



## 右任书院第十届创新训练项目Poster展示与竞赛活动

# Screening Candidate Genes and Molecular Marker Identification for Apple Leaf Wax Based on Whole Genome Association Analysis

## 基于全基因组关联分析筛选苹果叶片蜡质的候选基因及分子标记鉴定

团队成员：李晓梅 吕子彤 王艳丽

指导老师：李雪薇 副教授 园艺学院

### 研究背景

苹果是我国第二大水果，它的品质与产量会严重受到干旱的影响。而苹果叶片蜡质在干旱胁迫下可以降低叶片的蒸腾速率，减少水分散失，进而提高苹果抗旱性。

目前，在很多植物中发现了与蜡质相关的基因，但是与苹果抗旱性相关的蜡质合成基因还需要进一步探索和挖掘。本项目旨在筛选出与苹果叶片蜡质有关的候选基因，并开发苹果叶片蜡质分子标记方法，为苹果辅助育种提供便利。



### 技术路线

基于全基因组关联分析筛选苹果叶片蜡质的候选基因及分子标记鉴定

测定123个苹果种质资源叶片蜡质含量

苹果叶片蜡质含量的全基因组关联分析

筛选调控苹果叶片蜡质含量相关候选基因

克隆基因并构建植物表达载体

进行转基因工作获得候选基因的转基因植物

测定转基因植物叶片蜡质含量

测定转基因植物叶片失水速率

验证全基因组关联分析到的自然变异

基于该自然变异进行单倍型分析

基于该自然变异开发苹果叶片蜡质含量相关的分子标记

基于全基因组关联分析筛选苹果叶片蜡质的候选基因并开发分子标记

### 阶段性成果

#### 1. 筛选与苹果叶片蜡质有关的候选基因

通过全基因组关联分析筛选到了与苹果叶片蜡质有关的候选基因，发现自然变异位于第10号染色体的上游启动子上，并且在该位点造成多态性的碱基是C与T。

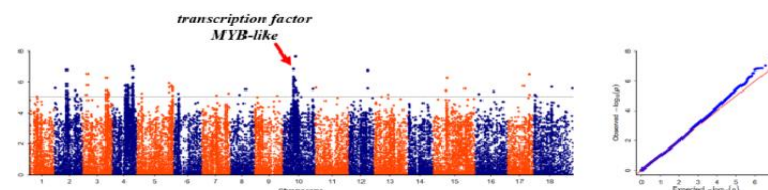


图1 叶片蜡质含量全基因组关联分析曼哈顿图和分位数-分位数图(QQ图)

Chr10 upstream [ C/T ] 3.43 E-06

图2 全基因组关联分析中自然变异的SNP注释信息图

#### 2. 对自然变异进行单倍型分析

基于123个苹果种质叶片蜡质的GWAS分析进行单倍型分析，并利用Sanger测序法对单倍型分析结果进行进一步确认，最终结果表明T/T单倍型的叶片蜡质含量更高。

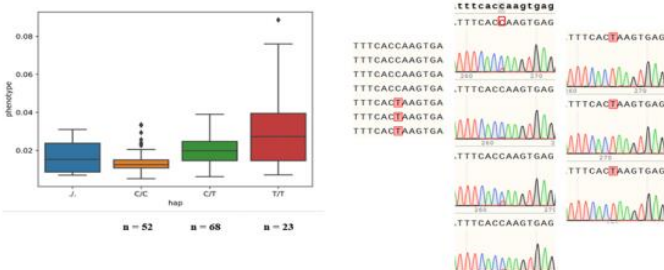


图3 123个苹果种质叶片单倍型分析及测序结果图

#### 3. 酶切扩增多态性序列(CAPS)对SNP位点进行验证

采用相应的限制性内切酶对该PCR扩增产物进行酶切，产生了不同的电泳图谱。由此确定了SNP位点的碱基类型为C、T，对SNP位点进行了验证。

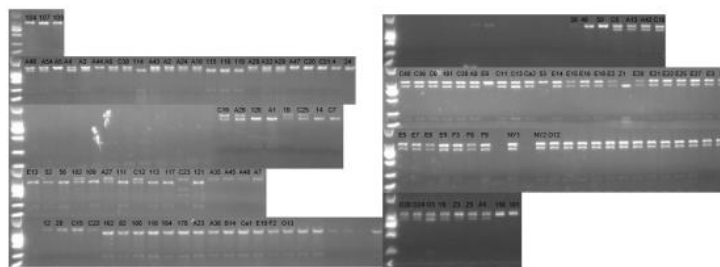


图4 酶切扩增多态性序列(CAPS)对SNP位点进行验证的电泳图谱

#### 4. 经酶切扩增多态性序列验证后的单倍型分析

经酶切扩增多态性序列对SNP位点验证后，再一次进行单倍型分析，发现T/T单倍型的蜡质含量高于C/C单倍型与C/T单倍型的蜡质含量。另外，对T/T单倍型与C/C单倍型进行MYB-like的基因表达量进行分析发现T/T单倍型的候选基因相对表达量高于C/C单倍型，进一步验证了全基因组关联分析得到的候选基因对苹果叶片蜡质有调控作用。

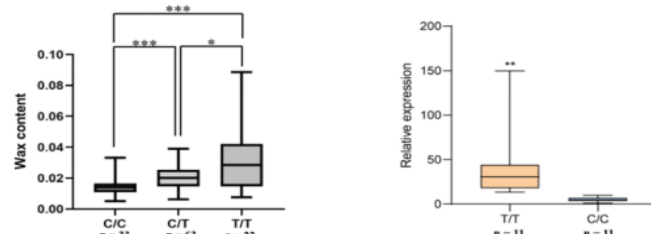


图5 经CAPS验证后的单倍型分析及不同单倍型中MYB-like的基因表达量结果图

#### 5. 对筛选到的苹果叶片蜡质候选基因进行功能验证

基于全基因组关联分析得到的苹果叶片蜡质候选基因，将相应的苹果基因序列进行克隆，并通过Gateway法构建转基因过表达载体。在此基础上，利用叶盘侵染法进行转基因。



图6 转基因侵染苹果叶片结果图

### 下一阶段计划

1. 目前，我们还未成功得到转基因植物，后面将继续进行转基因工作。
2. 获得该转基因植物后，测定其叶片的蜡质含量与失水速率，完成全基因组关联分析到的蜡质候选基因功能验证工作。
3. 对苹果叶片蜡质候选基因启动子进行表达分析，验证启动子活性。

### 项目创新点

分子标记是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记，是DNA水平遗传多态性的直接的反映。随着分子生物学技术的发展，DNA分子标记技术已有数十种，广泛应用于遗传育种、基因组作图、基因定位、物种亲缘关系鉴别、基因库构建、基因克隆等方面。现有的分子标记技术包括PFLP技术、VNTR技术、RAPD技术、DAF技术、SCAR技术等。本研究将在此基础上对分子标记技术进行创新，以便达到实验操作方便，操作速度快且标记更准确等效果，从而进行准确的鉴定。

### 致谢

- 本项目由省级“大学生创新创业训练计划”(S202310712434)支持
- 感谢西北农林科技大学园艺学院李雪薇老师、刘泽远师兄的悉心指导
- 感谢创新实验学院举办本次学科竞赛为西农学子们提供平台

### 联系方式

姓名：李晓梅  
 QQ：1953820056  
 电话：13393427465  
 邮箱：nsoshyfjofde@163.com