学出版社: 15 - 46.
- Jun J H, Chung K H, Jeong S B, Lee H J. 2002. Identification of RAPD and SCAR markers linked to the flesh adhesion gene *F* in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Journal of Horticultural & Biotechnology*, 77 (5): 598 - 603.
- Michelmore R W. 1991. Identification of marker linked to disease-resistance gene by bulked segregate analysis: a rapid method detect marker in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9828 - 9832.
- Paran I, Michelmore R W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce using near-isogenic lines. *Genome*, 34: 1021 - 1027.
- 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. (in Chinese)
- 田义珂, 王彩虹, 戴洪义, 张继澍. 2004. 与苹果 *Co* 基因紧密连锁的 RAPD 标记的筛选及其 SCAR 标记转换. *遗传学报*, 31 (9): 919 - 925.
- Warburton M L, Becerra-Velasquez V L, Goffreda J C, Bliss F A. 1996. Utility of RAPD markers in identifying genetic linkages to genes of economic interest in peach. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 920 - 925.
- Xu Yan, Wang Yue-jin, Zhou Peng, Zhang Jian-xia. 2003. Identification of molecular genetic markers tightly linked to white rot resistant genes in Chinese wild grape. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (1): 6 - 10. (in Chinese)
- 徐炎, 王跃进, 周鹏, 张剑侠. 2003. 中国野生葡萄果实抗白腐病基因的分子标记. *园艺学报*, 30 (1): 6 - 10.
- Yang H, Korban S S. 1996. Screening apples for OPD20-600 using sequence-specific primers. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 263 - 266.
- Yang Ying-jun, Zhang Kai-chun, Li Rong-qi, Lin Ke, Yin Shu-Ping, Jiang Quan, Zhang Xiao-Ming. 2000. RAPD markers linked to nectarine gene and flesh color gene of peach fruit. *Acta Agriculture Boreali-Sinica*, 15 (3): 6 - 9. (in Chinese)
- 杨英军, 张开春, 李荣旗, 林柯, 尹淑萍, 姜全, 张晓明. 2000. 桃果实有毛/无毛、白肉/黄肉性状的 RAPD 分子标记. *华北农学报*, 15 (3): 6 - 9.
- Yao Chun-chao, Wang Yue-jin, Liu Xu-feng, Long Zhou-xia. 2005. Obtainment and application of RAPD marker S1032-850 linked to male gene in *Actinidia*. *Journal of Agriculture Biotechnology*, 13 (5): 557 - 561. (in Chinese)
- 姚春潮, 王跃进, 刘旭峰, 龙周侠. 2005. 猕猴桃雄性基因 RAPD 标记 S1032-850 的获得及其应用. *农业生物技术学报*, 13 (5): 557 - 561.
- Yu Ming-liang, Ma Rui-juan, Shen Zhi-jun, Zhang Zhen. 2006. Molecular markers linked to specific characteristics of *Prunus persica* (L.) Batsch. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (3): 511 - 517. (in Chinese)
- 俞明亮, 马瑞娟, 沈志军, 章镇. 2006. 桃果肉颜色、果皮茸毛和花粉育性性状的分子标记. *园艺学报*, 33 (3): 511 - 517.