



耐盐绒毛白蜡特异性 SCAR 分子标记的鉴定

燕丽萍^{1,2,3},刘翠兰^{1,2},李丽^{1,2},孙超^{1,2},毛秀红^{1,2},
李双云^{1,2},赵梁军³,夏阳^{1,2*}

(1 山东省林业科学研究院,济南 250014;2 山东省林木遗传改良重点实验室,济南 250014;3 中国农业大学观赏园艺与园林系,北京 100193)

摘要:该研究以耐盐型和盐敏感型绒毛白蜡及其 F₁ 代为材料,采用混合品系分析法进行 RAPD 分析。结果显示:在随机选取的 150 个 10 碱基随机引物中,仅有引物 S20 在耐盐基因池和盐敏感基因池间扩增出特异而可重复的 592 bp 的多态性片段,命名为 S20-592。获得的 RAPD 标记 S20-592 经克隆、测序、重新设计一对特异性引物转化成更稳定的 SCAR 标记。通过 F₁ 代个体验证,耐盐型个体均能扩增出此差异条带而盐敏感型个体中不能扩增出此差异条带,证明该 SCAR 标记的特异引物可用于耐盐绒毛白蜡物种的快速分子鉴定。

关键词:绒毛白蜡;耐盐;RAPD 标记;SCAR 标记

中图分类号:Q789 文献标志码:A

Identification of Salt Tolerant *Fraxinus velutina* SCAR Molecular Marker

YAN Liping^{1,2,3}, LIU Cuilan^{1,2}, LI Li^{1,2}, SUN Chao^{1,2}, MAO Xiuhong^{1,2},
LI Shuangyun^{1,2}, ZHAO Liangjun³, XIA Yang^{1,2*}

(1 Shandong Provincial Academy of Forestry, Ji'nan 250014, China; 2 Shandong Provincial Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement, Ji'nan 250014, China; 3 Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 10019, China)

Abstract: In this experiment, the resistant plant, sensitive plant and the F₁ generation were used for identification of the molecular markers linked to salting tolerance gene of *Fraxinus velutina* by RAPD-BLA. The result indicated that 150 decamer random primers were used to amplify the DNA pools from the resistant plants and sensitive plants, only primer S20 could amplify a 592 bp specific fragment, and named S20-592. SCAR marker was developed from the RAPD marker S20-592 by cloning, sequencing and designing one pair of primers and the SCAR marker only presented in the individuals of the resistant plants. The fragment existed in the resistant plants and F₁ population, it was indicated that the SCAR primer can be used for rapid identification of salt tolerance *F. velutina* species.

Key words: *Fraxinus velutina*; salt tolerant; RAPD markers; SCAR markers

盐分是限制植物生长和产量的主要环境因素之一,土壤盐渍化是一个世界性问题。植物耐盐新品种选育,一直是国内外研究重点。绒毛白蜡(*Fraxinus*

velutina Torr.)为木犀科(Oleaceae)白蜡属(*Fraxinus* Linn.)落叶乔木,原产美国,生长快、树干通直、纹理美观、抗盐碱,是唯一盐碱地造林大乔木树种^[1-3]。但

收稿日期:2013-12-07;修改稿收到日期:2014-03-04

基金项目:山东省良种工程项目(鲁农良种字[2010]117号);山东省良种工程项目(鲁农良种字[2011]157号)

作者简介:燕丽萍(1980—),女,在读博士研究生,高级工程师,主要从事林木生物技术研究。E-mail:ylp_982@163.com

*通信作者:夏阳,博士,研究员,主要从事林草遗传育种研究。E-mail:xiayang0506@126.com

大多数绒毛白蜡不能在含盐量超过0.3%以上的盐碱地上正常生长和繁殖,山东省林业科学研究院选育的‘鲁蜡3号’品种,具有非常强的耐盐能力,能够在含盐量0.5%~0.6%条件下正常生长发育。该品种对沿海城市绿化和美化、位于盐碱地油田地区的绿化、盐碱地土壤改良具有重要作用。

传统的白蜡属植物分类主要依靠果实形状和果翅数目的不同,但该分类方法无法有效地在幼树早期进行应用^[4]。从形态学鉴定耐盐和盐敏感白蜡非常困难,尤其是从耐盐和盐敏感白蜡杂交后代筛选出耐盐个体,通常要进行生理测定和耐盐试验,耗时、费力且许多表型特征不稳定,并可能破坏植株;另外形态特征测量和生理指标测定结果时常出现误差。近年来,发展较快的分子标记与表型鉴定相比,具有不受环境条件和植物生长发育阶段影响、鉴定准确、多态性高、标记位点多且分布在整个基因组等优点,已成为植物遗传资源研究和辅助育种的重要手段,广泛应用于性状标记、基因作图和种质鉴定等方面^[5-14]。目前,在白蜡中已开发了核DNA微卫星、叶绿体微卫星、EST-SST等分子标记,主要应用于种群遗传分析^[15-17],尚无对绒毛白蜡植物耐盐性状进行分子标记快速鉴定的相关报道。本研究利用RAPD技术从中寻找具有特异性的条带,对这些条带进行克隆和序列分析,进一步设计特异引物,进行特异性PCR扩增,最终筛选出耐盐物种特异的DNA分子标记,并将其转化成稳定、可靠的SCAR标记,为白蜡耐盐种质的快速鉴定和白蜡耐盐育种提供准确的分子标记。

1 材料和方法

1.1 试验材料

耐盐绒毛白蜡品种‘鲁蜡3号’、‘鲁蜡4号’和5株盐敏感绒毛白蜡由山东省林业科学研究院东营分院刘德玺提供。‘鲁蜡3号’与‘鲁蜡4号’杂交F₁代种子由本课题组提供。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组DNA提取 采用CTAB法提取基因组DNA^[18],并略做改进,提取缓冲液中加入2%β-巯基乙醇和2%PVP。紫外分光光度法测定DNA的浓度和纯度,稀释至30 ng/μL。

1.2.2 基因池构建 根据混合品系分析法(Bulked Lines Analysis)的原理,将2株耐盐绒毛白蜡品种‘鲁蜡3号’、‘鲁蜡4号’和5株盐敏感绒毛白蜡分为2组,分别取等量DNA混成耐盐基因池和盐敏

感基因池。

1.2.3 RAPD分析 RAPD引物为S系列S1~S150(上海生物工程公司)。优化的RAPD扩增条件为:PCR反应体系为10×反应缓冲液2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.8 μL,10 mmol/L dNTPs 1.5 μL,30 ng/μL引物P 2 μL,模板DNA(20 ng) 2 μL,2 U/μL Taq DNA聚合酶0.25 μL,ddH₂O 14.95 μL总体积25 μL。PCR反应程序为95 °C预变性5 min,94 °C变性30 s,36 °C退火1 min,72 °C延伸2 min,循环44次,72 °C延伸10 min。取8 μL扩增产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳,GeneGenius全自动凝胶成像分析系统观察结果并照相。

1.2.4 RAPD片段的回收、克隆和测序 PCR扩增出的特异标记DNA片断经1.0%琼脂糖凝胶电泳后,用博大泰克生产的玻璃奶试剂盒回收、纯化,将其连接到pMD18-T Vector(TaKaRa),用热激法转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞(本实验室制备保存),进行重组质粒筛选。用碱法提取质粒DNA,通过PCR检测鉴定后委托上海生工公司测序。

1.2.5 RAPD-SCAR标记的转换 根据RAPD标记序列测序结果,通过Primer软件设计特异引物序列。引物合成由上海生物工程公司完成。SCAR-PCR反应体系为:总体积为25 μL,2×Taq PCR MasterMix(天根生化科技有限公司)12.5 μL,FS20-592(10 μmol/L)1 μL,RS20-592(10 μmol/L)1 μL,模板DNA(20 ng)2 μL,ddH₂O 8.5 μL。PCR反应条件为:94 °C预变性4 min,94 °C变性30 s,55 °C退火45 s,72 °C 1.5 min,循环30次,72 °C延伸10 min。扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 SCAR标记在F₁代种子苗中的验证 挑选饱满无病虫害‘鲁蜡3号’与‘鲁蜡4号’杂交F₁代种子400粒,消毒获得无菌种子苗。挑选生长一致的3叶1心种子苗连同根一起转接MS+5 g/L琼脂+30 g/L蔗糖+200 mmol/L NaCl养基中(pH值5.8),每瓶培养基中6株种子苗,共30瓶,培养40 d,调查记载单株的耐盐性和盐敏感性,进行SCAR标记验证。

2 结果与分析

2.1 绒毛白蜡耐盐相关的RAPD标记

用150个随机引物,分别对耐盐和盐敏感基因池进行RAPD扩增,发现只有S20(序列为GGAC-CCTTAC)引物的扩增产物在耐盐基因池和盐敏

基因池中表现多态性,经3次重复扩增,在两基因池间表现稳定、一致的差异。S20在耐盐基因池扩增出约592 bp特异条带(图1),而在盐敏感基因池缺失这条带。基于试验结果,初步认为S20扩增的片段可能是耐盐绒毛白蜡特有的。

2.2 RAPD 标记的克隆和测序

将PCR扩增出的特异片段S20-592纯化、克隆后,挑选2个克隆进行测序。结果表明,2个克隆DNA序列完全一致。来自引物S20的标记片段长度为592 bp,在该序列的两端均能找到相应的随机引物或其对应的互补结合序列(序列两端的下划线部分),进一步证实了克隆片段的正确性(图2)。

2.3 RAPD 标记 S20-592 的 SCAR 标记转换及验证

将RAPD标记S20-592进行SCAR转化时,根据测序结果,在原有的S20随机引物的基础上延伸了8~11个碱基,合成SCAR标记特异引物(图2箭头划线)FS20-592(5'-GGACCCTTACCAAATGACAAT-3')和RS20-592(5'-GGACCCTTACCGTGCAAC-3')。用该引物在耐盐‘鲁蜡3号’、‘鲁蜡4号’和盐敏感绒毛白蜡的5个单株中分别进行扩增。结果(图3)表明,在耐盐绒毛白蜡中扩增出592 bp特异条带,而

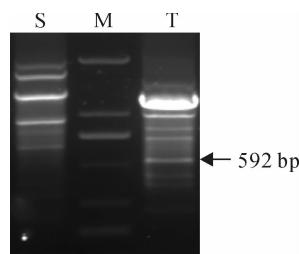


图1 引物S20在耐盐/盐敏感基因池的扩增结果

M. DL2000; S. 盐敏感基因池; T. 耐盐基因池

Fig. 1 PCR products in tolerant/susceptible bulked DNA

M. DL2000; S. Susceptible bulked DNA;

T. Tolerant bulked DNA

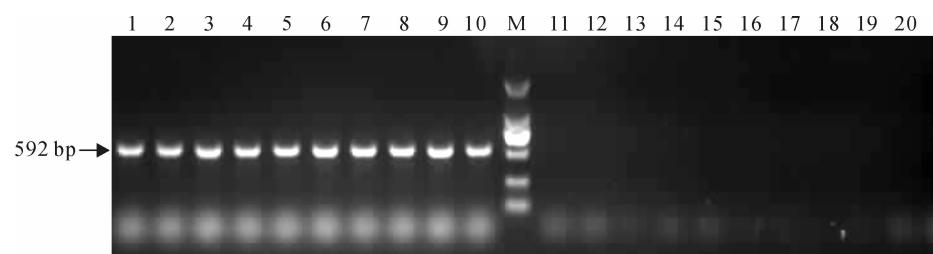


图4 标记片段 S20-592 在部分样品上的 SCAR-PCR 扩增结果

M. DL2000; 1~10. 耐盐样品; 11~20. 盐敏感样品

Fig. 4 Results of SCAR-PCR for marker fragment S20-592 in some samples

M. DL2000; 1~10. Tolerant samples; 11~20. Susceptible samples

在盐敏感绒毛白蜡单株中未扩增出特异条带,S20-592标记片段仍表现出原有的多态性,表明可用于分子辅助育种的鉴定与选择,本研究并获得国家发明专利^[19]。

2.4 SCAR 标记的验证

F₁代种子苗在耐盐培养基上生长40 d,挑选10株叶片全绿、生长良好的耐盐株系,取10株发育迟

Forward primer
GGACCCCTAACCAATGACAATCAATTCTATGTGCTGGTTGTCGTGGAAAA
 CTGGATTACTTGCTATGCCATAGCAAATGACTATTACAGAACAAACAGCAGG
 TCTGGGTGATCAATTGCAAGTTTCAATATAGTTTGGCCATGTAACCTCA
 CGGACGGCTGCGCATTGATCTGTATTCACTCAGCTTCAAGATCTTGATACA
 GTGTGTTGCTTCTGGACTTCCATGACACAAGGAAATTGCCAAAAAGATACAA
 TATCCTGAATCGACTGCTTGTATCCGAACATGCTGCCGATCAGCATCACAA
 CAACCTTTGAGCAGAAAGATCAGATTGCTAGAAATGATAACCCCTGCTTGTGATG
 AGTTCTACAGATACTTAGCGGTGATAACTGCTCCAGATGAGACTGCTTGG
 GGACTGAAGGAATTGACTCAGAACCTTGACAGGATAAAATCTGGCTTGG
 AATAGTTAGGTACAAAATCCTCCAAACAAGCCTTTGTAGGCATTAAGATCATCT
 ACAGGGCTCTCTCATCCTTCAACTTTAGGTGACGGTAAGGGTCC

Reverse primer

图2 RAPD 标记片段 S20-592 序列

划线部分为 S20 引物结合位点;箭头方向为

FS20-592 正向引物和 RS20-592 反向引物

Fig. 2 The sequence of RAPD marker S20-592

S20 primers binding sites are lined; Arrows represent forward primer(FS20-592) and reverse primer(RS20-592)

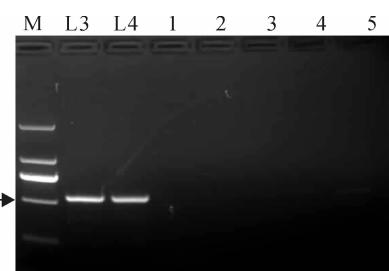


图3 SCAR 在单株中的 PCR 扩增结果

M. DL2000; L3. 鲁蜡 3 号; L4. 鲁蜡 4 号; 1~5. 盐敏感绒毛白蜡

Fig. 3 The PCR products amplified

with SCAR primer in parents

M. DL2000; L3. Lula 3; L4. Lula 4; 1~5. Susceptible plants

缓、叶片发黄的盐敏感植株。分别以提取的 DNA 为模板进行 SCAR 分析。从图 4 中可见,对耐盐株系分别以 SCAR 特异性引物进行扩增,结果分别扩增出了特异性谱带;而在盐敏感株系的扩增产物中都没有扩增出任何产物。进一步证实了 SCAR 标记检测的可靠性,该标记可用于耐盐绒毛白蜡分子标记的辅助选择育种。

3 讨 论

RAPD 作为一种分子标记,其扩增条带稳定性较差一直是影响其广泛使用的制约因素。张建珍等^[20]鉴定了稻蝗属(*Oxya* Audient-Serville)特异的 RAPD 条带,基于该条带序列设计的特异引物可用于稻蝗属物种的快速分子鉴定,克服了 RAPD 重复性差的问题。Mikhailova 等^[21]在用 RAPD 对 2 个形态上极为相似的姊妹种进行分析时,发现种特异性的分子标记,经序列测定和特异引物设计,得到一个 SCAR 分子标记可用于这两个形态上相似物种的快速准确鉴定。Yu 等^[22]将白菜抗霜霉病 RAPD 标记 K14-1030 转化为简单易行的 SCAR 标记。SCAR 标记是 Paran 等^[23]提出的,首次在 RAPD 标

记基础上进行转化并应用。虽然 RAPD 标记和 SCAR 标记均可以有效地检测出育种材料中的目的 DNA,但是 RAPD 标记对反应条件的灵敏性使得其结果远没有 SCAR 标记的结果快速、准确、可靠。SCAR 标记非常稳定,在应用上具有快速、简便、成本低的特点,解决了 RAPD 标记的不稳定和 AFLP 标记的繁琐、高成本,是辅助选择育种中较为理想的标记之一。

本实验采用 RAPD 标记-混合品系分析法来检测绒毛白蜡耐盐株系和盐敏感株系的多态性,发现随机引物 S20 可在绒毛白蜡耐盐株系扩增出一条稳定的条带。经对耐盐绒毛白蜡株系的 S20 扩增片段克隆测序,进一步基于序列设计特异引物,进行特异 PCR 检验,结果表明:耐盐绒毛白蜡扩增出稳定的目的条带,而盐敏感绒毛白蜡无任何扩增条带。说明笔者鉴定的 SCAR 分子标记是耐盐绒毛白蜡物种特异的,可用于绒毛白蜡物种的快速鉴定,即可有效鉴定材料的耐盐性,为绒毛白蜡分子标记辅助选择育种体系奠定了基础。因此,本研究通过 SCAR 标记可对个体进行苗期鉴定,大大提高了育种效率,缩短了育种进程。

参考文献:

- [1] WU Y B(吴永波), XUE J H(薛建辉). Impacts of salt stress on the growth and photosynthesis of three *Fraxinus* species[J]. *Journal of Nanjing Forestry University*(南京林业大学学报), 2002, **26**(3): 19—22(in Chinese).
- [2] WANG Q(王勤), DING SH Q(丁神奇). Introduction and seedling test of *Fraxinus americana* and *Fraxinus velutina*[J]. *China Forestry Science and Technology*(林业科技开发), 2000, **14**(5): 42—43(in Chinese).
- [3] LIU D X(刘德玺), WANG Y P(王友平), SUN M G(孙明高), et al. The study on distribution of salty ions in vegetative organs of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh with different tree ages[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*(四川农业大学学报), 2008, **26**(3): 263—265(in Chinese).
- [4] HONG Y P(洪亚平), DAI Z W(代子闻), CHEN ZH D(陈之端), et al. Corroboration of 3-carpel ovary of *Fraxinus* Linn(Oleaceae) and its systematic significance[J]. *Journal of Henan Forestry Science and Technology*(河南林业科技), 2004, **24**(1): 42—43(in Chinese).
- [5] WANG L(王亮), WANG C H(王彩虹), TIAN Y K(田义轲), et al. A SCAR molecular marker related to leaf shape of fig (*Ficus carica*)[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2009, **45**(6): 157—161(in Chinese).
- [6] WU S Q(吴松权), GUAN Q J(管清杰), QUAN X L(全雪丽), et al. Establishment of SCAR marker linked to *Tricholoma matsutake*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2009, **43**(10): 150—153(in Chinese).
- [7] SILFVERBERG D E, MATASCI C L, VAN DE WEG W E, et al. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) genome[J]. *Tree Genetics & Genome*, 2006, **2**: 202—24.
- [8] DING G H(丁国华), QIN ZH W(秦智伟), ZHOU X Y(周秀艳), et al. A Novel RAPD and SCAR marker of the resistant gene for downy mildew in cucumber[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2007, **27**(9): 1 747—1 751(in Chinese).
- [9] LIU CH(刘成), LI G R(李光蓉), YANG Z J(杨足君), et al. Specific DNA band isolation and SCAR marker construction of rye genome [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2006, **26**(12): 2 434—2 438(in Chinese).
- [10] JIANG L J(姜立杰), YANG Y J(杨英军), ZHANG X M(张晓明), et al. SCAR marker linked to the peach / nectarine in peach[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2005, **32**(6): 1 003—1 007(in Chinese).
- [11] LI W B(李伟波), MA M(马明), SUN C(孙翠), et al. Development of a SCAR marker linked to precocious trait in walnut (*Juglans regia*)[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2010, **46**(3): 56—61(in Chinese).

- [12] LIAO Y(廖毅), SUN B J(孙保娟), SUN G W(孙光闻), et al. AFLP and SCAR markers associated with peel color in eggplant[J]. *Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)*, 2009, **42**(11) : 3 996—4 003(in Chinese).
- [13] LAHOGUE F, THIS P. Bouquet A1 identification of a co-dominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, (97): 950—959.
- [14] NAQVI N I, CHATTOO B B. Development of a sequence characterized amplified region(SCAR) based indirect selection method for a dominant blast resistance gene in rice[J]. *Genome*, 1996, **39**(1) : 26 — 30.
- [15] BACLES E, ENNOS R A. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape [J]. *Heredity*, 2008, **101**: 368—380.
- [16] HEUERTZ M, FINESCHI S, ANZIDEI M, et al. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe[J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**(11) : 3 437—3 452.
- [17] GOTO S, SHIMATANI K, YOSHIMARU H, et al. Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* revealed by microsatellites[J]. *Molecular Ecology*, 2006, **15**(10) : 2 985—2 996.
- [18] 萨姆布鲁克(Sambrook. J.), 拉塞尔(D. W.). 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 55—60.
- [19] 燕丽萍, 夏 阳, 刘翠兰, 等. 耐盐绒毛白蜡 SCAR 标记及其在辅助选择育种中的应用: 中国, ZL 201210006441.3[P]. 2013-03-06.
- [20] ZHANG J ZH(张建珍), LI D Q(李大琪), LI T(李 涛), et al. Identification of Oxya-specific SCAR molecular marker[J]. *Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)*, 2010, **43**(23) : 4 834—4 839.
- [21] MIKHAILOVA N A, GRACHEVA Y A, BACKELJAU T, et al. A potential species-specific molecular marker suggests interspecific hybridization between sibling species *Littorina arcane* and *L. saxatilis* (Mollusca, Caenogastropoda) in natural populations[J]. *Genetica*, 2009, **137**(3) : 333—340.
- [22] YU S C, ZHANG F L, ZHAO X Y, et al. Sequence-characterized amplified region and simple sequence repeat markers for identifying the major quantitative trait locus responsible for seedling resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)[J]. *Plant Breeding*, 2011, **130**(5) : 580—583.
- [23] PARAN I, MICHELMORE R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce[J]. *Appl. Genet.*, 1993, **85**(8) : 985—993.

《西北植物学报》2013 年审稿专家名单 (以姓氏笔画为序)

于澄宇	韦毅刚	王卫卫	王幼芳	王军辉	王孝安	王玛丽	王彦荣	王俊儒
王振林	王得祥	甘立军	申家恒	田 琰	田惠桥	叶绍明	朱志红	朱瑞良
巩振辉	刘文哲	刘占林	刘曙东	乔玉山	孙广玉	孙庆泉	李玉红	李世清
李忠虎	李宽意	李登科	李鹏民	初庆刚	杨洪强	邱全胜	吴 卫	吴振海
陈 鹏	陈 铭	陈兴福	陈贵林	张文辉	张元明	张宏利	张绍铃	张宪春
张恩慧	张硕新	张继澍	宋于洋	宋玉霞	沈应柏	郁 飞	肖炳光	周 军
於丙军	林雁冰	罗 建	洪棋斌	胡小平	胡正海	胡胜武	胡银岗	胡春香
贺军民	饶广远	饶景萍	赵 桦	赵长明	赵利清	赵建成	赵铭钦	赵继新
赵遵田	郭太君	郭世荣	郭晓思	敖成齐	唐 明	徐 炎	徐子勤	徐旭东
贾敬芬	钱 前	高志奎	章 镇	曹 同	曹建国	常朝阳	康永祥	盛仙永
董娟娥	喻德跃	粟建光	谢树莲	蔡 霞	黎 斌	上官周平		