

# 基于梨贝壳杉烯氧化酶基因 *PpKO* 序列的功能性 SNP 标记

田义轲, 王彩虹\*, 白牡丹, 殷 豪, 李节法

(青岛农业大学园林园艺学院, 山东青岛 266109)

**摘 要:** 基于基因序列的功能性标记是基因分型、图谱定位和相关性状标记辅助选择的理想标记。以‘矮生梨’×‘荏梨’的梨杂交分离群体和 9 个梨栽培品种为试材, 以梨赤霉素合成代谢途径的关键酶基因——贝壳杉烯氧化酶基因 (*PpKO*) 的 cDNA 序列为基础, 设计 5 对 PCR 引物, 通过高通量熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 分析, 筛选到可对基因进行良好分型的 1 对引物。通过对杂种后代和测试品种的测序分析表明, 此对引物的扩增子是一个位于 *PpKO* 第 8 外显子上的长度为 200 bp 的序列, 从中共检测到两处单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 变化, 且均为非同义 cSNP。这两处 SNP 标记均可以作为适合高通量分析的遗传标记在遗传作图、基因定位或资源鉴定中加以利用。

**关键词:** 梨; 单核苷酸多态性; 功能性标记; 贝壳杉烯氧化酶基因

**中图分类号:** S 661.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 10-1876-09

## Development of Functional SNP Markers Anchored *PpKO* Gene in Pear

TIAN Yi-ke, WANG Cai-hong\*, BAI Mu-dan, YIN Hao, and LI Jie-fa

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

**Abstract:** The functional markers based on gene sequences are ideal markers for genotyping, gene mapping and marker assistant selection for associated traits. In this research, 5 PCR primer pairs were designed according to the cDNA sequence of *PpKO* gene in pear which codes the protein of ent-kaurene oxidase (KO), one of the key enzymes in the path of gibberellin synthesis. These primer pairs were tested in the population derived from the cross of ‘Aishengli’ × ‘Chili’ by high resolution melting (HRM) analysis, and one of them was selected for genotyping. Furthermore, the fine genotyping function of this primer pair was confirmed by 9 cultivars. Sequencing and comparison of amplicons from the progenies and the 9 cultivars showed that the primer pair could amplified a fragment of 200 bp in length, which located in the eighth exon of *PpKO* gene, with 2 non-synonymous SNPs (single nucleotide polymorphisms) detected. The two SNPs are genetic markers suitable for high resolution analysis, which are useful tools for genetic mapping, gene location and germplasm identification.

**Key words:** pear; single nucleotide polymorphism; functional marker; ent-kaurene oxidase gene

收稿日期: 2012-04-23; 修回日期: 2012-09-26

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (Y2008D51); 山东省良种工程项目; 山东省科技发展计划项目 (2011GNC11018)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chwang@qau.edu.cn)

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指在基因组水平上由单核苷酸的变异所引起的一种 DNA 序列多态性。SNP 在高等植物基因组中数量多, 分布广泛。例如在苹果基因组中平均每 149 bp 就有一个 SNP (Chagné et al., 2008), 在海岸松 (*Pinus pinaster* Ait.) 的基因组中平均每 102 bp 就有一个 SNP (Le Dantec et al., 2004), 在白花苜蓿 (*Lolium perenne* L.) 基因组中, 平均每 54 bp 就会出现一个 SNP (Cogan et al., 2006)。根据 SNP 在基因中的位置, 可分为基因编码区 SNPs (coding-region SNPs, cSNPs)、基因周边 SNPs (perigenic SNPs, pSNPs) 以及基因间 SNPs (intergenic SNPs, iSNPs)。位于基因编码区的 SNP 可能直接影响相关基因的表达水平和蛋白质结构, 因此, 在研究生物体的形态或性状变异及适应性进化方面具有独到的优势 (Kiyohara & Yoshimizu, 2007; Butcher et al., 2008; Chagné et al., 2008)。

SNP 一般只有两种碱基组成, 它是一种二态的标记, 非此即彼。SNPs 的二态性有利于对其进行基因分型, 在基因组筛选中往往只需检测 SNPs 位点的有无, 而不必关注片段的长度。因此, SNPs 适合自动化和规模化分析 (Rafalski, 2002)。

SNP 是目前最为精确的分子标记技术, 具有位点丰富、信息含量高、遗传稳定性高等特点, 可以用于遗传图谱构建、重要性状基因定位、比较遗传作图、遗传多样性分析和品种鉴别、分子标记辅助选择育种等方面 (Wu et al., 2008; Bus et al., 2010; Mammadov et al., 2010; Trebbi et al., 2011)。在苹果基因组上, 通过直接测序和生物信息学分析等方法, 已经开发了 300 多万个 SNPs。在最新整合的高密度分子遗传图谱上, 定位了 1 534 个 SNPs, 其中 34 个为基于表达序列的 SNPs (Troggio et al., 2012)。另外, 一个密集型的 SNP 微阵列刚刚构成, 可极大地促进遗传作图的效率 (Chagné et al., 2012)。

苹果和梨基因组间是相对应的高度保守的线性关系 (Celton et al., 2009)。因此, 苹果的 SNPs 研究成果无疑会对目前梨上正在进行的相关研究有重要的参考意义。

检测 SNP 的方法有多种, 如变性高效液相色谱法 (Caldwell et al., 2004)、单链构象多态性 (Martins-Lopes et al., 2001)、变性梯度凝胶电泳 (He et al., 1992) 等, 这些方法存在准确度不高、分辨率较低或者费用相当昂贵的缺点。高分辨率溶解曲线 (high resolution melting, HRM) 技术是近年来兴起的一种检测基因 SNP 的新技术。该技术是在 PCR 反应的基础上, 通过实时检测双链 DNA 熔解过程中由于与其结合的饱和荧光染料随着温度升高而脱离引起的荧光信号值的变化, 并借助专业性软件生成不同形状的熔解曲线来揭示核酸片段中的单碱基的突变 (Wittwer et al., 2003; 赵琼一等, 2010)。HRM 技术具有灵敏度高、特异性强、速度快、通量高、操作简便等优点, 已发展成为 SNP 基因分型、点突变筛查、SSR 标记分析等的重要手段 (Liew et al., 2004; Lehmsiek et al., 2008; 殷豪等, 2011; 赵均良等, 2011)。

研究发现, 赤霉素 (GAs) 与植物茎伸长生长密不可分, GAs 的生物合成途径发生阻塞是造成植物矮化的重要原因之一 (Yamaguchi, 2008)。在水稻上已经证实, 被认作“绿色革命”的品种 ‘Tan-Ginbozu (d35<sup>Tan-Ginbozu</sup>)’ 的半矮生性状就是由于 GAs 合成途径的关键酶贝壳杉烯氧化酶 (KO) 的活性受抑, 造成从内根 - 贝壳杉烯到内根 - 贝壳杉烯酸的三步氧化反应受阻引起的 (Itoh et al., 2004)。

在前期工作中, 李节法等 (2011) 已经从梨茎尖组织中克隆了一个编码贝壳杉烯氧化酶的基因 *PpKO*。本研究中欲以梨矮生性状的分离群体和自然状态下树体长势不同的白梨和砂梨品种为试材, 利用 HRM 技术, 以 *PpKO* 的编码序列为基础, 开发可对该基因进行快速分型的功能性 SNP 标记, 以便为该基因的遗传和定位研究提供有效工具, 同时对 SNP 位点变化是否与树体矮生效应相关的问题进行探讨。

# 1 材料与方法

## 1.1 植物材料

试材为‘矮生梨’(*Pyrus communis* L.) × ‘荏梨’(*P. bretschneideri* Rehd.) 杂种群体(共 94 个杂种后代), 亲本‘矮生梨’是西洋梨(*P. communis* L.) 矮生品种‘Nain Vert’的一个矮生型实生系, 9 个栽培品种分别是砂梨(*P. pyrifolia* Nakai) 系统的‘黄金梨’、‘二十世纪’、‘新高梨’和白梨(*P. bretschneideri* Rehd.) 系统的‘砀山酥’、‘鸭梨’、‘长把梨’、‘莱阳小香水’、‘栖霞大香水’、‘中香梨’。

## 1.2 基因组 DNA (gDNA) 的提取

2011 年, 于青岛农业大学莱阳果树试验站取各供试品种以及杂种单株春季萌动的幼芽, 带回室内, 剥去外层的鳞片, 称取约 0.1 g 样品, 采用改良的 CTAB 法提取并纯化基因组 DNA (Doyle & Doyle, 1987), 用紫外分光光度计 (Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences) 测定 OD 值, 计算 DNA 含量, 并将其稀释至工作浓度  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

## 1.3 茎尖 RNA 的提取与 cDNA 的合成

2011 年 5 月上旬, 分别从‘矮生梨’和‘荏梨’旺盛生长的新梢上采集茎端组织(梢端 2 cm 长的部分), 用改良的 CTAB 法提取总 RNA (Ksenija et al., 2004)。RNA 溶于 50  $\mu\text{L}$  的 DEPC 水中。取少量用于 RNA 质量和浓度的检测, 其余置于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱中保存备用。反转录反应参照试剂盒 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 说明书进行。

## 1.4 引物的设计

根据 GenBank 中注册的 *PpKO* cDNA 序列 (Accession No. HM003112), 在不同位置设计 5 对 HRM 分析引物, 设计软件为 Primer3 (v.4.0)。引物名称及序列见表 1。引物由上海生工公司合成。

表 1 基于 *PpKO* cDNA 序列的 HRM 引物设计  
Table 1 Primers designed for HRM analysis based on the cDNA sequence of *PpKO* gene in pear

引物名称 Primer	引物序列 5'-3' Primer sequences (5'-3')	PCR 扩增的目的片段大小/ bp The size of targeted PCR amplicons
<i>PpKOF1</i> <i>PpKOR1</i>	GGCCATGGTGACCAGATATT GTGTCGCTTCTGAGCATTCA	172
<i>PpKOF2</i> <i>PpKOR2</i>	CGAGTCCGAACCTCTTGGAA AGAAGTCTCTCCAATCAACC	167
<i>PpKOF3</i> <i>PpKOR3</i>	GATCGACGAGCAGAAGAAGC TAGCCCATTCGTTGTTACC	167
<i>PpKOF4</i> <i>PpKOR4</i>	CATATACGGGTGCAACATGG GTACAAATCCATCGGGTCGT	100
<i>PpKOF5</i> <i>PpKOR5</i>	CATATACGGGTGCAACATGG CAAACCTCTGCACCAACCTT	200

## 1.5 PCR 扩增及产物检测

分别以‘矮生梨’和‘荏梨’的 gDNA 和 cDNA 为模板, 用 5 对特异引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系是: 25  $\mu\text{L}$  反应体系中含有 DNA 模板 20 ng 或反转录的 cDNA 2  $\mu\text{L}$ , 正、反向引物各 0.2

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTPs  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* 酶  $1.2 \text{ U}$ 。

PCR 扩增程序是:  $94^\circ\text{C}$  4 min, 然后  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $64^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  60 s, 30 个循环, 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min, PCR 反应在 MJ Research PTC-200 PCR 扩增仪上进行。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经 EB 染色后, 于凝胶成像系统中观察记录。

## 1.6 高分辨率熔解曲线分析

HRM 分析在 LightCycler<sup>®</sup> 480 II 荧光定量 PCR 仪 (Roche) 上进行, 采用 96 孔反应模块。反应试剂为 LightCycler<sup>®</sup> 480 High Resolution Melting Master 试剂盒。反应体系为  $10 \mu\text{L}$ , 内含  $1 \times$  Master Mix、 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物、 $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA 模板。扩增程序采用降落 PCR (touchdown PCR) 模式:  $95^\circ\text{C}$  预变性 10 min, 然后按  $95^\circ\text{C}$  变性 10 s、 $60 \sim 55^\circ\text{C}$  (每循环下降  $0.5^\circ\text{C}$ ) 退火 15 s、 $72^\circ\text{C}$  延伸 12 s 的程序进行 45 个循环。扩增产物的熔解步骤在 PCR 循环结束后立即进行, 其程序为: 升温至  $95^\circ\text{C}$  1 min 后再降温至  $40^\circ\text{C}$  1 min, 然后再升温至  $65^\circ\text{C}$  1 s。从  $65^\circ\text{C}$  连续升温至  $95^\circ\text{C}$  的过程中, 每升高  $0.04^\circ\text{C}$ , 收集荧光 1 次。最后降温至  $40^\circ\text{C}$ 。

扩增子的熔解曲线由 LightCycler<sup>®</sup> 480 的 Gene Scanning 软件 (1.5 version) 在同一系统中自动生成。

## 1.7 SNP 标记的测序分析

对经 HRM 分型检测效果稳定的扩增子, 通过 PCR 扩增, 从琼脂糖凝胶上进行产物回收。回收试剂盒为 Agrose Gel DNA Recovery Kit Ver.2.0 (TaKaRa)。将回收产物克隆至 pMD<sup>®</sup>-18T Simple Vector 载体, 转化大肠杆菌 (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) 进行扩大繁殖。将经菌液 PCR 检测为阳性的克隆送上海生工公司测序。测序结果用 DNAMAN 软件进行比对分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 不同引物在 gDNA 及 cDNA 上的 PCR 扩增结果

用于 *PpKO* 编码序列上不同位置的引物 (表 1) 在 ‘矮生梨’ 和 ‘荏梨’ cDNA 上进行 PCR 扩增。结果 (图 1) 显示, 5 对引物均扩增正常, PCR 产物符合预测大小。

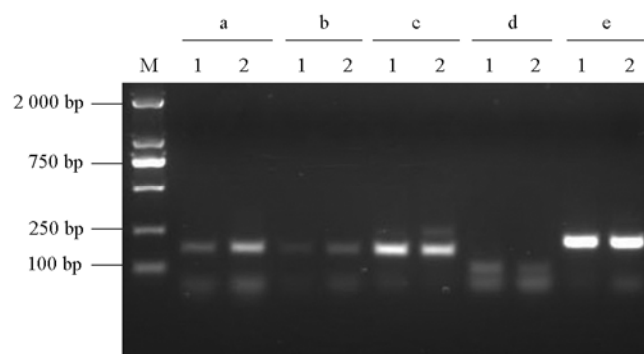


图 1 不同引物在 cDNA 上的 PCR 扩增检测

M: DL 2000 DNA marker; 1: 矮生梨; 2: 荏梨; a~e: 引物对 *PpKOF1/PpKOR1*、*PpKOF2/PpKOR2*、*PpKOF3/PpKOR3*、*PpKOF4/PpKOR4* 和 *PpKOF5/PpKOR5*。

Fig. 1 PCR amplicons' detection of cDNA amplified by different primer pairs

M: DL 2000 DNA marker; 1: Aishengli; 2: Chili; a~e: Represent *PpKOF1/PpKOR1*, *PpKOF2/PpKOR2*, *PpKOF3/PpKOR3*, *PpKOF4/PpKOR4* and *PpKOF5/PpKOR5*.

将 5 对引物在 gDNA 上进行 PCR 分析, 结果(图 2)表明, 引物对 *PpKOF2/PpKOR2* 和 *PpKOF3/PpKOR3* 在 gDNA 上的扩增片段均比 cDNA 上的大; 引物对 *PpKOF1/PpKOR1* 虽在 gDNA 上扩增出了与 cDNA 上大小相同的片段, 但出现了非目标条带。而引物对 *PpKOF4/PpKOR4* 和 *PpKOF5/PpKOR5* 在 gDNA 和 cDNA 同时扩增出大小相同的片段, 且无非特异性产物出现。因此, 选用 *PpKOF4/PpKOR4* 和 *PpKOF5/PpKOR5* 作为 *PpKO* 功能性 SNP 标记开发的候选引物对。

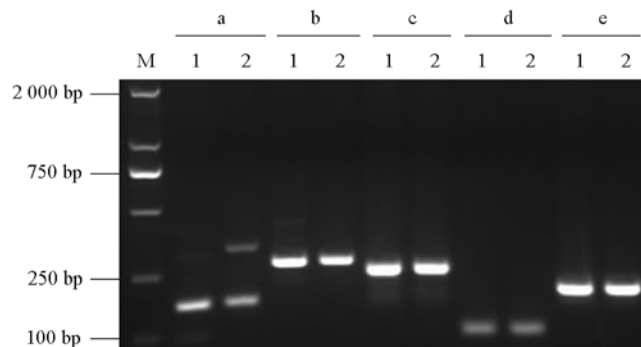


图 2 不同引物在 gDNA 上的 PCR 扩增检测

M: DL 2000 DNA marker; 1: 矮生梨; 2: 荳梨; a~e: 引物对 *PpKOF1/PpKOR1*、*PpKOF2/PpKOR2*、*PpKOF3/PpKOR3*、*PpKOF4/PpKOR4* 和 *PpKOF5/PpKOR5*。

Fig. 2 PCR amplicons' detection of gDNA amplified by different primer pairs

M: DL 2000 DNA marker; 1: Aishengli; 2: Chili; a~e: Represent *PpKOF1/PpKOR1*, *PpKOF2/PpKOR2*, *PpKOF3/PpKOR3*, *PpKOF4/PpKOR4* and *PpKOF5/PpKOR5*.

## 2.2 引物的群体分型研究

在‘矮生梨’×‘荳梨’杂种群体上的测试结果显示: 引物对 *PpKOF4/PpKOR4* 在所有样品上的扩增产物熔解曲线形状几乎完全一致, 无明显的归类(图 3, A), 表明在 *PpKO* 上的这一区域没有检测到碱基序列的多态性差异。而引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 在群体内样品间的扩增产物熔解曲线呈现两种明显不同的形状(图 3, B、C), 据此, 很容易对样品进行基因分型。图 3 中 A、B 和 C 各部分显示的样本相同, 是从总群体中随机抽取的部分杂种。扩增子间的差异既可以通过不同形状的标准化的随温度变化的熔解曲线形式来表示(图 3, B), 也可以通过其派生形式来显示(图 3, C)。在 PCR 多孔板上, 样品的排序和通道检测结果见图 4, 红、蓝色两组通道分别对应于图 3 中 B 和 C 部分相同颜色曲线组。利用引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 分析杂交群体的 94 个单株, 红色曲线组与蓝色曲线组的样品分型比例为 45:49, 卡平方( $\chi^2$ )测验分析表明, 这一结果符合 1:1 孟德尔分离比例。

## 2.3 引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 在梨品种上的多态性分析和 SNP 标记开发

利用引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 对 9 个栽培品种进行 PCR 扩增分析, 结果表明, 这 9 个品种归为明显的两类(图 5)。通过对引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 在‘矮生梨’、‘荳梨’及其两类分型的杂种(各抽取 5 株)以及另外的 9 个品种上扩增子(200 bp 片段)的测序分析, 发现该序列内存在两处单核苷酸变化(图 6)。对于‘矮生梨’×‘荳梨’的杂种群体来说, 其分型原因来自[A/G]处碱基变化, 与‘荳梨’归为一组的为 AA 纯合型, 与‘矮生梨’归为一组的为 AG 杂合型; 对于 9 个品种来说, 其分型原因来自[C/T]处碱基变化, 与‘黄金梨’归为一组的为 CC 纯合型, 与‘长把梨’归为一组的为 CT 杂合型。氨基酸序列分析发现, 这 2 处碱基变化均可导致编码氨基酸的改变, 所以二者均为与编码序列相关的非同义 cSNP 标记。对于杂种群体来说, 在[C/T]处碱基类型均为 C; 而对于 9 个品种来说, 在[A/G]处均为 A。

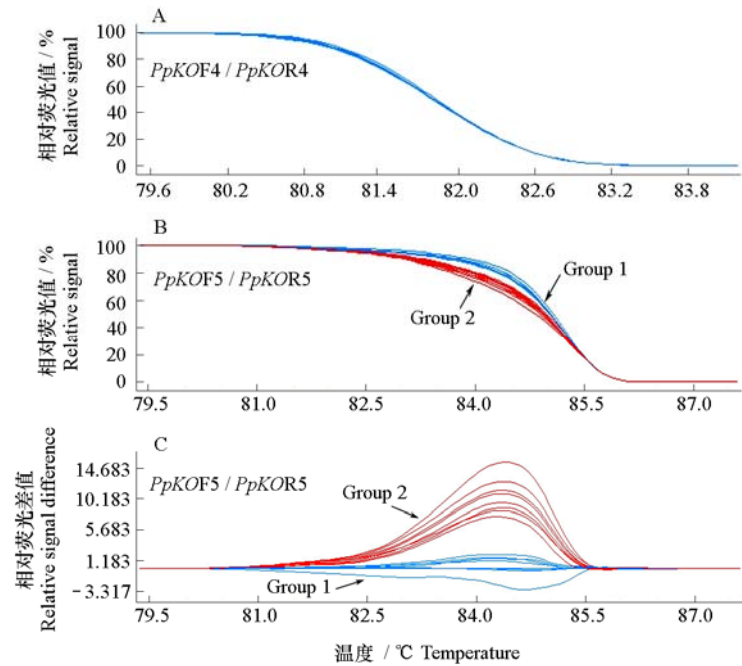


图 3 引物对 *PpKOF4/PpKOR4* 和 *PpKOF5/PpKOR5* 在‘矮生梨’和‘荳梨’及其 14 个杂种后代扩增子的熔解曲线  
标准化随温度变化的标准化熔解曲线图 (A、B) 及派生图 (C)。Group 1: 荳梨及 7 个杂种, 蓝色; Group 2: 矮生梨及 7 个杂种, 红色。

Fig. 3 The melting curves for amplicons of the 14 progenies derived from the cross of ‘Aishengli’ × ‘Chili’  
and the parental cultivars amplified by primers *PpKOF4/PpKOR4* or *PpKOF5/PpKOR5*

A, B: Normalized and shifted melting curves; C: Normalized and temp-shifted difference plot.  
Group 1 includes ‘Chili’ and 7 progenies, blue. Group 2 includes ‘Aishengli’ and 7 progenies, red.

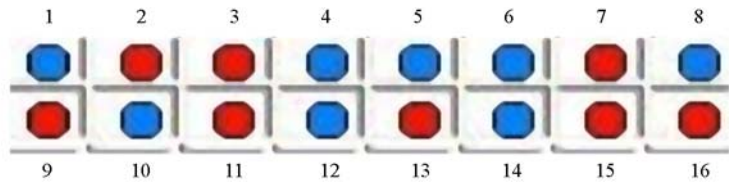


图 4 引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 扩增样品的通道检测结果

1 ~ 6 和 9 ~ 16: 14 个不同的来自矮生梨 × 荳梨组合的杂种后代; 7: 矮生梨; 8: 荳梨。

Fig. 4 The channel detection results of PCR products amplified by primer pair *PpKOF5/PpKOR5*

1 ~ 6 and 9 ~ 16: Fourteen different progenies produced by Aishengli × Chili; 7: Aishengli; 8: Chili.

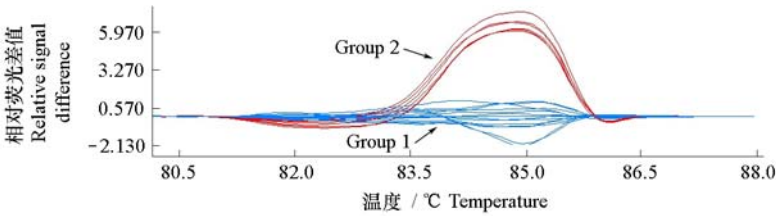


图 5 引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 在 9 个栽培品种上的 HRM 分型结果

Group 1: 黄金梨、二十世纪、新高梨、砀山酥、鸭梨、中香梨; Group 2: 长把梨、莱阳小香水、栖霞大香水。每个样品重复两次。

Fig. 5 Genotyping results of 9 cultivars by HRM using primer pair *PpKOF5/PpKOR5*

Group 1: Whangkeumbae, Nijisseiki, Niitaka, Dangshansu, Yali and Zhongxian;

Group 2: Changbali, Laiyang Xiaoxiangshui and Qixia Daxiangshui. Two duplicates for each sample.

CATATACGGGTGCAACATGGACAAGAACCGATGGGAAAGCCCGGAAGAATGGAAGCCAGAGAGGTTTTTG  
 GAACCAAAACACGACCCGATGGATTTGTACAAGACCATGGCATTGGAGCCCGAAAG[A/G]GGGTGTG  
 TGC[C/T]GGTTCACTTCAGGCAATGCTGATAGCGTGCACCTCCATTGGAAGGTTGGTGCAGGAGTTTG

图 6 引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 的扩增子序列

下划线部分为引物结合区；方括弧内为碱基变异。

Fig. 6 The amplicons sequence of primer pair *PpKOF5/PpKOR5*

The primers combined regions were underlined. The base changes were showed in square bracket.

### 3 讨论

SNP 是任何物种个体间存在的最为普遍的多态性 (Deschamps & Campbell, 2010)。在基因组 DNA 中, 在基因的编码区和非编码区均可能存在 SNP。位于编码区内的 cSNP 又可分为同义 cSNP (synonymous cSNP) 和非同义 cSNP (non-synonymous cSNP)。同义 cSNP 所致的编码序列的改变不会引起所翻译的蛋白质的氨基酸序列变化; 而非同义 cSNP 所致碱基序列的改变会使以其为蓝本翻译的蛋白质序列发生改变。因此, 非同义 cSNP 常是导致生物性状改变的直接原因 (刘越和吕社民, 2008; 杨永强 等, 2009), 开发并研究这类 SNP 标记往往具有更为重要的生物学意义。

利用物种间的共线性, 可以方便地揭示基因的外显子和内含子结构特征。例如, Blake 等 (2004) 通过小麦 cDNA—水稻 gDNA 的序列比对, 确定了小麦基因内含子的位置。鉴于梨和苹果基因组间高度的同源性和保守性, 将 *PpKO* 的 cDNA 序列在已公布的苹果基因组图谱 (Velasco et al., 2010) 中进行搜索, 发现该基因位于 chr8 上 (MDC036922.4)。通过 cDNA 序列与 gDNA 序列的比对, 发现该基因由 8 个外显子和 7 个内含子组成。本研究中, 由引物对 *PpKOF5/PpKOR5* 扩增产生的长度为 200 bp 的序列, 是位于第 8 外显子内的一段序列。因此, 在这段序列中, 本试验中筛查到的适合 *PpKO* 快速分型的 2 个 SNP 均为 cSNP。氨基酸序列分析结果表明, 它们也均为非同义 cSNP。

在‘矮生梨’×‘荏梨’的 F<sub>1</sub> 群体中, 杂种树体呈现明显的两类表型性状: 矮生与非矮生, 且分离比例为 1:1。尽管从该群体上开发的 SNP 标记分型比例也为 1:1, 但并未发现该 SNP 标记与矮生/非矮生性状间有明显的相关性。通常, 相对于白梨系统品种来说, 砂梨系统品种的树体相对矮小。但从 9 个栽培品种上开发的 SNP 的分型结果来看, 同一曲线组中, 既出现了砂梨品种, 又出现了白梨品种, 因此, 可以断定该 SNP 标记在砂梨系统和白梨系统间不具备物种特异性, 同时, 该 SNP 位点变化也不应对树体的生长量有明显的影响。至于本研究中所筛选到的这两处非同义 cSNP 能否有其它生物学效应, 到底能引起哪些性状的明显变化, 还需进一步探讨。

HRM 技术具有高通量、高检测灵敏性、且可真正实现闭管操作等特点, 适合 SNPs 位点的快速筛查。但 HRM 的检测结果只能作为判断是否存在 SNP 的初步依据, 它不能提供有关序列变化的详细信息。加之 HRM 对反应条件异常敏感, 有时会出现假阳性现象。因此, HRM 分析往往适合大量的初步筛查工作, 进一步结合测序技术来确认 SNP 是非常必要的。例如, 焦丽等 (2011) 用 HRM 技术, 对大豆异黄酮合酶基因的外显子区域进行 SNP 筛查, 并采用直接测序的方法对 HRM 检测结果进行了验证。兰青阔等 (2011) 用 HRM 技术结合测序方法, 筛选出可用于黄瓜纯度检验和品种鉴定的 3 个 SNP 位点。

本研究中, 通过 HRM 预先筛查手段并结合扩增子片段的测序, 揭示了位于梨 *PpKO* 序列内部外显子上的两个 cSNP 标记。尽管还未发现由其导致的明显的性状变化, 但这两个 SNP 标记至少可以作为适合 HRM 高通量分析的分子标记在遗传作图、基因定位或资源鉴定等方面发挥作用。

## References

- Blake N K, Sherman J D, Dvořák J, Talbert L E. 2004. Genome-specific primer sets for starch biosynthesis genes in wheat. *Theor Appl Genet*, 109: 1295 – 1302.
- Bus V G M, Bassett H C M, Bowatte D, Chagné D, Ranatunga C A, Ulluwishewa D, Wiedow C, Gardiner S E. 2010. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated mildew immune selection. *Tree Genet Genomes*, 6: 477 – 487.
- Butcher L M, Davis O S P, Craig I W, Plomin R. 2008. Genome wide quantitative trait locus association scan of general cognitive ability using pooled DNA and 500K single nucleotide polymorphism microarrays. *Genes, Brain and Behavior*, 7 (4): 435 – 446.
- Caldwell D G, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer G J, Marshall D F, Waugh R. 2004. A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.). *The Plant Journal*, 40: 143 – 150.
- Celton J M, Tustin D S, Chagné D, Gardiner S E. 2009. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. *Tree Genet Genomes*, 5 (1): 93 – 107.
- Chagné D, Crowhurst R N, Troggio M, Davey M W, Gilmore B, Lawley C, Vanderzande S, Hellens R P, Kumar S, Cestaro A, Velasco R, Main D, Rees J D, Leaaoni A, Mockler T, Wilhelm L, van de Weg E, Gardiner S E, Bassil N, Peace C. 2012. Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS ONE*, 7 (2): e31745. doi: 10.1371/journal.pone.0031745
- Chagné D, Gasic K, Crowhurst R N, Han Y P, Bassett H C, Bowatte D R, Lawrence T J, Rikkerink E H A, Gardiner S E, Korban S S. 2008. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of apple. *Genomics*, 92: 353 – 358.
- Cogan N O I, Ponting R C, Vecchies A C, Drayton M C, George J, Dracatos P M, Dobrowolski M P, Sawbridge T I, Smith K F, Spangenberg G C, Forster J W. 2006. Gene-associated single nucleotide polymorphism discovery in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Mol Genet Genom*, 276 (2): 101 – 112.
- Deschamps S, Campbell M. 2010. Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Mol Breed*, 25: 553 – 570.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 – 15.
- He S, Ohm H, Mackenzie S. 1992. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. *Theor Appl Genet*, 84: 573 – 578.
- Itoh H, Tatsumi T, Sakamoto T, Otomo K, Toyomasu T, Kitano H, Ashikari M, Ichihara S, Matsuoka M. 2004. A rice semi-dwarf gene, *Tan-Ginbozu* (*D35*), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, *ent*-kaurene oxidase. *Plant Molecular Biology*, 54: 533 – 547.
- Jiao Li, Liu Xiang-guo, Yang Chun-ming, Wang Hu-yi, Hao Dong-yun, Wang Qing-yu. 2011. Application of high resolution melting analysis in soybean *Ecotilling*. *Soybean Science*, 30 (5): 843 – 850. (in Chinese)
- 焦 丽, 刘相国, 杨春明, 王虎义, 郝东云, 王庆钰. 2011. 高分辨率溶解曲线分析技术在大豆 *Ecotilling* 中的应用. *大豆科学*, 30 (5): 843 – 850.
- Kiyohara C, Yoshimasu K. 2007. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: A meta-analysis. *Int J Med Sci*, 4 (2): 59 – 71.
- Ksenija G, Alvaro H, Schuyler S K. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol Biol Rep*, 22: 437a – 437g.
- Lan Qing-kuo, Zhang Gui-hua, Wang Yong, Zhao Xin, Zhu Zhu, Sun Yu-he, Guo Yong-ze, Cheng Yi. 2011. Discovery of single nucleotide polymorphism in cucumber based on high resolution melting analysis. *Molecular Plant Breeding*, 9 (5): 642 – 647. (in Chinese)
- 兰青阔, 张桂华, 王 永, 赵 新, 朱 珠, 孙玉河, 郭永泽, 程 奕. 2011. 基于高分辨率溶解曲线技术快速筛选黄瓜 SNP. *分子植物育种*, 9 (5): 642 – 647.
- Le Dantec L, Chagné D, Pot D, Cantin O, Garnier-Gere P, Bedon F, Frigerio J M, Chaumeil P, Leger P, Garcia V, Laigret F, de Daruvar A, Plomion C. 2004. Automated SNP detection in expressed sequence tags: Statistical considerations and application to maritime pine sequences. *Plant Mol Biol*, 54 (3): 461 – 470.
- Lehmensiek A, Sutherland M W, McNamara R B. 2008. The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theor Appl Genet*, 117: 721 – 728.
- Li Jie-fa, Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Tian Wei, Song Wei, Yin Hao. 2010. Cloning and bioinformatics analysis of *ent*-Kaurene oxidase gene *PpKO*



- in pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (10): 1575 – 1582. (in Chinese)
- 李节法, 田义轲, 王彩虹, 田 伟, 宋 伟, 殷 豪. 2010. 梨贝壳杉烯氧化酶基因 *PpKO* 的克隆及生物信息学分析. *园艺学报*, 37 (10): 1575 – 1582.
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*, 50 (7): 1156 – 1164.
- Liu Yue, Lü She-min. 2008. The mechanisms of gene function affected by single nucleotide polymorphism. *Chemstry of Life*, 28 (2): 214 – 216. (in Chinese)
- 刘 越, 吕社民. 2008. 单核苷酸多态性影响基因功能的机制. *生命的化学*, 28 (2): 214 – 216.
- Mammadov J A, Chen W, Ren R, Pai R, Marchione W, Yalcin F, Witsenboer H, Greene T W, Thompson S A, Kumpatla S P. 2010. Development of highly polymorphic SNP markers from the complexity reduced portion of maize (*Zea mays* L.) genome for use in marker-assisted breeding. *Theor Appl Genet*, 121 (3): 577 – 588.
- Martins-Lopes P, Zhang H, Koebner R. 2001. Detection of single nucleotide mutations in wheat using single strand conformation polymorphism gels. *Plant Mol Biol Rep*, 19: 159 – 162.
- Rafalski A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (2): 94 – 100.
- Trebbi D, Maccaferri M, de Heer P, Sørensen A, Giuliani S, Salvi S, Sanguineti M C, Massi A, van der Vossen E A G, Tuberosa R. 2011. High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor Appl Genet*, 123: 555 – 569.
- Troggio M, Gleave A, Salvi S, Chagné D, Cestaro A, Kumar S, Crowhurst R N, Gardiner S E. 2012. Apple, from genome to breeding. *Tree Genetics & Genomes*, doi: 10.1007/s11295-012-0492-9.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar S K, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, R I A D, Goremyki n V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald L M, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell J T, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu V T, King S T, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchiotti A, Kater M M, Masiero S, Lasserre P, Lepinasse Y, Allan A C, Bus V, Chagné D, Crowhurst R N, Gleave A P, Lavezzo E, Fawcett J A, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens R P, Durel C E, Gutin A, Bumgarner R E, Gardiner S E, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genet*, 42: 833 – 839.
- Wittwer C T, Reed G H, Gundry C N, Vandersteen J G, Pryor R J. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49 (6): 853 – 860.
- Wu S B, Wirthensohn M G, Hunt P, Gibson J P, Sedgley M. 2008. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theor Appl Genet*, 118: 1 – 14.
- Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 225 – 251.
- Yang Yong-qiang, Wang Wei-jie, Xu Chang-bo. 2009. Research progress of single nucleotide polymorphism. *Chemistry & Bioengineering*, 26 (8): 19 – 21. (in Chinese)
- 杨永强, 王巍杰, 徐长波. 2009. 单核苷酸多态性研究进展. *化学与生物工程*, 26 (8): 19 – 21.
- Yin Hao, Wang Cai-hong, Tian Yi-ke, Li Jie-fa, Wang Ran, Dai Hong-yi. 2011. Differentiation of microsatellites in pear by high resolution melting (HRM) analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1601 – 1606. (in Chinese)
- 殷 豪, 王彩虹, 田义轲, 李节法, 王 然, 戴洪义. 2011. 利用高分辨率熔解曲线 (HRM) 分析梨微卫星标记. *园艺学报*, 38 (8): 1601 – 1606.
- Zhao Jun-liang, Zhang Shao-hong, Liu Bin. 2011. Application of high-resolution melting curve analysis for molecular marker genotyping in rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (18): 3701 – 3708. (in Chinese)
- 赵均良, 张少红, 刘 斌. 2011. 应用高分辨率熔解曲线技术分析水稻分子标记基因型. *中国农业科学*, 44 (18): 3701 – 3708.
- Zhao Qiong-yi, Li Xin, Zhou De-gui, He Fei, Zhou Shao-chuan, Luo Da. 2010. SNP genotyping methods for crops in post-genomic era. *Molecular Plant Breeding*, 8 (1): 125 – 133. (in Chinese)
- 赵琼一, 李 信, 周德贵, 何 飞, 周少川, 罗 达. 2010. 后基因组时代下作物的 SNP 分型方法. *分子植物育种*, 8 (1): 125 – 133.