

EST-CAPS 标记在尾叶桉×细叶桉 F₁ 中分离的研究

张照远^{1,2}, 甘四明^{1*}, 李发根¹, 李梅¹, 胡哲森²

(1. 中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广州 510520; 2. 福建农林大学 林学院, 福州 350002)

摘要: 对 7 个 EST-CAPS 标记在尾叶桉×细叶桉 F₁ 中分离的研究表明: 5 个 EST-CAPS 标记呈 1:1 的分离, 但其中 1 个偏离孟德尔分离($\alpha=0.05$); 另外 2 个 EST-CAPS 标记呈 1:1:1:1 的分离, 且均符合孟德尔分离。孟德尔正态分离的 EST-CAPS 标记比例达 85.7%, 偏分离标记比例为 14.3%, 表明 EST-CAPS 标记是一种可靠的遗传标记, 可用于桉属树种遗传图谱构建和相关研究。另外, 探讨了偏分离的可能原因。

关键词: EST-CAPS; 桉树; 分离

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)03-0493-04

Segregation of EST-CAPS markers in an interspecific cross of *Eucalyptus urophylla* × *E. tereticornis*

ZHANG Zhao-Yuan^{1,2}, GAN Si-Ming^{1*}, LI Fa-Gen¹, LI Mei¹, HU Zhe-Sen²

(1. *Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China;*

2. *College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China*)

Abstract: Segregation of EST-CAPS markers was investigated by using an interspecific cross of *Eucalyptus urophylla* × *E. tereticornis* Smith and seven ESTs derived from *E. tereticornis*. The results showed that five EST-CAPS markers had a segregation ratio 1:1, four out of which segregated normally at a Mendelian mode ($\alpha=0.05$), while the left two EST-CAPSs segregated 1:1:1:1 at a Medelian inheritance mode. The relatively high ratio of normal segregating EST-CAPS markers (6/7=85.7%) implies that the marker type could be reliably used as genetic marker in genetic mapping and the related studies in *Eucalyptus* species. In addition, the possible causes of EST-CAPS segregation distortion were discussed.

Key words: EST-CAPS; *Eucalyptus*; segregation

切割扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS)也称 PCR-RFLP, 其利用基因组片段在酶切位点上的碱基变异, 对该片段的 PCR 产物进行限制性内切酶酶切从而产生等位片段(或等位基因)的多态性(Tragoonrun 等, 1992; Konieczny 等, 1993)。CAPS 是一种简便、可靠、共显性的分子标记技术(Konieczny 等, 1993)。

基于表达序列标签(expressed sequence tags, EST)进行 PCR 的 EST-CAPS 可对具有基因功能的 EST 片段进行分析, 目前已在品种鉴定(Calderwood 等, 1996)、基因定位(Weiland 等, 2003)、标记辅助选择(Moury 等, 2000)、遗传图谱构建(Nikaido 等, 2000; Temesgen 等, 2001; Tani 等, 2003; Kononov 等, 2005)等方面得到了广泛的应用。

收稿日期: 2005-09-01 修回日期: 2006-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(30371173); 国家“863”计划(2006AA100109); 广东省自然科学基金(011386) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371173); National High Technologies Research and Development Program of China (2006AA100109); Natural Science Foundation of Guangdong Province (011386)]

作者简介: 张照远(1980-), 男, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为森林培育学。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: smggan@pub. guangzhou. gd. cn)

桉树(*Eucalyptus*)是重要的工业用材树种,其遗传图谱构建和相关的基因组研究越来越受重视(Grattapaglia,2004)。但桉树遗传图谱构建仍存在通用性标记不多、图谱密度较低的问题。目前桉树表达序列标签测序已获得丰富的基因组资源,如 Genesis 已对 183 000 余条巨桉(*E. grandis*) ESTs 测序(Strabala,2004)。因此,如何利用现有 ESTs 资源提高桉树遗传图谱的质量并开展比较基因组研究,是一个紧迫的研究课题,EST-CAPS 无疑是一项可供选择的技术。

目前,EST-CAPS 仍未用于桉树遗传图谱构建,并且 EST-CAPS 标记对桉树遗传图谱构建的可行性(如遗传方式和分离比例等)也无研究。本文利用来自细叶桉(*E. tereticronis*)的 7 个 ESTs 片段,研究了 EST-CAPS 在尾叶桉(*E. urophylla*) \times 细叶桉 F_1 中的遗传方式,以探索 EST-CAPS 标记用于桉属树种的遗传连锁图谱构建的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

包括尾叶桉(0030) \times 细叶桉(4305) F_1 代谱系的 2 亲本和 130 株子代。该群体扦插后保存于广东省新会市大泽镇(113°02' E,22°32' N),该批材料同时也用作遗传图谱构建(Gan 等,2003)和无性系选择(甘四明等,2005)。

来自细叶桉备选 EST 序列 54 个,下载自 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),引物设计通过 Primer 3 软件进行(<http://www.frodo.wi.mit.edu/primer3/>),引物合成由上海生工公司完成。引物筛选用 2 亲本进行,能在 1 个或 2 个亲本中扩增出一条清晰谱带的引物再用于酶的筛选。最后有 7 对引物用于正式扩增(表 1)。

备用限制性内切酶 30 种,购自上海生工公司(16 种)和北京鼎国公司(14 种)。限制性内切酶的初筛用 2 亲本进行,复筛用 2 亲本和 6 个子代进行。最后有 7 种酶分别用于正式扩增产物的酶切(表 1)。

1.2 DNA 提取、PCR 反应和 CAPS 酶切

DNA 提取采用 CTAB 法(Doyle 等,1990),稍有改进(Gan 等,2003)。PCR 采用 10 μ L 反应体系:10 \times Buffer 1.0 μ L(100 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0),100 mmol/L KCl,0.5% NP-40,80 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,25 mmol/L MgSO_4),0.2 mmol/L dNTPs,前向和后

向引物各 0.05 μ mol/L,DNA 模板 2 ng,Taq DNA 聚合酶 1 单位。PCR 反应程序:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,56 $^\circ\text{C}$ 或 60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,进行 35 个循环;最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

酶切反应体系为 10 μ L:适合于各酶的 10 \times Buffer 1.0 μ L,限制性内切酶 5 单位,PCR 产物 5.0 μ L。37 $^\circ\text{C}$ 恒温 4 h。酶切产物在含有溴化乙锭的 2.5% 琼脂糖凝胶上电泳,电泳缓冲液为 0.5 \times TBE。电泳结果采用 Photoprint 215SD 成像系统(法国 Vilber Lourmat Co.)存盘并打印记录。

1.3 CAPS 标记统计

标记位点按“EST 名称—酶”记录,酶切后的独立分离谱带(不同等位基因)按从大到小分别记录为“1”、“2”和“3”等以统计亲本和个体的基因型。标记位点在杂交子代中的分离是否符合孟德尔遗传通过 χ^2 适合度检验进行($\alpha=0.05$)。

2 结果与讨论

备选 54 对 EST 引物中,有 35 对能在 1 个或 2 个亲本中扩增出一条清晰的谱带,谱带大小均不同程度地大于原 EST 序列中引物包含的序列长度(详细结果未列出)。通过引物—酶筛选,30 种限制性内切酶中,有 7 种能分别对 7 个 EST 的 PCR 产物进行酶切并在亲本和子代中产生等位片段的多态性(表 1,2)。图 1 显示了 2 亲本和部分子代个体的 CD668835 PCR 产物经 *MspI* 酶切的结果。

从表 2 看出,7 个 EST-CAPS 标记在尾叶桉 \times 细叶桉 F_1 中的分离主要有三种方式。一是 2 亲本的 PCR 产物均被酶切,产生 2 条在亲本间呈多态的、在子代独立分离的谱带,子代中存在 4 种基因型,其分离比例为 1:1:1:1,如 CD668626-*MvaI*;二是 1 个亲本的 PCR 产物被完全酶切,另一亲本的 PCR 产物既有被酶切的、也有未被酶切的,从而产生 2 条在亲本间呈多态的、在子代独立分离的谱带,子代中存在 4 种基因型,其分离比例为 1:1:1:1,如 CD668837-*BsuRI*。三是 1 个亲本的 PCR 产物被完全酶切,另一亲本的 PCR 产物既有被酶切的、也有未被酶切的,从而产生 1 条在亲本间呈多态的、在子代分离的谱带,子代中存在 2 种基因型,其分离比例为 1:1,这包括其余的 5 个标记。

对 7 个 EST-CAPS 标记在子代中分离的 χ^2 适合度检验表明,其中 6 个符合孟德尔遗传($\alpha=0.05$)

(85.7%), 1 个(CD668433-EcoR130I)(14.3%) 偏离孟德尔遗传分离, 表明 EST-CAPS 是可靠的遗传标记。 本研究在 54 对备选 EST 引物中有 35 对(64.8%) 能够成功地进行 PCR 扩增, 这与欧洲赤松

表 1 引物、PCR 片段大小和限制性内切酶
Table 1 Primers, size of PCR products, and restriction enzymes

EST 名称 EST code	引物序列 Primer sequences		引物间 EST 大小 EST size primed (bp)*	PCR 产物大小 PCR product size(bp)*	限制性内切酶 Restriction enzyme
	前向引物 Forward primer (5'-3')	后向引物 Reverse primer(5'-3')			
CD668433	GCGTTGAAGGGCAAGAGTG	AGCCCCCTCACAAAGTTCT	292	1 330	EcoR130 I
CD668626	CTCAACCCAAACAAGCAG	GACCCCAACGCTCTTCATGA	434	460	Mva I
CD668634	TCAGAGAGTCAGACAAGGAAAC	ACCATCCTCACCTCCACTTG	349	2 600	Pvu II
CD668823	AGATTGGATTGCTGCTTGCT	GGAAGAGCTGACCTAATAG	297	530	Eco72 I
CD668835	GAAACCGCTGTCATGGAAGT	TTCCCGTTTTTCATCAGG	258	750	Msp I
CD668837	ATGATGCACAAGCGTATGGT	CTCACAGATCCGCTTAATG	286	460	BsuR I
CD669233	CAACAGGAATAACCAGAAGC	TGGGTGTTACTTGATCGGCA	195	360	Aha III

注: * 片段大小根据 100bpDNA marker 估算。 Note: * Fragment size is deduced with comparison to the 100 bp DNA Ladder.

表 2 EST-CAPS 标记位点统计及其分离的适合度检验
Table 2 EST-CAPS markers and test of goodness of fit for their segregation among sibs

EST-CAPS 标记 EST-CAPS marker	母本/父本酶切 后片段 Female/male digestion pattern (bp)*	母本/父本 基因型 Female/ male genotype	子代分离比 例 Segregation among sibs	期望比值 Expecta- tion	χ ² 值 χ ² value	概率 Probability
CD668433-EcoR130I	1330,920,250,160/920,250,160	12/22	81(12):48(22)	1:1	4.22**	0.01~0.05
CD668626-MvaI	230,190,120/340,230,120	23/12	25(12):29(22): 44(23):32(13)	1:1:1:1	6.18	0.05~0.10
CD668634-PvuII	2600/2600,1100,620,440,350	11/12	64(11):66(12)	1:1	0.03	>0.95
CD668823-Eco72I	530/530,460,70	12/11	68(11):62(12)	1:1	0.28	0.50~0.70
CD668835-MspI	750,500,250/750	12/11	58(11):70(12)	1:1	1.13	0.20~0.30
CD668837-BsuRI	460,280,180/340,280,180	13/23	24(13):18(23): 32(33):16(12)	1:1:1:1	6.89	0.05~0.10
CD669233-AhaIII	360,220,140/220,140	12/22	47(12):54(22)	1:1	0.49	0.30~0.50

注: * 片段大小根据 100 bp DNA marker 估算; ** 偏离孟德尔遗传分离(α=0.05)。

Notes: * Fragment size is deduced with comparison to the 100 bp DNA Ladder; ** Segregation is aberrant significantly from the expectation(α=0.05).

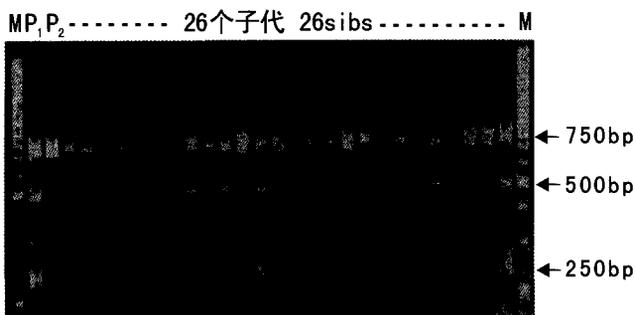


图 1 标记 CD668835-MspI 的不同等位片段在 2 亲本和部分子代个体的分离情况

Fig. 1 Profile of marker CD668835-MspI over the parents and 26 sibs

M: DNA 长度标定的 Marker; P₁: 母本; P₂: 父本。 右边箭头示酶切后的电泳片段。

58%(50/85) (Temesgen 等, 2001) 的比例近似, 但比云杉 (*Picea abies*) 中 75.9% (41/54) (Achère 等, 2004)、火炬松利用木质部 cDNA 的 76.0% (57/75) (Temesgen 等, 2001) 低。这可能与 EST 建库植株与试验材料的亲缘关系以及引物设计的特异性有关。本研究虽然利用了 30 种限制性内切酶, 但 54 对引物只得到 7 个在子代分离的 EST-CAPS 标记 (13.0%), 比利用 SSCP (single strand conformation polymorphism, 单链构象多态性) 和 CAPS 两种技术对松树 (24/90 = 27%) (Komulainen 等, 2003) 和云杉 (19/54 = 35.2%) (Achère 等, 2004) 的效率低很多。另外, CAPS 虽然在技术上较简单, 但需要筛选大量的限制性内切酶, 因此比较费时 (Temesgen 等, 2001)。所以, 需要利用更灵敏、更省时的技术检测 EST 多态性, 如 SSCP 和 DGGE (denatured gradient gel eletrophoresis, 变性梯度凝胶电泳), 这是

(*Pinus sylvestris*) 和火炬松 (*P. taeda*) 中 66.7% (60/90) (Komulainen 等, 2003)、火炬松利用苗期 cDNA 的

我们下一步进行桫欏遗传图谱构建中将要开展的工作。

根据 EST 序列设计的引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增时,扩增产物通常会比目标 EST 片段长,这在以往报道中普遍存在,如火炬松的 EST 作图(Temesgen 等,2001)和豌豆(*Pisum sativum*)的 EST-CAPS 作图(Konovalov 等,2005),主要是由于内含子的存在。引物设计时尽量利用 EST 序列 3' 端的 300bp 将有助于去除内含子(Temesgen 等,2001)。

本研究 EST-CAPS 标记偏分离的比例为 14.3%,属中等水平,高于日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)中 9.1%(2/22)的水平(Nikaido 等,2000),但低于日本柳杉 19.9%和 31.3%(Tani 等,2003)以及火炬松 40.6%((36+29)/(85+75))(Temesgen 等,2001)的比例。同其它标记技术一样,EST-CAPS 的偏分离普遍存在。标记偏分离的原因可能是多方面的,如亲本遗传差异较大(Byrne 等,1995;甘四明等,2001)、分离群体偏小(Carlson 等,1991)、致死基因的存在(Mukai 等,1995;O'Leary 等,1998)和亲本杂交过程中存在染色体结构的重排、缺失、插入和突变(Kasha 等,1970;Faure 等,1993)等。

总结以上,EST-CAPS 是一种简便、可靠的共显性分子标记技术,在桫欏中符合孟德尔遗传方式,可以作为遗传图谱构建等分子生物学的工具。

中国林业科学研究院热带林业研究所吴坤明和吴菊英副研究员进行了杂交和育苗工作,广东省新会市大泽镇林业站对试验材料保存提供了大力协助,特此致谢!

参考文献:

- Acheré V, Rampant PF, Jeandroz S, et al. 2004. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers[J]. *Theor Appl Genet*, **108**(8): 1 602—1 613
- Byrne M, Murrell JC, Allen B, et al. 1995. An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers[J]. *Theor Appl Genet*, **91**(6—7): 869—875
- Calderwood SB, Baker MA, Carroll PA, et al. 1996. Use of cleaved amplified polymorphic sequences to distinguish strains of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *J Clin Microbiol*, **34**(11): 2 860—2 865
- Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, et al. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of conifers[J]. *Theor Appl Genet*, **83**(2): 194—200
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, **12**(1): 13—14
- Faure S, Noyer JL, Horry JP. 1993. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa accuminata*) [J]. *Theor Appl Genet*, **87**(4): 517—526
- Gan SM(甘四明), Shi JS(施季森), Bai JY(白嘉雨), et al. 2001. Segregation of RAPD markers: A case in interspecific cross of *Eucalyptus* (RAPD 标记在桫欏种间杂交一代的分离方式研究) [J]. *Fore Res* (林业科学研究), **14**(2): 125—130
- Gan S, Shi J, Li M, et al. 2003. Moderate-density molecular maps of *Eucalyptus urophylla* and *E. tereticornis* genomes based on RAPD markers [J]. *Genetica*, **118**(1): 59—67
- Grattapaglia D. 2004. Integrating genomics into *Eucalyptus breeding* [J]. *Genet Mol Res*, **3**(3): 369—379
- Kasha KJ, Kao KN. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare*) [J]. *Nature*, **225**: 874—876
- Komulainen P, Brown GR, Mikkonen M, et al. 2003. Comparing EST-based genetic maps between *Pinus sylvestris* and *Pinus taeda* [J]. *Theor Appl Genet*, **107**(4): 667—678
- Konieczny A, Ausubel FM. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers [J]. *Plant J*, **4**(2): 403—410
- Konovalov F, Toshchakova E, Gostimsky S. 2005. A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.) [J]. *Cell Mol Biol Lett*, **10**(1): 163—171
- Moury B, Pflieger S, Blattes A, et al. 2000. A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper [J]. *Genome*, **43**(1): 137—142
- Mukai Y, Suyama Y, Tsumura Y, et al. 1995. A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD, and isozyme loci [J]. *Theor Appl Genet*, **90**(6): 835—840
- Nikaido AM, Ujino T, Iwata H, et al. 2000. AFLP and CAPS linkage maps of *Cryptomeria japonica* [J]. *Theor Appl Genet*, **100**(6): 825—831
- O'Leary MC, Boyle TH. 1998. Segregation distortion at isozyme locus Lap 21 in *Schlumbergera* (Cactaceae) is caused by linkage with the gametophytic self-incompatibility (S) locus [J]. *J Hered*, **89**(3): 206—210
- Strabala TJ. 2004. Expressed sequence tag databases from forestry tree species [M]//Kumar S, Fladung M (eds). *Molecular Genetics and Breeding of Forest Trees*. New York: Food Products Press, 19—51
- Tani N, Takahashi T, Iwata H, et al. 2003. A consensus linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) from two pedigrees, based on microsatellites and expressed sequence tags [J]. *Genetics*, **165**(3): 1 551—1 568
- Temesgen B, Brown GR, Harry DE, et al. 2001. Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda*) [J]. *Theor Appl Genet*, **102**(5): 664—675
- Tragoonrun S, Kanazin V, Hayes PM, et al. 1992. Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, **84**(7—8): 1 002—1 008
- Weiland JJ, Yu MH. 2003. A cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet [J]. *Crop Sci*, **43**(5): 1 814—1 818