

苹果柱型基因 *Co* 的一个 AFLP 标记的 SCAR 转换

王彩虹^{1,2*} 王倩³ 戴洪义² 田义轲² 贾建航³ 束怀瑞¹ 王斌³

(¹ 山东农业大学园艺系, 泰安 271018; ² 莱阳农学院园艺系, 莱阳 265200; ³ 中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要: 将苹果柱型基因的一个 AFLP 标记成功地转换成了简单实用的 SCAR 标记。首先对 AFLP 标记片段进行序列测定, 然后根据序列特点设计了两对特异引物 CoA_1/CoA_2 和 CoA_1/CoA_3 , 每条引物长 20 bp。PCR 结果表明 CoA_1/CoA_2 可以扩增出 216 bp 和 148 bp 两条带, 其中 216 bp 的为柱型性状的特征带; CoA_1/CoA_3 可以扩增出 273 bp 和 205 bp 的两条带, 其中 273 bp 的为柱型性状的特征带。两对引物在杂交后代中扩增出的特征带与柱型性状的分离重组率都很低 (CoA_1/CoA_2 为 $6.3\% \pm 2.5\%$; CoA_1/CoA_3 为 $7.3\% \pm 2.6\%$), 所以它们都可以作为该 SCAR 标记的特异引物所用。

关键词: 苹果; 柱型基因 (*Co*); AFLP 标记; SCAR 标记

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 02-0100-05

苹果的柱型性状是与树型有关的一个优良性状, 很适合矮化密植栽培。研究已表明, 柱型性状是受显性单基因 (*Co*) 控制的质量性状^[1]。所以, 柱型苹果是进行苹果株型育种的一个重要的基因资源。我们已经用 BSA (bulk segregant analysis) 法筛选到了一个与 *Co* 基因连锁较为紧密的 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 标记 A^[2], 并获得了该标记片段的克隆^[3]。但是 AFLP 标记程序复杂, 试剂价格昂贵, 放射性同位素的使用往往会对人体和环境造成危害, 所以很难在育种实践中加以应用。因此, 本研究试图对 *Co* 基因的一个 AFLP 标记 A 实施 SCAR (sequence characterized amplified regions) 转换, 以期获得简单、廉价、适合大量样品分析的有效标记。

1 材料与方法

1.1 植物材料

苹果品种: 舞姿 (柱型) 和短枝富士。杂交群体: 1994 年以短枝富士为母本, 舞姿为父本进行杂交, 1995 年春播种, 1999 年从 F_1 代中以目测法选择柱型和非柱型个体共 96 株, 其中柱型、非柱型各 48 株。评判标准: 柱型——树体呈直立圆柱状, 枝条粗壮, 节间短缩, 很少分枝。非柱型——枝条细长, 与主枝夹角大, 节间长, 分枝较多。所有材料均种植于山东省莱阳农学院果树实验站。

1.2 方法

基因组 DNA 的提取采用改良的 SDS 法, 定量用溴化乙锭荧光强度法。

将含 AFLP 标记 A 片段克隆重组子的菌液送上海博雅公司进行测序, 然后根据测序结果设计合适的 SCAR 引物。引物的合成也由博雅公司完成。

SCAR-PCR 扩增体系为: 总体积 25 μ L, 内含 DNA 模板 25 ng, 0.5 μ mol/L 引物, 1U TaqE, 1.8 mmol/L $MgCl_2$, 100 μ mol/L dNTPs, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L。TaqE 和 dNTPs 均为上海生工产品。扩增程序: 94 $^{\circ}C$ 预变性 4 min, 然后 94 $^{\circ}C$ 45 s, 52 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 1.5 min, 28 个循环, 最后在 72 $^{\circ}C$ 下延伸 5 min。PCR 仪为 MJ-9600 型。

重组率和标准误差的计算参考 Yang 等^[4]的方法。

收稿日期: 2001-07-16; 修回日期: 2001-10-12

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y97D13072)

*通讯地址: 莱阳农学院园艺系, 265200。

2 结果与分析

2.1 AFLP 标记片段序列的测定

标记片段 A 的碱基序列如图 1 所示。该片段的长度为 346 bp，内含一个 68 bp 长的重复序列，重复部分之间首尾相接，重复频率为 2。在两个重复部分内有一个碱基不同。

5' GACTGCGTACCAATTCACCTTCAAAAAAATATGATCCATCAGGACTATCAGGTGGTTAGATACCTTTAGTCCGTTCAACCTTTGGCTTATT
TTGTTTACTTTTCTTTGTTTGTCTGAAGGTGATTTCATATGTCATGATTCCACCAGGTTATGACACTTGAAATGTGAACACCGGTTGATATTTGTATGG
TAA*AATCAAATTTAGATTCCACCAGGTTATGACACTTGAAATGTGAACACCGGTTGATATTTGTATGGTAG*AATCAAATTTAGAGTGATTTTATGCTA
CATTTGTTGAGTTTGAATTTGCATTTCAAATGTATTTCATAGTTACTCAGGACTCATC3'

图 1 *Co* 基因 AFLP 标记片段 A 的碱基序列
阴影部分为 AFLP 选择性扩增引物位置，下划线部分为重复片段
(* 两个重复片段中的唯一碱基突变)，黑体字部分为 SCAR 特异引物的设计位置。

Fig. 1 Base sequence of the AFLP marker fragment A of *Co* gene

Locations of AFLP selective amplification primers are in the shadow. The repeat parts were underlined
(* Indicator of the only one base mutation in these two repeat parts). The primer positions for SCAR are in bold.

2.2 SCAR 引物的设计及 PCR 特异扩增

根据片段 A 的测序结果设计一对各 20 bp 的正向引物和反向引物。由于要考虑引物中 GC 碱基的含量，设计引物的位置没有从片段的两个末端开始，而是向片段的中间靠拢了一部分。引物序列，CoA₁: 5' GATCCATCAGGACTATCAGG 3'; CoA₂: 5' TCAACCGGTGTTACATTTC 3'。

用该对引物在亲本及分离群体中进行 PCR 扩增，发现柱型亲本及柱型后代上出现了 216 bp 的带，而非柱型亲本及非柱型后代却无此带的扩增，说明 216 bp 的条带为柱型性状的特征带，可以用来检测苹果的柱型基因。另外还发现，无论是柱型还是非柱型，都有另一条较小的扩增带，该带的大小为 148 bp (图 2)。分析原因，可能有两个：一是与原 AFLP 标记片段的特殊结构有关。因为在 AFLP 标记片段 A 的碱基序列中包含一个 68 bp 的重复序列，CoA₂ 的位置正好在重复片段之内，那么它在标记片段上就有两个结合位点，因而有可能扩增出两个大小不同的片段来。二是 SCAR 标记一般是共显性标记，而本研究中所用的柱型个体又都为杂合体，所以也会出现这样的 SCAR-PCR 结果。但是扩增的两个片段大小相差约一个重复部分的长度，那么柱型类型与非柱型在基因组的该位点的差异极有可能就是这个重复片段的有与无。为了验证这一猜想，在重复片段外，又设计了另一反向引物 CoA₃: 5' TCAAACF

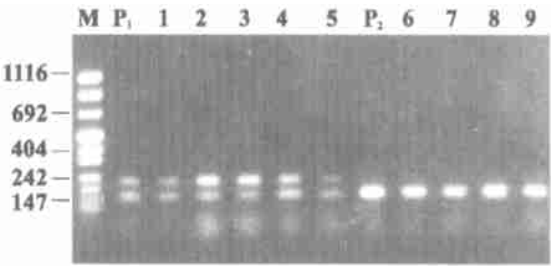


图 2 CoA₁/ CoA₂ 在短枝富士 ×舞姿 F₁ 分离群体中的扩增图谱

M. Marker (pUC Mix Marker); P₁. 舞姿; P₂. 短枝富士;
1 ~ 5. 柱型个体; 6 ~ 9. 非柱型个体。
(图中显示为分离群体中的部分个体，其它舍去。)

Fig. 2 Amplification of CoA₁/ CoA₂ in F₁ progeny of spur-type Fuji ×Telamon

M. Marker; P₁. Telamon; P₂. Spur-type Fuji;
1 - 5. Columnar individuals; 6 - 9. Noncolumnar individuals.
(Several individuals in the progeny were shown in this fig, others were deleted.)

表 1 SCAR 标记在短枝富士 ×舞姿 F₁ 分离群体中的共分离分析

Table 1 Co-segregation analysis of the SCAR marker in the F₁ progeny of spur-type Fuji ×Telamon

SCAR	个体数 Individual number		r	Se
	总数	柱型		
	Total	Columnar	Non-columnar	
CoA ₁ / CoA ₂	96	48 (3)	48 (3)	6.3 % 2.5 %
CoA ₁ / CoA ₃	96	48 (4)	48 (3)	7.3 % 2.6 %

注：r. 重组率；Se. 标准误；括弧内的数据为每一类型内标记与性状表现为重组的个体数。

Note: r. recombination frequency; Se. standard error; Data in the bracket is the number of individuals with recombination between the marker and the phenotype in each group.

CAACAAATGTAGC 3', 正向引物仍为 CoA₁。CoA₁/CoA₃ 的扩增图谱与 CoA₁/CoA₂ 相似, 但片段大小不同 (图 3)。柱型类型上扩出了 273 bp 的特异带, 而非柱型也同时扩出了另一较小的片段, 与 Marker 带的对比表明两个片段之间相差也为一个重复片段的长度。即引物 CoA₁/CoA₃ 扩出的较小的片段为 205 bp。这一研究结果进一步证实了原 AHP 标记片段内的重复部分是产生多态性的根源, 同时也确实显示了该 SCAR 标记是一个共显性的标记, 即杂合体上应同时具有柱型及非柱型的特征带, 而纯合体上应只有自己的特征带。

无论是 CoA₁/CoA₂ 还是 CoA₁/CoA₃, 扩增图谱中较大片段的带只在柱型类型上出现, 所以可以用来区分柱型个体与非柱型个体。可见, 两种引物组合都可以作为 SCAR-PCR 的特异引物所用。群体中的测验结果表明, 它们在判断苹果的柱型生长习性上具有很高的准确性, 正确率均在 90% 以上 (表 1)。然而研究中观察到两对 SCAR 引物判断的结果在个体间并不完全吻合, 这可能是 DNA 片段上不同位点在减数分裂形成配子时的交换值不同的缘故。



图 3 CoA₁/CoA₃ 与 CoA₁/CoA₂ 在短枝富士 × 舞姿 F₁ 分离群体中的扩增图谱比较

M. Marker (pUC Mix Marker); 1~8. 扩增引物为 CoA₁/CoA₂; 9~16. 扩增引物为 CoA₁/CoA₃;

1~4, 9~12. 柱型个体; 5~8, 13~16. 非柱型个体。(图中显示为分离群体中的部分个体, 其它舍去。)

Fig. 3 Comparison of amplified DNA band patterns between CoA₁/CoA₃ and CoA₁/CoA₂ on F₁ individuals of spur-type Fuji × Telamon

M. Marker; 1-8. Amplified by CoA₁/CoA₂; 9-16. Amplified by CoA₁/CoA₃; 1-4, 9-12. Columnar individuals;

5-8, 13-16. Non-columnar individuals. (Several individuals in the progeny were shown in this fig, others were deleted.)

3 讨论

SCAR 标记是一种十分稳定的分子标记, 在应用上具有迅速、简便、低成本的特点, 非常适合于样品的大量分析, 已开始在果树的性状筛选和资源研究上得到开发和利用^[5~7]。SCAR 标记一般是由 RHP、RAPD、AHP 等标记转换而来^[8~12], 其基本原理是根据已获得的标记片段的序列信息, 设计一对长度为 20 bp 左右的特异引物, 然后通过普通的 PCR 手段来揭示多态性。通常 SCAR 标记转换的成功率很低^[13]。RAPD 标记通常为 500~1500 bp, 相对容易转换成快速、稳定的 SCAR 标记^[14]。但 AHP 标记片段通常在 150~300 bp 范围, 不容易设计合适的 SCAR-PCR 特异引物。一般来说, AHP 标记的 SCAR 转换中, 引物的设计应包含酶切位点和选择性碱基。可根据这一原则设计的引物往往不能揭示任何多态性, 所以不能直接作 SCAR 标记所用。这种情况, 有时可通过 PCR 步行的方法分离 AHP 标记的相邻序列, 然后根据相邻序列信息设计合适的 SCAR 引物^[15]。另外, 对于 PCR 多态性消失的情况, 也有借助于限制性酶切 PCR 产物的办法来重新揭示多态性的例子^[16~18], 这也是一种快速简便的方法。分析本研究将 AHP 标记转换 SCAR 标记成功的原因: 主要是该 AHP 标记片段内完整的再现了多态性的来源——重复序列。对于这类标记, 很容易将其转换成共显性的 SCAR 标记。但是, 在本研究中, 根据该 AHP 的序列特点, 没有将 PCR 特异引物正好设计在片段的末端, 而是向片段内

移动了一段距离, 从而保证了引物中一定的 GC 碱基含量, 使得扩增时的退火温度不致于降得很低, 这就在很大程度上避免了非特异性的扩增。然而, 当引物的设计不是从 AHP 片段的两个末端位置开始时, 就会造成 SCAR 标记筛选结果与 AHP 分析不完全吻合。本研究中对个别个体上确实观察到这一现象。但是我们的主要目的是为了获得能用于育种群体辅助选择的简单标记, 只要所开发的 SCAR 标记在性状的判断上能达到较高的正确率即可。由于本研究中发展的苹果 *Co* 基因的 SCAR 标记, 在后代群体中的分离重组率较低 (CoA_1/CoA_2 : 6.3 % \pm 2.5 %; CoA_1/CoA_3 : 7.3 % \pm 2.6 %), 所以可用作苹果柱型性状早期筛选及鉴定的标记。但是对两种 SCAR 引物 CoA_1/CoA_2 和 CoA_1/CoA_3 来说, 后者比前者的扩增片段大, 电泳条带在胶上也距离 RNA 较远, 便于观察。因此建议在大量样品的快速筛选时最好选 CoA_1/CoA_3 作为 SCAR 标记的引物。

另外, 本研究所用群体的非柱型亲本是一种短枝型品种, 杂交后代有柱型、非柱型及二者之间的过渡类型, 为了保证分析结果的可靠性, 柱型和非柱型材料一定要选取极端类型。祝军等^[19]直接用柱型芽变品种威赛克旭与原始品种旭为试材来进行 *Co* 基因分子标记的筛选, 理应是一种很好的方法, 但是由于个体间的差异和地理上的演化, 这样获得的多态性片段最终还需要经过群体上的验证才能说明问题。从遗传特性来看, 群体的构建, 最好选用柱型品种和非柱型品种来杂交, 以避免后代分离复杂的状况。

参考文献:

- 1 Tobutt K R. Breeding columnar apple at East Malling. *Acta Horticulturae*, 1985, 159: 63 ~ 68
- 2 王彩虹, 王倩, 戴洪义, 等. 与苹果柱型基因 (*Co*) 紧密连锁的分子标记的筛选. *农业生物技术学报*, 2001, 9 (2): 187 ~ 190
- 3 王彩虹, 王倩, 戴洪义, 等. 与苹果柱型基因 (*Co*) 相关的 AHP 标记片段的克隆. *果树学报*, 2001, 18 (4): 193 ~ 195
- 4 Yang H Y, Krüger J. Identification of an RAPD marker linked to the *Vf* gene for scab resistance in apples. *Plant Breed*, 1994, 112: 323 ~ 329
- 5 Lahogue F, This P, Bonquet A. Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 950 ~ 959
- 6 Ling P, Duncan L W, Deng Z, et al. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, 100: 1010 ~ 1017
- 7 Nicolosi E, Deng Z N, Gentile A, et al. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, 100: 1155 ~ 1166
- 8 Roche P, Alston F H, Maliepaard C, et al. RFLP and RAPD markers linked to the rosy leaf curling aphid resistance gene (*Sd1*) in apple. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94: 528 ~ 533
- 9 Liu Z, Sun Q, Ni Z, et al. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat. *Plant Breeding*, 1999, 118: 215 ~ 219
- 10 Haymes K M, Van de Weg W E, Arens P, et al. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and north American strawberry genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2000, 125 (3): 330 ~ 339
- 11 Bradeen J M, Simon P W. Conversion of an AHP fragment linked to the carrot *Y2* locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 960 ~ 967
- 12 Kasai K, Morikawa Y, Sorri V A, et al. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ryadg* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, 2000, 43: 1 ~ 8
- 13 Horejsi T, Box M J, Staub E J. Efficiency of randomly amplified polymorphic DNA to sequence characterized amplified region marker conversion and their comparative polymerase chain reaction sensitivity in cucumber. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1999, 124 (2): 128 ~ 135
- 14 Barret P, Delourme R, Foisset N, et al. Development of a SCAR (sequence characterized amplified regions) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (*Bzh*) gene in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 828 ~ 833
- 15 Negi M S, Devic M, Delseny M, et al. Identification of AHP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, 101: 146 ~ 152
- 16 Caranta C, Thabuis A, Palloix A. Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genome*, 1999, 42: 1111 ~ 1116
- 17 Lu Z X, Sossey-Alaoui K, Reighard G L, et al. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 1999, 99: 115 ~ 122

- 18 Reamon-Büttner S M, Jung C. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. Theor. Appl. Genet., 2000, 100: 432~438
- 19 祝 军, 李光晨, 王 涛, 等. 威赛克柱型苹果与旭的 AFLP 多态性研究. 园艺学报, 2000, 27 (6): 447~449

Development of a SCAR Marker Linked to Co Gene of Apple from an AFLP Marker

Wang Caihong^{1,2}, Wang Qian³, Dai Hongyi², Tian Yike², Jia Jianhang³, Shu Huairui¹, and Wang Bin³

(¹ Department of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; ² Department of Horticulture, Laiyang Agricultural College, Laiyang 265200, China; ³ Genetic Institute of Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

Abstract : In this study, an AFLP marker of *Co* gene of apple was converted into a SCAR marker successfully. After sequencing of the AFLP marker fragment, two pairs of primers CoA₁/CoA₂ and CoA₁/CoA₃ were designed according to the nucleotide sequence. PCR results from apple genomic DNA showed that CoA₁/CoA₂ could amplify two bands with the size of 216bp and 148bp respectively, and the one of 216bp was the character band of columnar phenotype; CoA₁/CoA₃ could amplified two bands too, and the size was 273bp and 205bp respectively, the former one was the character band of columnar phenotype. Both of the two pairs of primers have high correct rate in judgment of columnar growth habit (>90%), so either of them can be served as special primers of this SCAR marker for rapid selection.

Key words : Apple; Columnar gene (*Co*); AFLP marker; SCAR marker

新书推荐

《英汉生物学词汇》(第二版)

本书是《英汉生物学词汇》1983年版的增修订本,是一部综合生物学各分支学科词汇的大型工具书。收有动物学、植物学、人体解剖学、组织胚胎学、微生物学、遗传学、细胞学、生物化学、生物物理学、时间生物学、生物工程、分子生物学、生态学等学科以及医学、农学的词汇,共约130 000条。

定价:99元(含邮费)

《汉英生物学词汇》

本书是一部汉英对照的中型工具书。收有动物学、植物学、人体解剖学、组织胚胎学、微生物学、遗传学、细胞学、生物化学、生物物理学、时间生物学、生物工程、分子生物学、生态学等学科以及医学、农学的名词,共约14万条。

定价:106元(含邮费)

《英汉生物化学及分子生物学词典》

本词典收集生物化学、分子生物学及与其相关的细胞生物学、免疫学、遗传学、微生物学及医药学等方面词条约21 000条,大部分词条附有简明释义。书中还收录一些缩写词和同义词,供读者查阅文献、翻译文章使用。

定价:88元(含邮费)

以上工具书可供大专院校师生、生物学各专业科技人员以及有关信息资料和翻译工作者参考。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编100081。