

中华猕猴桃矮型性状EST-SSR连锁标记的筛选

徐小彪*, 姜春芽, 廖 娇, 辜青青, 刘善军, 陈金印

(江西农业大学农学院, 南昌 330045)

摘要: 以中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch) 矮型种质 ‘赣猕 5 号’ 为母本, 普通型中华猕猴桃 ‘奉雄 2 号’ 为父本构建 F₁ 群体, 采用优越而高效的基于表达序列标签 (Expressed Sequence Tags, EST) 的简单序列重复 (Simple Sequence Repeats, SSR) 标记技术, 结合群体分离分析法 (Bulked Segregant Analysis, BSA) 在荧光 DNA 测序仪 (ABI3130) 上进行了 ‘赣猕 5 号’ 矮型性状连锁的 EST-SSR 分子标记研究。结果表明, 通过本实验室开发并设计的 85 对 EST-SSR 荧光引物的扩增筛选, 其中引物 EST-Ad042 在亲本及其矮型与普通型 DNA 池之间扩增出一条 285 bp 的多态性片段, 经对其 F₁ 代分离群体部分矮型与普通型单株的随机验证, 该片段稳定出现, 在矮型植株中表现为有带, 在普通型植株中表现为无带。遗传连锁分析表明, 该标记与矮型基因之间的连锁距离为 8.8 cM。EST-SSR 荧光引物能够有效地筛选到中华猕猴桃的特异标记, 可以作为鉴别矮型与普通型植株的标记引物。

关键词: 猕猴桃; 矮型性状; EST 序列; SSR 标记

中图分类号: S 663.4

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 04-0553-06

Screening of EST-SSR Marker Linked to Dwarf Character in *Actinidia chinensis* Planch

XU Xiao-biao*, JIANG Chun-ya, LIAO Jiao, GU Qing-qing, LIU Shan-jun, and CHEN Jin-yin

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: High effective simple sequence repeats (SSR) marker based on expressed sequence tags (EST) and the method of bulked segregant analysis (BSA) on the automated fluorescent-labeled system (ABI3130) were employed to screen the molecular marker linked to dwarf gene in kiwifruit (*Actinidia* spp.) from the F₁ separating progenies obtained from the cross between dwarf cultivar ‘Ganmi 5’ (♀) and normal cultivar ‘Fengxiong 2’ (♂) of *Actinidia chinensis* Planch. Eighty-five pairs of fluorescent primers were designed and screened in the present study. The results showed that a polymorphic band of 285 bp amplified by primer EST-Ad042 was occurred both in the dwarf parent and in the dwarf cultivars of separating DNA pools but not in normal cultivar. Furthermore, the polymorphic band had been approved by stochastic amplification in the F₁ separating progenies including dwarf and normal genotypes, respectively. The genetic distance between the EST-SSR marker and dwarf gene could be 8.8 cM by genetic linkage analysis. The specific molecular marker of kiwifruit could be effectively mined by fluorescent EST-SSR primers, and the fluorescent primer EST-Ad042 could be utilized to

收稿日期: 2009 - 11 - 04; 修回日期: 2010 - 03 - 16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30660113, 30860167)

* E-mail: xiaobiaoxu@hotmail.com

identify its dwarf plant. The screening of molecular markers linked to dwarf gene in *Actinidia chinensis* Planch had been provided a basis for the studies of dwarf gene mapping and cloning in kiwifruit breeding program.

Key words: *Actinidia*; kiwifruit; dwarf character; EST sequence; SSR marker

猕猴桃搭架栽培是影响其生产效益的主要制约因素。因此,矮型性状是猕猴桃育种者和生产者关注的重要性状。‘赣猕5号’是中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch)自然实生的矮化突变体,株形紧凑,节间枝条短缩,冠幅小,矮型性状稳定,是矮化无架密植栽培的优良种质,也是猕猴桃矮型育种及观赏育种的良好亲本材料(毕诗忠等,2001)。

近年来,国内外学者在果树矮化性状方面开展了一些研究,利用不同的分子标记手段也标记定位了一些矮化相关的基因。毕晓颖等(2002)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。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。贾彦利等(2007)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S1172-940,并将其转换成了SCAR标记,即SCAR₉₄₀。田义轲等(2008)对来自西洋梨的矮化型突变基因*pcDw*进行了SSR分子标记研究,获得了一个与*pcDw*基因连锁距离为9.3 cM的SSR标记KA14₂₁₀,并将该基因定位到了梨品种Barlett遗传图谱的第16连锁群上。目前,新型的EST-SSR标记已成为重要农艺性状定位、基因作图、遗传多样性、比较基因组学研究的新型重要工具(Varshney et al., 2005)。据此,本研究中采用高效的基于EST的SSR标记技术,利用BSA法对中华猕猴桃矮型种质‘赣猕5号’的矮型性状进行鉴定与分析,旨在筛选出与中华猕猴桃矮型性状连锁的EST-SSR标记,以便为该矮型基因的定位与克隆奠定基础。

1 材料与方 法

试验材料为矮型中华猕猴桃‘赣猕5号’(母本, F; $2n = 2x = 58$)、普通型中华猕猴桃‘奉雄2号’(父本, M; $2n = 2x = 58$)及其F₁代。2007年9月采集F₁代种子。2008年2月播种,共获得F₁代幼苗171株。2008年11月, F₁幼苗植株生长基本停滞,此时进行F₁代单株的矮型性鉴定。以普通一年生实生苗的平均高度为对照,苗高低于其1/2的划分为矮化型。根据F₁代不同单株矮化型和普通型的分离比例,用卡方检验确定矮型基因的遗传方式。分别随机获取F₁代普通型分离个体(N)46株(编号为PT1~PT46)和矮型分离个体(D)46株(编号为AH47~AH92)作为矮型性状特异EST-SSR标记的验证材料。

采集新鲜嫩叶提取基因组DNA,采用CTAB法(Murry & Thompson, 1980)加以改进(徐小彪等, 2004)在0.8%琼脂糖凝胶上电泳检测DNA质量,将DNA模板浓度调至 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

PCR反应体系为 $15 \mu\text{L}$,内含模板DNA 20 ng , $10 \times \text{buffer}$ $1.5 \mu\text{L}$, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 $1.2 \mu\text{L}$, dNTPs $0.2 \mu\text{L}$,上游引物 $0.15 \mu\text{L}$,下游引物 $0.3 \mu\text{L}$, M13(序列GTTTTCCAGTCACGACGTTG)用量为 $0.3 \mu\text{L}$, *Taq* DNA聚合酶 0.2 U 。PCR反应程序为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min , $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 40 s ,经30个循环后, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 20 s , $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 20 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s , 12个循环,最后延伸 20 min , $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,试剂为上海博彩公司产品。基因池按照聚丙烯酰胺电泳的基因池及方法。PCR产物的检测采用荧光标记引物检测,引物合成时采用荧光FAM标记5'端寡核苷酸。荧光标记产物在DNA测序仪(ABI3130)上电泳并收集数据。

按照BSA(Michelmore et al., 1991)分析方法构建两个表型的基因池,矮型基因池(Dwarf Bulk, D)由10株矮化个体的等量DNA混合而成,普通型基因池(Normal Bulk, N)由10株普通

型个体的等量 DNA 混合而成。矮型母本 (F)、普通型父本 (M) 及两个基因池用于筛选与矮型性状连锁的 EST-SSR 分子标记。

用本实验室开发并设计的85对EST-SSR引物对两个基因池以及亲本进行多态性筛选, 两个基因池之间的多态条带如果在亲本间也同样存在, 则表明该多态性片段(条带)可能与目标性状连锁。为进一步验证其连锁关系, 用产生多态性的引物对F₁代单株进行验证。采用MAPMAKER/EXE 3.0软件对F₁分离群体中矮型性状和EST-SSR分子标记的分离数据进行连锁分析, 并计算遗传图距。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃两个基因池和亲本间的多态性分析

以矮型与普通型中华猕猴桃的近等基因池 (Bulk) DNA 为模板, 利用本实验室开发设计的85对猕猴桃荧光引物 (上海捷瑞合成) 在自动荧光DNA测序系统 (ABI3130) 进行EST-SSR分析。EST-Ad042的引物序列为: F5'-GTTAATTTGATCGGGATGG-3'; R5'-GAGGAGCTTGAGCTGCTAT-3' (重复基元: CAC)。研究表明, 引物EST-Ad042在矮型近等基因池中扩增出一条特异谱带, 片段大小为 285 bp (图1, D), 而在普通型近等基因池中未发现 (图1, N)。进一步经过验证亲本的研究表明, EST-Ad042在携带矮型基因的母本 (赣猕5号) 也扩增出位置相同的特异性条带 (图1, F), 而父本 (奉雄2号) 不存在 (图1, M)。

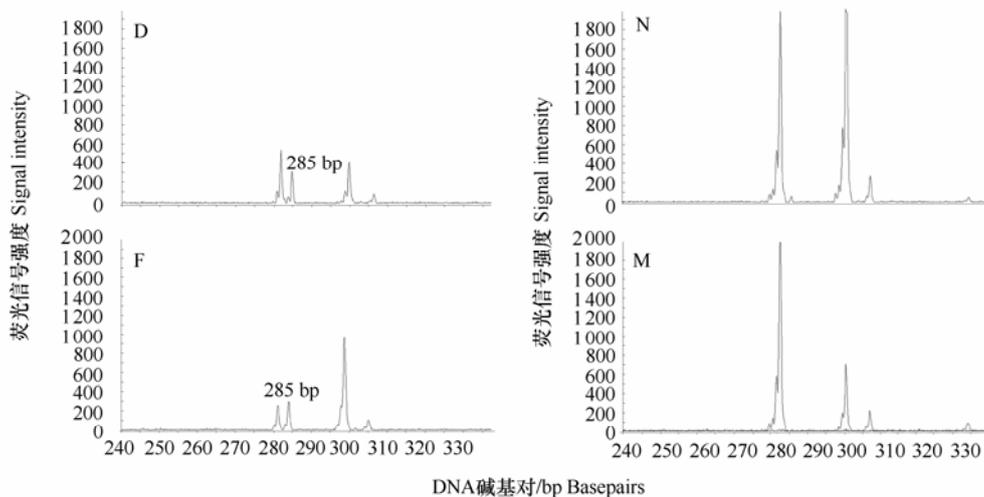


图1 引物EST-Ad042在对比基因池与亲本自动荧光测序系统中的扩增结果

D. 矮型基因池; N. 普通型基因池; F. 母本; M. 父本。

Fig. 1 Amplification in bulks and parents for primer EST-Ad042 on the automated fluorescent-labeled system

D. Dwarf bulk; N. Normal bulk; F. Female parents; M. Male parents.

2.2 猕猴桃EST-SSR标记引物的F₁代单株验证

在杂种F₁代群体中, 分别随机获取矮型和普通型猕猴桃单株进行EST-SSR标记引物的验证, 发现引物EST-Ad042在矮型单株AH53、AH54、AH58、AH59、AH88、AH89中均扩增出片段大小为285 bp的一条特异谱带 (图2), 而普通型单株中未出现该特异条带 (图3)。图3是引物EST-Ad042在杂种F₁代普通型单株PT9、PT11、PT13、PT24、PT25、PT33自动荧光测序仪中的扩增图谱, 结果表明在285 bp处未出现特异谱带。由此认为, EST-Ad042为矮型单株的特异性EST-SSR标记, 它与中华猕猴桃矮型性状紧密连锁, 可将该引物作为鉴别矮型和普通型植株的标记引物。

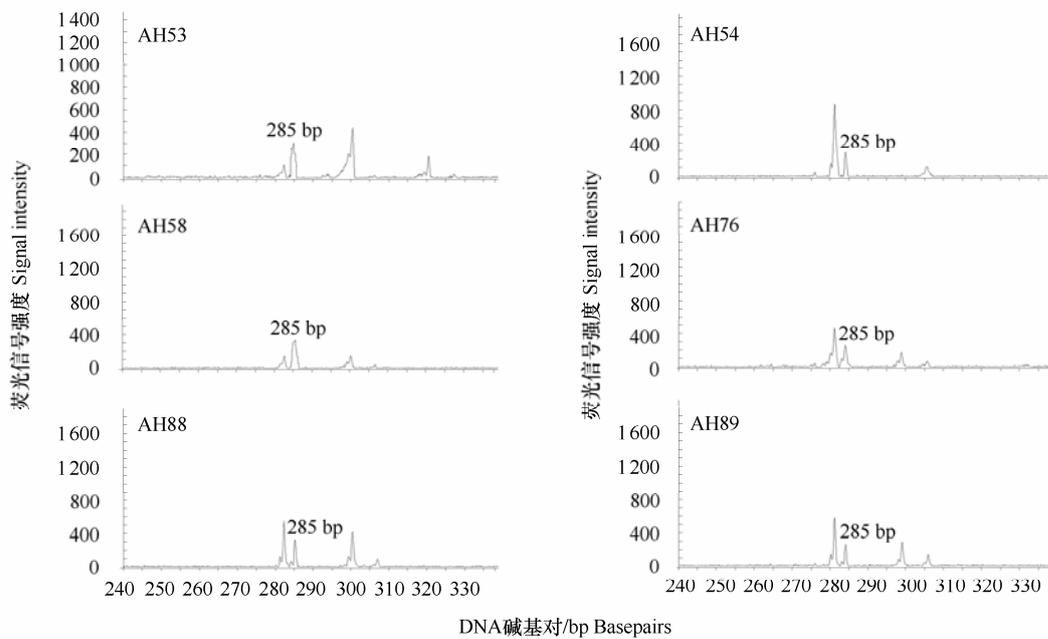


图2 引物EST-Ad042在部分矮型单株自动荧光测序仪中的扩增图谱

AH53、AH54、AH58、AH76、AH59、AH88、AH89 为F₁代矮型单株。

Fig. 2 Amplification of six F₁ dwarf plants for primer EST-Ad042 on the automated fluorescent-labeled system
AH53, AH54, AH58, AH76, AH59, AH88, AH89 indicated dwarf individuals of F₁ progenies.

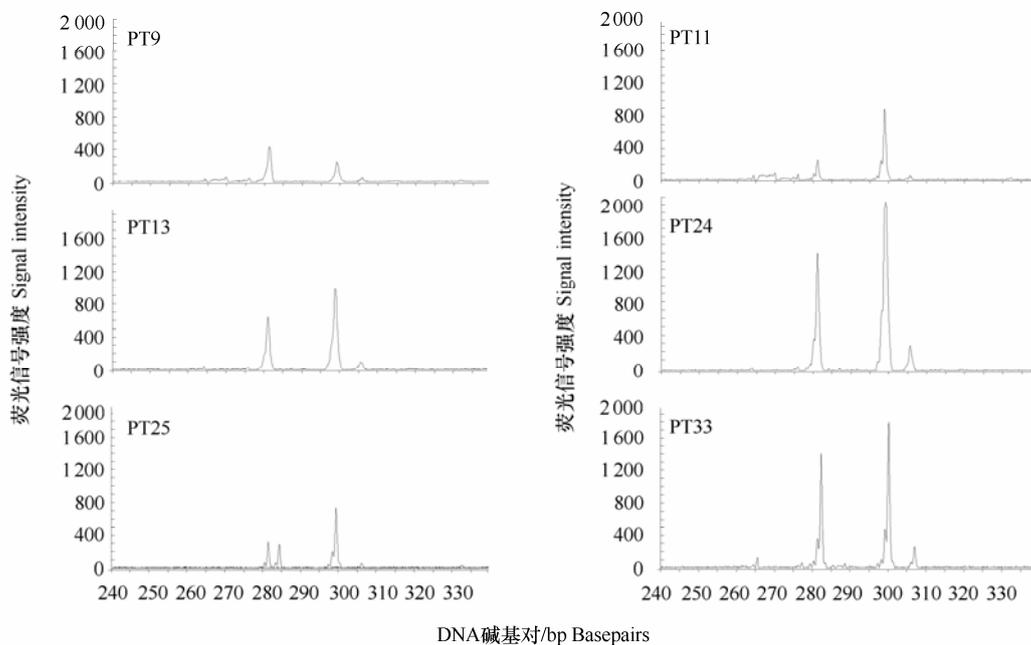


图3 引物EST-Ad042对部分F₁普通型单株自动荧光测序仪中的扩增图谱

PT9、PT11、PT13、PT24、PT25、PT33 为F₁代普通型单株。

Fig. 3 Amplification of six F₁ normal plants for primer EST-Ad042 on the automated fluorescent-labeled system
PT9, PT11, PT13, PT24, PT25, PT33 indicated normal individuals of F₁ progenies.

2.3 遗传连锁分析

将具有 285 bp 片段大小的个体与母本一起记为 1, 而不具有这个片段个体及父本记为 2, 矮型基因为理论值, 即所有矮型都记为 1, 所有普通型都记为 2。利用 MAPMAKER/EXE 3.0 软件对 F_1 分离群体中株高性状和分子标记的分离数据进行连锁分析。经卡方检验, F_1 代群体的矮化型单株和普通型单株符合 1:1 分离比例。

对符合 1:1 分离的拟测标记位点, 选用回交分析模型进行分析, 用 “group” 命令推测可能的连锁群 ($LOD \geq 3.0$), “order” 命令排序, 其它的标记用 “try” 命令进行追加, “compare” 排序, 最后将所有的位点标记一起进行连锁分析, 选用 F_1 自交分析模型进行分析。然后, 利用 Kosambi 函数将重组值转化为遗传图距, 构建出目标基因的局部遗传连锁图, 结果表明 EST-SSR 标记与矮型基因的遗传距离为 8.8 cM。

3 讨论

目前, 应用 EST-SSR 技术在寻找果树特异性状分子标记方面的研究尚未见报道, 但在柑橘 (Chen et al., 2006)、葡萄 (Scott et al., 2000)、扁桃 (Xie et al., 2006)、猕猴桃 (Fraser et al., 2004) 遗传多样性检测、黑杨 (张亚东 等, 2009) 品种鉴别以及苹果 (Silfverberg et al., 2006)、草莓 (Sargent et al., 2006) 遗传图谱构建等方面有相关研究。本研究中采用优越而高效的基于 EST 的 SSR 标记技术, 结合 BSA 法在荧光 DNA 测序仪上检测中华猕猴桃矮型与普通型 DNA 池的多态性, 筛选出与矮型性状连锁的特异标记。由于 BSA 分析要求将相同表型或基因型的个体混合, 这样才能将该表型或基因型有关的差异检测出来, 从而大大提高了筛选出与目标基因连锁的分子标记的可能性。通过本实验室开发并设计的 EST-SSR 荧光引物的扩增筛选, 从矮型与普通型对比 DNA 池中获得多态性引物 EST-Ad042, 经多次重复 PCR 扩增, 并对亲本和 F_1 分离个体进行验证, 结果表明这个多态性特异片段均稳定存在。

本试验检测中华猕猴桃矮型与普通型 DNA 池的多态性时, 发现引物 EST-Ad042 在矮型植株中表现为有带, 而在普通型植株中表现为无带, 这种现象在苹果矮化基因的 RAPD 标记 (毕晓颖 等, 2002; Tian et al., 2005) 和梨矮化基因的 SSR 标记 (田义轲 等, 2008) 中也出现了相似的结果。本研究采用基于 EST 的 SSR 标记技术, 结合 BSA 法该标记筛选出了与猕猴桃矮型性状连锁的特异标记。EST-SSR 标记来源于相对保守的转录区域, 较基因组 SSR 标记具有更高的通用性和保守性。EST-SSR 标记是基于表达序列标签数据信息, 并结合 SSR 标记特点开发出的一种新型分子标记, 通过 EST 数据库的发掘能够有效地筛选到基因水平的 SSR 标记 (Jiang et al., 2006)。EST-SSR 标记具有开发简便及成本低廉等优点, 具有快速构建遗传连锁图谱的巨大潜力, 可为功能基因研究奠定重要基础。本研究结果也证实 EST-SSR 引物能够有效地筛选到猕猴桃的特异标记, 可以作为鉴别矮型与普通型猕猴桃植株的标记引物。EST-SSR 标记作为一种新型的分子标记完全可以应用于猕猴桃分子生物学与功能基因组研究。

References

- Bi Shi-zhong, He Zhong-jun, Xing Zhen-song, Xu You-tao. 2001. A new kiwifruit variety, 'Ganmi 5'. *South China Fruits*, 30(5): 45. (in Chinese)
- 毕诗忠, 何中军, 幸珍松, 徐尤涛. 2001. 猕猴桃无架栽培新品种——赣猕 5 号. *中国南方果树*, 30(5): 45.
- 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.

- Chen C X, Zhou P, Choi Y A, Huang S, Jr F G G. 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 1248 - 1257.
- Fraser L G, Havrey C F, Crowhurst R N, De Silva H N. 2004. EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (6): 1010 - 1016.
- Jiang D, zhong G Y, Hong Q B. 2006. Analysis of microsatellites in *Citrus unigenes*. *Acta Genetica Sinica*, 33 (4): 345 - 353.
- Jia Yan-li, Wang Cai-hong, Tian Yi-ke, Dai Hong-yi, Wang Liang. 2007. A SCAR marker linked to *pcDw* gene in pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1531 - 1534. (in Chinese)
- 贾彦利, 王彩虹, 田义轲, 戴洪义, 王 亮. 2007. 梨矮化基因 *pcDw* 的一个 SCAR 标记. *园艺学报*, 34 (6): 1531 - 1534.
- Michelmore R M, Paran I, Kesseli R V. 1991. Identification of marker linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 9828 - 9832.
- Sargent D J, Clarke J, Simpson D W, Tobutt K R, Monfor A P, Vilanova S, Donoyes-Rothan B, Rousseau M, Folta K M, Bassil N V, Battey N H. 2006. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 1349 - 1359.
- Silfverberg D E, Matasci C L, Vande W E, Van Kaauwen M P W, Walser M, Kodde L P, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel C E, Costaf, Yamamoto T, Kppler B, Gessler C, Patocchi A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus×domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics and Genomes*, 2: 202 - 224.
- Scott K D, Egger P, Seaton G, Rossetto M, Rossetto M, Ablett E M, Lee L S, Henry R J. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 1: 723 - 726.
- 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.
- Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Jia Yan-li, Wang Liang, Dai Hong-yi. 2008. Location of a pear dwarf gene *pcDw* by SSR marker. *Journal of Fruit Science*, 25 (3): 404 - 407. (in Chinese)
- 田义轲, 王彩虹, 贾彦利, 王 亮, 戴洪义. 2008. 梨矮化基因 *pcDw* 的 SSR 标记定位. *果树学报*, 25 (3): 404 - 407.
- Varshney R K, Grnaer A, Sorrells M E. 2005. Genetic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23: 48 - 55.
- Xie H, Sui Y, Chang F Q, Xu Y, Ma R C. 2006. SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 366 - 372.
- Xu Xiao-biao, Chen Hua, Zhang Qiu-ming. 2004. Effects of different storing condition on total DNA extraction of kiwi fruit. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 26 (3): 321 - 323. (in Chinese)
- 徐小彪, 陈 华, 张秋明. 2004. 样品不同保存方法对猕猴桃总DNA提取效果的影响. *江西农业大学学报*, 26 (3): 321 - 323.
- Zhang Ya-dong, Hu Xing-yi, Song Cong-wen. 2009. Identification of populus varieties from Hubei Province by EST-SSR marker. *Molecular Plant Breeding*, 7 (1): 105 - 109. (in Chinese)
- 张亚东, 胡兴宜, 宋丛文. 2009. 利用新型分子标记 EST-SSR 鉴定湖北省内的主栽黑杨品种. *分子植物育种*, 7 (1): 105 - 109.