

DOI:10.11937/bfyy.201506027

甜瓜掌状裂叶基因 *pll* 的精细定位

高兴旺¹, 王贤磊², 宁雪飞², 张自强², 卢浩², 李冠²

(1. 新疆大学 资源与环境科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830046; 2. 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:以甜瓜掌状裂叶材料 *bm7* 和甜瓜圆叶材料 Y8 为亲本, 构建 BC₁ 分离群体作为作图群体, 同时利用甜瓜基因组序列, 采用 SSR 分子标记技术, 结合混合分离分析法(BSA), 将甜瓜裂叶基因 *pll* 进一步定位到 SSR 标记 G61 和 G76 之间 65 kb 的区间之内。结果表明: 在此区域内, 共有 6 个候选基因, 从 MELO3C010780 到 MELO3C010785, 其中, MELO3C010784 与 ANT 转录因子相似。根据文献报道, 在拟南芥中过表达从椰子中克隆的 ANT 基因导致叶片出现锯齿形边缘, 该表型与甜瓜株系 *bm7* 的裂叶形状具有相似性。这些结果表明 MELO3C010784 为最可能的候选基因。

关键词:甜瓜; 裂叶; SSR; 精细定位; 叶发育

中图分类号:S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)06-0098-05

甜瓜是世界十大果蔬之一, 在世界范围内广泛栽培。新疆甜瓜以其优良品质享誉海内外, 并发展成为新疆重要的特色经济作物之一。甜瓜叶片是进行光合作用的主要器官, 其形态对甜瓜品质产生重要影响。甜瓜叶片多为规则的扇形全缘叶。新疆农业大学的王惠林教授在育种地发现一株叶形表现为规则掌状裂叶形态的自然突变体, 并将其命名为 *bm7*。该突变体的获得为深入进行裂叶形态建成的分子机制的研究提供了良好的研究材料。

叶片形态建成的分子机制是发育生物学研究的重

要内容之一, 是研究植物形态发生, 尤其是多细胞生物有机体形成机理的良好模型^[1-3]。国外从 20 世纪 90 年代^[4] 开始开展叶发育的机制研究, 通过模式植物拟南芥揭示了大量与叶片形态建成相关的基因。在研究叶片形态建成的分子机制的过程中, 发现多个基因与裂叶形成相关, 如 *CUC2*^[5] 和 *KNAT* (包括 *KNAT1*、*KNAT2*、*KNAT6*)^[6-10]。但是, 关于裂叶形态建成的分子机制还是一知半解, 也没有开展这方面的专门研究, 国内在这方面的研究也很少, 因此, 深入研究裂叶形态建成的分子机制具有重要的理论意义。

Niklas^[11] 研究发现, 裂叶植株可以减少植株自身引起的遮阴效应, 从而有利于植株更好地接收光能^[12]。Vogel^[13] 研究发现, 裂叶有利于热扩散, 可以一定程度上降低叶片温度, 从而可以减弱阳光对植物的灼伤。叶片形态影响着植株生长状态以及光能利用效率, 进而影响作物产量和品质^[14-15], 比较不同叶形的棉花近等基因系(浅裂叶、适中裂叶、较大裂叶、深度裂叶)的光合效率发现, 具有适中裂叶的棉花株系表现出最高的光合效

第一作者简介:高兴旺(1983-), 男, 博士, 现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail: gxxw516@163.com.

责任作者:李冠(1949-), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物生理生化与分子生物学等研究工作。E-mail: guanli@xju.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260258); 新疆高技术发展资助项目(201111120)。

收稿日期:2014-11-10

Abstract: Regeneration system of thin cell layers (TCL) was established by using shoots of *Pyrus ussuriensis* as explants, to provide basis for asexual propagation and industrialized seedling production of *Pyrus ussuriensis*, meanwhile to provide reference for application of TCL technique in *Pyrus* research. The results showed that regeneration efficiency of TCL was affected by the combination and concentration of hormones. The optimal culture medium of adventitious shoots regeneration was MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+sucrose 30 g/L+agarose 7 g/L, and the regeneration rate was 100%. The optimal culture medium of adventitious roots was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L+sucrose 30 g/L+agarose 7 g/L, and the rate of rooting was 66.7%. Meanwhile, callus and adventitious shoots induction rate increased under dark culture.

Keywords: *Pyrus ussuriensis*; thin cell layer; regeneration; stem

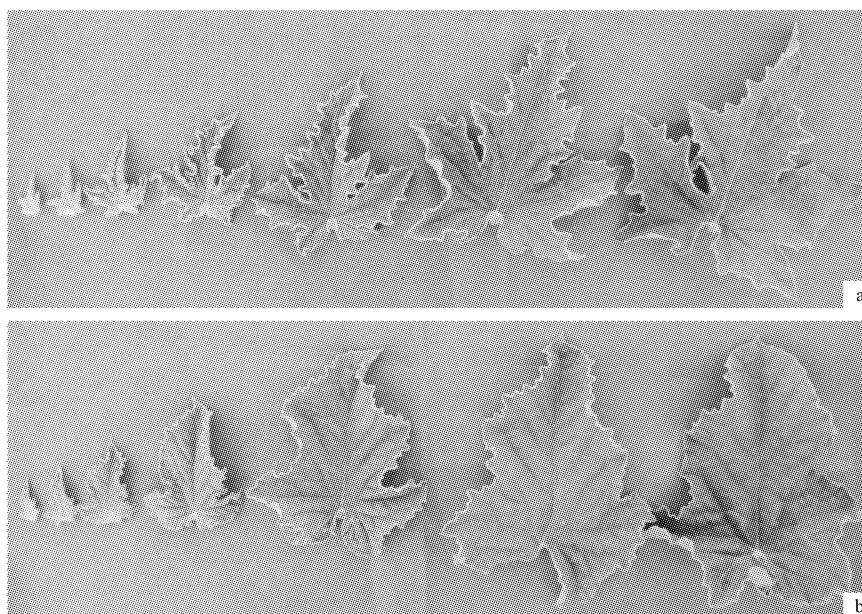
率^[16]。在田间观察发现,相对于圆叶甜瓜,甜瓜裂叶植株表现出对甜瓜白粉病更强的抗性,推测可能是由于裂叶植株通风通气性较好,不利于形成易感白粉病的高温高湿环境所致。此外,甜瓜裂叶植株占用空间小,可以利用这一特点进行甜瓜密植,从而提高产量。因此,深入研究裂叶形态建成的分子机制可以指导该课题组对相关物种进行叶形改良。

该研究以甜瓜掌状裂叶突变体 *bm7* 和圆叶材料 Y8 为主要材料,构建 BC₁ 分离群体,在前期研究基础之上,进一步采用 SSR 分子标记技术和混合分离分析法(BSA)对甜瓜掌状裂叶基因 *p11* 进行精细定位,以期克隆 *p11* 基因以及研究甜瓜掌状裂叶形态建成的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甜瓜掌状裂叶亲本 *bm7* 由王惠林教授(新疆农业大学)惠赠,甜瓜圆叶亲本为 Y8。*bm7* 是王惠林教授于 2006 年夏天在育种试验地发现的一株自然突变体,叶缘表现为规则的掌状深裂刻(图 1a),属小果型白皮厚皮甜瓜。Y8 为白皮薄皮甜瓜,叶缘无缺刻(图 1b),故称之为圆叶。*bm7* 与 Y8 杂交获得 F₁ 代,F₁ 代与 *bm7* 杂交获得 BC₁ 代分离群体,并简记为 YB。该试验利用 YB 群体对甜瓜掌状裂叶基因 *p11* 进行精细定位。试验材料于 2013 年 5 月种植于国家瓜类工程技术研究中心的试验地。在甜瓜植株长至 6 片真叶期之后统计各植株叶片性状,并重复统计 1 次以保证性状统计结果正确可靠。



注:a. *bm7* 表现为掌状深裂叶形状;b. Y8 叶片表现为近圆形形状,具有轻微的锯齿形边缘。

Note:a. Palmately lobed-shaped leaves with deep sinuses of the melon line *bm7*; b. Round-shaped leaves with slight sinus in the leaf margin of the melon line Y8.

图 1 甜瓜掌状裂叶亲本 *bm7*(a)和圆叶亲本 Y8(b)从第 1 片幼叶到第 7 片真叶(不同节位)的叶片表型

Fig. 1 Phenotypes of leaf shape of melon (*Cucumis melo* L.) lines *bm7* and Y8 from upper to lower nodes (left to right)

1.2 试验方法

1.2.1 SSR 标记设计 前期研究将 *p11* 基因定位于 SSR 标记 M3S16 和 M3S24 之间 82.4 kb 的候选区间之类^[17]。在此区间内有 8 个候选基因。为进一步缩小 *p11* 基因的候选范围,一方面将 BC₁ 分离群体扩大至 378 个,另一方面在标记 M3S16 和 M3S24 之间新设计 27 对 SSR 标记。SSR 标记设计如下:采用 SSRHunter1.3^[18] 软件分析候选区域内所有的 SSR 位点,选取重复基序总长大于 12 的位点,在其两端 150 bp 范围之内利用 Primer Premier 5^[19] 软件设计新的 SSR 引物。引物由北京华大基因研究中心合成。

1.2.2 甜瓜掌状裂叶基因 *p11* 的精细定位 首先利用

与 *p11* 基因紧密连锁的侧翼 SSR 标记 M3S16 和 M3S24 从 BC₁ 分离群体的 378 个个体中筛选重组个体;然后根据集群分离分析法(Bulk Segregant Analysis,BSA)^[20],从 BC₁ 分离群体的 378 个个体中随机选出 20 个圆叶植株的 DNA 和 20 个掌状裂叶植株的 DNA,分别等量混合建成圆叶 DNA 池和裂叶 DNA 池。将设计好的 SSR 引物在 2 个 DNA 池之间进行 PCR 扩增,聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物,筛选出具有多态条带的 SSR 引物。利用筛选出的多态 SSR 引物检测重组个体,进行基因分型,根据基因分型结果对 *p11* 基因进行精细定位,从而进一步缩小候选区域。

1.2.3 候选区域的生物信息学分析 登陆甜瓜基因组

数据库(<https://melonomics.net/>),在线分析候选区域内基因信息,结合文献报道推测可能的候选基因。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物设计结果

将 SSR 标记 M3S16 和 M3S24 之间 82.4 kb 的甜瓜

基因组 DNA 序列输入 SSRHunter1.3 软件,分析获得 SSR 位点信息,随机均匀选取 27 个位点设计 SSR 引物,引物序列如表 1 所示,引物 G65、G67、G69 及 G76 信息参照 Gao 等^[17]的研究结果。PCR 检测表明,设计的 27 对 SSR 引物均能扩增出预期大小的产物。

表 1 新设计的用于精细定位 *pII* 基因的 SSR 引物序列

Table 1 Information of newly developed SSR markers for fine mapping of the palmately lobed leaf shape gene *pII* in melon (*Cucumis melo* L.)

SSR 名称 SSR marker	引物序列 Primer sequence (for./rev.)	重复基序及次数 Core repeat motif and number of repeats	产物大小 Expected product size/bp	退火温度 Annealing temperature/°C
G56	CCTTCCAACATCCATGCAAC GAAAACAACAACCCCAAGC	(AG) ₆	169	50
G57	CGATTTCGTCTATATTCCG TCCATCTCTCCACATCTTTC	(GT) ₆	168	50
G58	AAAACTCAAGGGCGACAAT GCGAAAACCATGATGATCCA	(TA) ₅	151	50
G59	AGGACATGGGTTTGAAGTTAG CGCAATTTAACTTCGCATAG	(AC) ₇	214	49
G60	CACACGGTCATATCAAGTAGC CGTTAACAATTGATGTGACCT	(AG) ₇	241	49
G61	TGTCCCAOCCATTCACTTCT CTTCATCCACCACGCTCAAA	(TA) ₇	209	52
G62	GTGGAATGTGAATCACCAAT CCACCTAACTTAACTCCCAT	(AT) ₁₃	256	49
G63	GATATCAGCCCCATCGAA AAAGCCCCCTCGTTAATCAT	(AT) ₈	121	50
G64	CGGTTGGTTAAATCATCTC GTCTGTACCATCGTTGGTTT	(AT) ₈	196	49
G66	CCTATTGGGTGATGTTTGTA GTGGTAACGCCAAGAAAGA	(TAAT) ₃	197	49
G68	TACATCGGTATCTAATGCT CTAGCAGTGCCATGTCAATA	(TA) ₁₆	281	49
G70	CGATCATAGGAGATTATGGA CCACCTCTACAACCATACA	(TA) ₈	128	49
G71	GAATATGAGCCGCCAAGAAT ACACCACGGAAAACCTGAAGC	(CAA) ₇	242	50
G72	CACCCCTCCTCTCTCTTTT GGGGGACAAAACAACAACA	(CTT) ₁₀	273	52
G73	GCGAAATTTGGGTCCAAAAC TTTCTCCGTGAGGGTCTTTT	(AC) ₈	142	50
G74	TCCCTAACACAAACTCTGCT GGCTATACTATCATCTTTTCCT	(TC) ₇	257	50
G75	TGAAGTGTCAACATGGCACA ATTCCCATGCATGGTTTGT	(AT) ₉	204	49
G77	TCAACAATGGGAGACATTGC CCGTGATAGGTTTGAAGTGT	(TA) ₇	100	50
G78	GGAGACCGAAACATAATCGAG ATATCAATACGGCCCATGC	(AT) ₇	192	52
G79	ATAGTCCACTTTACCGTTT CGATTATGTTTCGGTCTCT	(AT) ₇	259	49
G80	AAACGACATCATGAGCCAA GGGCATTTTGTGCTGACTC	(TTA) ₉	238	50
G81	CCATCTTCTTAATTATGGATGG TGCTTTCTTCGCTTCTCAA	(TAAT) ₃	288	49
G82	CTCCCGTACAAGAACTCCAA CCTCGAGTAATGTTGAGCTA	(AT) ₇	130	52

2.2 *pll* 基因的精细定位

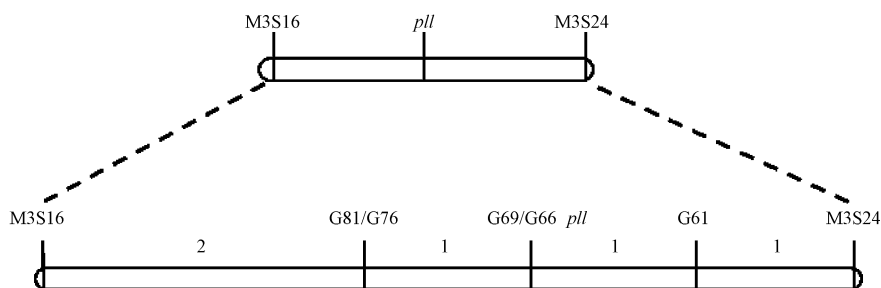
利用与 *pll* 基因紧密连锁的侧翼 SSR 标记 M3S16 和 M3S24 对新增加的 BC₁ 个体进行检测,新筛选出 2 个重组个体,加上之前筛选出的 3 个重组个体,总共筛选出 5 个重组个体(表 2)。经 BSA 法筛选,新设计的 27 对 SSR 引物中 5 对表现为多态,利用这 5 对 SSR 引物对 5 个重组个体进行带型检测,单带记录为 A,双带记录为

H,同时将掌状裂叶性状记录为 A,圆叶性状记录为 H。根据带型结果及连锁交换规律,将 *pll* 基因定位于标记 G61 与 G76 之间(表 2)。如图 2 所示,G81 与 G76 共分离,G66、G69 与 *pll* 共分离;在 M3S16 与 G81/G76 之间检测到 2 个重组个体,在 G81/G76 与 G66/G69/*pll* 之间检测到 1 个重组个体,在 G61 与 M3S24 之间检测到 1 个重组个体。

表 2 与 *pll* 基因紧密连锁的重组事件的检测

Table 2 Recombination near palmately lobed leaf shape gene *pll* identified from YB population

重组个体编号 No. of recombinants	重组个体表型 Phenotype	SSR 标记 SSR marker						
		M3S16	G81	G76	G69	G66	G61	M3S24
38	A	A	A	A	A	A	H	H
113	A	A	A	A	A	A	A	H
306	A	H	A	A	A	A	A	A
352	A	H	H	H	A	A	A	A
378	A	H	A	A	A	A	A	A



注:掌状裂叶性状或纯合子记为“A”;圆叶性状或杂合子记为“H”。

Note: Palmately lobed leaf shape or homozygous bands recorded as ‘A’; And normal round leaf shape or heterozygous bands as ‘H’.

图 2 精细定位甜瓜掌状裂叶基因 *pll*

Fig. 2 Fine mapping of palmately lobed leaf shape gene *pll* in melon (*Cucumis melo* L.)

2.3 候选区域的生物信息学分析

比对甜瓜基因组序列,SSR 标记 G61 与 G76 之间的候选区域总长为 65 447 bp。登陆甜瓜基因组数据库 (<https://melonomics.net/>),分析该区域共有 6 个候选基因:MELO3C010780 与热激蛋白相似,参与胁迫反应;MELO3C010781 与鲨烯单加氧酶相似,参与氧化还原反应;MELO3C010782 与糖基转移酶相似,具有纤维素合成酶活性;MELO3C010783 与 bHLH74 转录因子相似,参与 DNA 水平的转录调控;MELO3C010784 与 ANT 转录因子相似,同样参与 DNA 水平的转录调控;MELO3C010785 功能未知 (<https://melonomics.net/>)。单从基因功能无法确定具体的候选基因。Bandupriya 等^[21]报道,在拟南芥中过表达从椰子中克隆的 ANT 基因导致叶片出现锯齿形边缘。这与甜瓜柱系 *bm7* 的裂叶形状具有一定相似性,因此推测 MELO3C010784 为最可能的候选基因。

3 讨论

该试验通过增加标记数量和扩大定位群体的方法,进一步将甜瓜掌状裂叶基因 *pll* 的候选范围缩小了

16 999 bp,候选基因数减少了 2 个。虽然增加了 SSR 分子标记的数量,但是由于群体数量较小,利用与 *pll* 基因紧密连锁的 SSR 标记 G61 与 G76 没有从作图群体中检测出重组个体,说明在作图群体数量有限的情况之下,无法通过增加分子标记的数量进一步缩小候选基因的范围。可行的办法是构建更大的作图群体以精细定位 *pll* 基因。

通过该试验也反映出,SSR 分子标记技术确实是一种比较理想的作图工具,尤其是甜瓜基因组序列的发表,使得研究者可以在目标区域根据需要设计更多的 SSR 标记。相信随着时间的推移,甜瓜中更多基因的功能将不断被人类所认识。

目前国内外关于叶发育的研究还相当薄弱,已发现的叶发育相关的调控因子在不同植物中的功能,以及它们之间的调控网络仍不十分清晰,这在一定程度上阻碍了通过分子手段对叶形进行改良。该研究的开展为进一步确定和克隆甜瓜掌状裂叶基因 *pll*,以及为深入研究甜瓜掌状裂叶形态建成的分子机制的研究奠定了基础,同时为进一步研究双子叶植物单叶发育提供了很好

的模型,也为叶型定向改良提供了可能。

(致谢:新疆农业大学王惠林教授无私馈赠甜瓜掌状裂叶突变体材料 *bm7*,谨致谢忱。)

参考文献

- [1] Hirokazu T. Leaf development and evolution[J]. Journal of Plant Research, 2010,123:3-6.
- [2] Gonzalez N, Vanhaeren H, Inze D. Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion[J]. Trends in Plant Science, 2012,17(6):332-340.
- [3] Li L C, Kang D M, Chen Z L, et al. Hormonal regulation of leaf morphogenesis in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(1):75-80.
- [4] Smith L G, Greene B, Veit B, et al. A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates[J]. Development (Cambridge, England), 1992,116(1):21-30.
- [5] Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, et al. The balance between the *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006,18(11):2929-2945.
- [6] Chuck G, Lincoln C, Hake S. *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1996, 8:1277-1289.
- [7] Dean G, Casson S, Lindsey K. *KNAT6* gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation[J]. Plant Molecular Biology, 2004,54(1):71-84.
- [8] Hay A, Jackson D, Ori N, et al. Analysis of the competence to respond to *KNOTTED1* activity in *Arabidopsis* leaves using a steroid induction system [J]. Plant Physiol, 2003,131(4):1671-1680.
- [9] Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, et al. A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants[J]. Plant Cell, 1994, 6:1859-1876.
- [10] Pautot V, Dockx J, Hamant O, et al. *KNAT2* Evidence for a Link between *Knotted*-like Genes and Carpel Development[J]. Plant Cell, 2001,13(8):1719-1734.
- [11] Niklas K J. The effect of leaf-lobing on the interception of direct solar radiation[J]. Oecologia, 1989,80(1):59-64.
- [12] Ali M S, Kikuzawa K. Shoot morphology of *Aucuba japonica* incurred by anisophylly: ecological implications[J]. Journal of Plant Research, 2005,118(5):329-338.
- [13] Vogel S. Leaves in the lowest and highest winds: temperature, force and shape[J]. New Phytologist, 2009,183(1):13-26.
- [14] Barber J. Photosynthetic energy conversion: natural and artificial[J]. Chemical Society Reviews, 2009,38(1):185-196.
- [15] Zhu X G, Long S P, Ort D R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010,61:235-261.
- [16] Wells R, Meredith W R, Williford J R. Canopy photosynthesis and its relationship to plant productivity in near-isogenic cotton lines differing in leaf morphology[J]. Plant Physiology, 1986,82(3):635-640.
- [17] Gao X X, Ning X F. Fine mapping of a gene that confers palmately lobed leaf (*pll*) in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Euphytica, 2014,200:337-347.
- [18] Li Q, Wan J M. SSR Hunter: Development of a local searching software for SSR sites[J]. Yichuan, 2005,27(5):808-810.
- [19] Lalitha S. Primer premier 5. Biotech Software & Internet Report; The Computer Software [J]. Journal for Scient, 2000,1(6):270-272.
- [20] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991,88:9828-9832.
- [21] Bandupriya H, Dunwell J M. Overexpression of *GnANT*, coconut babyboom homologue alters plant growth and morphology in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Tropical Agricultural Research, 2012,23(3):249-260.

Fine Mapping of Palmately Lobed Leaf Gene *pll* in Melon

GAO Xing-wang¹, WANG Xian-lei², NING Xue-fei², ZHANG Zi-qiang², LU Hao², LI Guan²

(1. College of Resources and Environmental Science, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046; 2. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: A natural mutant named *bm7* in melon (*Cucumis melo* L.) that consists of palmately lobed leaves and a melon line named Y8 that consists of round leaves were used as parental lines to construct BC₁ segregating population for fine mapping of the palmately lobed leaf gene *pll*. Methods of bulk segregant analysis (BSA) and simple sequence repeat (SSR) markers were used to map *pll*. The *pll* gene was delimited between SSR markers G61 and G76, and the physical distance was 65 kp according to the melon genome database. The results showed that six genes, *MELO3C010780*-*MELO3C010785*, were predicted within this region. Gene *MELO3C010784* was similar to the *ANT* transcription factor. Overexpression of *CnANT* in *Arabidopsis* resulted in leaves with serrated margins. This finding indicated that gene *MELO3C010784* was maybe the most likely candidate gene for *pll*.

Keywords: melon; palmately lobed leaf; SSR; fine mapping; leaf development