

文章编号: 1001-1498(2001)02-0125-06

# RA PD 标记在桉属种间杂交 一代的分离方式研究

甘四明<sup>1</sup>, 施季森<sup>2</sup>, 白嘉雨<sup>1</sup>, 吴坤明<sup>1</sup>, 吴菊英<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520;

2 南京林业大学 林木遗传与基因工程实验室, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 以 1 个尾叶桉 × 细叶桉全同胞家系的 2 个亲本和 212 个子代为材料, 利用 RA PD 分子标记技术进行了 RA PD 标记在桉树中的分离方式研究。结果表明: 7 个随机引物共扩增出 40 个标记, 标记在 F<sub>1</sub> 代的分离方式可以分为两类: 符合孟德尔方式和偏离孟德尔方式。符合孟德尔方式的标记包括: 亲本均有而在子代中不分离的 9 个(在这类位点上代表的杂交组合为 AA × AA、AA × Aa 或 Aa × AA), 亲本间呈多态性而在子代中不分离的 7 个(aa × AA 或 AA × aa), 亲本间均有而在子代中 3 : 1 分离的 2 个(Aa × Aa), 亲本间呈多态性且在子代中 1 : 1 分离的 9 个(Aa × aa 或 aa × Aa)。偏分离的标记包括: 亲本间呈多态性而在子代中偏离 1 : 1 分离的 12 个, 两亲本均有而在子代中偏离 3 : 1 分离的 1 个。亲本间呈多态性且在子代中 1 : 1 分离的位点在拟测交策略中可以用于遗传连锁图谱构建, 这为利用 RA PD 标记构建桉树遗传连锁图谱提供了理论支持。

**关键词:** RA PD 标记; 桉树属; 分离

**中图分类号:** S722.3      **文献标识码:** A

随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RA PD) 分子标记技术自 1990 年产生以来<sup>[1,2]</sup>, 因操作简捷、多态性丰富而在生命科学各领域广为应用<sup>[3,4]</sup>。林木上, RA PD 标记已成功用于遗传连锁图谱构建<sup>[5]</sup>。RA PD 为显性标记, 而林木常用的作图群体为 F<sub>1</sub> 谱系, 所以采用的作图策略为拟测交策略(Pseudo-testcross strategy)<sup>[6,7]</sup>, 即某一亲本上杂合(显示该位点谱带, 基因型 Aa) 而另一亲本上隐性纯合(无该位点谱带, 基因型 aa) 的位点(谱带)在其全同胞子代中将呈 1 : 1 分离, 类似测交的分离方式。因此, RA PD 标记连锁图谱构建以前, 进行 RA PD 位点的遗传分离研究可以为遗传图谱构建提供理论基础。

一般认为, RA PD 标记在杂种一代中的分离符合孟德尔遗传规律<sup>[8]</sup>, 但偏分离的情况在拟南芥(*A. rabidopsis thaliana* Heynh.)<sup>[9]</sup>和针叶树<sup>[6]</sup>等研究中仍然存在, 即使对完全或部分双列杂交材料的研究中, 偏分离位点的比例仍较高<sup>[8,10]</sup>。本研究利用尾叶桉(*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake) × 细叶桉(*E. tereticornis* Smith) 的 2 个亲本和 212 个子代个体, 在较大群体材料

收稿日期: 2000-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(39870619)和国际科学基金项目(International Foundation for Science, IFS)(D/2947-1)

作者简介: 甘四明(1970-), 男, 四川邻水人, 助理研究员, 农学博士

的基础上分析RAPD标记在杂种子代中的分离模式,以期为桉树RAPD标记连锁图谱构建提供理论上的分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

研究材料包括尾叶桉和细叶桉2个亲本及其杂交产生的212个全同胞子代。1996年秋进行控制授粉,1997年夏采种育苗,9月底移苗,11月底采叶样。

### 1.2 DNA提取和RAPD反应

取各子代和亲本叶样1g左右用于DNA提取。DNA提取采用CTAB法<sup>[11]</sup>,RAPD反应参考甘四明等的方法<sup>[12]</sup>。备选引物40个(OPA P01~20和OPA S01~20)(Operon公司),利用2个亲本和6个子代进行引物筛选,筛选出多态性高、能扩增清晰明亮谱带的7个引物用于正式扩增(表1)。

表1 正式扩增的随机引物及扩增位点

引物	序列	$N_t$	$N_{ps}$	$N_{pns}$	$N_{nps}$
OPA P07	5' ACCACCCGCT 3'	7	5	1	0
OPA P10	5' TGGGTGA TCC 3'	5	2	1	1
OPA P12	5' GTCTTACCCC 3'	5	1	2	0
OPA S10	5' CCCGTCTACC 3'	7	2	3	1
OPA S14	5' TCGCA GCGTT 3'	5	3	0	0
OPA S18	5' GTTGC GCA GT 3'	6	4	0	1
OPA S20	5' TCTGCCTGGA 3'	5	4	0	0
合计	7	40	21	7	3

注: $N_t$ 为扩增出的总谱带数; $N_{ps}$ 为在2个亲本间呈多态性且在子代中分离的谱带数; $N_{pns}$ 为在2个亲本间呈多态性而在子代中不分离的谱带数; $N_{nps}$ 为2个亲本俱有而在子代中分离的谱带数。

### 1.3 RAPD标记的分离分析

RAPD谱带用“0”代表无,“1”代表有进行统计。每条谱带名称包括引物名、谱带长度和强度。谱带强度分为3个等级,3为最强(表2)。假设RAPD标记为一对等位基因按显性方式遗传,则具有某条谱带的亲本在该位点上的基因型为AA或Aa,而无该谱带的亲本为aa,由此推断该谱带在子代中的理论分离。用 $\chi^2$ 进行适合度检验, $\alpha=0.05$ 。

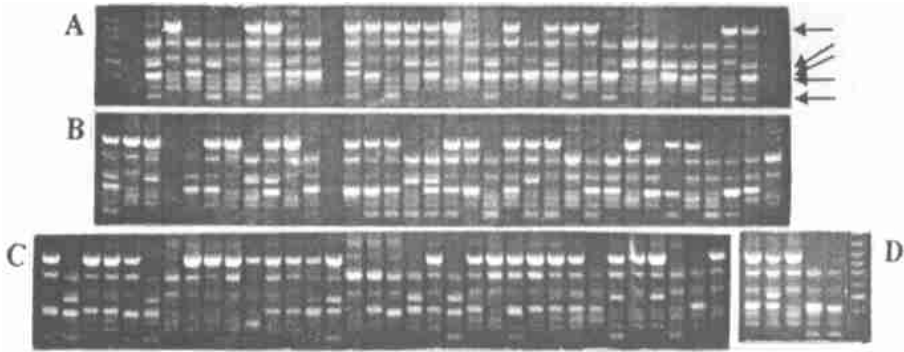
## 2 结果与讨论

### 2.1 RAPD扩增结果

从40个引物中筛选出7个用于正式扩增,7个引物共扩增出40条谱带,表1列出了不同引物扩增的总谱带数( $N_t$ )、亲本间多态性且在子代中分离的谱带数( $N_{ps}$ )、亲本间呈多态性而在子代中不分离的谱带数( $N_{pns}$ )和亲本均有而在子代中分离的谱带数( $N_{nps}$ )。不同引物扩增的 $N_t$ 和 $N_{ps}$ 有差异,引物OPA P07扩增的 $N_t$ 和 $N_{ps}$ 最高,这表明进一步筛选引物的必要。图1显示了用引物OPA P07对2个亲本和部分子代的扩增结果。

扩增谱带的长度介于1.8kb(引物OPA S20)~230bp(引物OPA S10)。40条谱带中,在亲本和子代中均无多态性的有9条(22.5%),在亲本中有多态性而在子代中不分离的有7条

(18.5%) (包括母本特有的 3 条和父本特有的 4 条), 亲本中呈多态性且在子代中分离的有 21 条(52.5%), 亲本中均有而在子代中分离的有 3 条(7.5%)。共有 28(21+7) 条谱带(70.0%) 在亲本中呈多态性, 24 条(60.0%) 在子代中分离, 这也表明亲本的多态性较高。就杂合性而言, 母本总谱带(位点) 28 条, 在子代中分离的杂合位点 16 个, 杂合度为 57.1%; 父本总谱带(位点) 24 条, 杂合位点 11 个, 杂合度为 45.8%, 表明亲本的杂合度较高, 选择该家系用于作图是可行的。



箭头示在子代中分离的标记谱带(从上到下依次为 OPA P07-830/3、-490/2、-420/3、-400/3 和 -250/2)。A 板第 2 泳道为母本尾叶桉(因缺失补在 D 板第 1 泳道), 第 3 泳道为父本细叶桉, A 板其余泳道及 B 板和 C 板均为子代, D 板依次为前三板缺失的样品的补充, A 板第 1 泳道和 D 板最后泳道为标记 DNA 长度和 Marker (MBD), 从上到下显示的谱带长度依次为 1031、900、800、700、600、500、400 和 300 bp。

图 1 引物 OPA P07 对 2 个亲本和 99 个子代的扩增结果

## 2.2 RAPD 标记的分离

不同 RAPD 标记在子代中的分离比例见表 2。利用  $\chi^2$  检验 RAPD 标记的遗传和分离是否符合一对等位基因的孟德尔方式, 显著水平为  $\alpha=0.05$ 。

24 个分离位点按其分离特点和适合度检验可以分为以下 4 组: 第 I 组 9 个位点符合 1:1 分离; 第 II 组 2 个位点符合 3:1 分离; 第 III 组 12 个位点偏离 1:1 分离, 其中 10 个偏母本分离, 2 个偏父本分离; 第 IV 组 1 个位点偏离 3:1 分离。可见, 本研究中偏分离的比例较高, 共有 13 个位点偏分离。值得指出的是, 偏离 1:1 分离的 12 个位点中(第 III 组), 绝大多数位点的分离表现为一种趋母本的现象。例如, 位点 OPA P07-830/3 为母本特有谱带, 在子代中大多数个体具有此位点(125/87,  $p < 0.01$ ); 而位点 OPA P07-490/2 为父本特有谱带, 母本没有, 则子代中大多数个体表现与母本一致(66/146,  $p < 0.005$ )。可能母本对 RAPD 标记的遗传有一定的影响。

RAPD 分子标记技术的一个不足是扩增中随机引物在退火时容易与模板发生错配, 导致重复性差<sup>[13]</sup>。这可以通过严格控制 RAPD 实验体系的扩增程序和只记录重复性好的强带得到改进。本研究中, 补充的几个样品都是另外配制和扩增的(图 1 的 D 板), 其带型与其它几个板基本一致, 说明重复性较好, 与正式扩增的样品具有较高的可比性。

本研究的偏分离位点的比例仍相当高。分子标记位点的偏分离现象已在较多植物中报道<sup>[14]</sup>。其可能原因是: (1) 非等位位点的共带现象 (Co-migrating bands), 尤其对 RAPD 和 AFLP 等高产标记系统<sup>[15]</sup>; (2) 研究群体偏小<sup>[6]</sup>; (3) 杂种中有配子选择或隐性纯合致死的等位

表2 24个RAPD位点的分离和适合度检验

分组(位点数)	位点	母本	父本	分离比(1s 0s)	期望比值	$\chi^2$	概 率
第I组 (9)	OPA P07-420/3	1	0	107 105	1 1	0 004 7	> 0 90
	OPA P10-670/2	1	0	101 111	1 1	0 382 1	0 50~ 0 75
	OPA P12-580/3	1	0	117 95	1 1	2 080 2	0 10~ 0 25
	OPA S10-1000/2	1	0	104 108	1 1	0 021 2	0 75~ 0 90
	OPA S10-880/3	1	0	119 93	1 1	1 474 1	0 10~ 0 25
	OPA S18-580/2	1	0	120 92	1 1	3 438 7	0 05~ 0 10
	OPA S18-550/3	1	0	118 94	1 1	2 495 3	0 10~ 0 25
	OPA S20-500/2	0	1	102 110	1 1	0 231 1	0 50~ 0 75
	OPA S20-490/2	1	0	92 120	1 1	3 438 7	0 05~ 0 10
第II组 (2)	OPA S18-290/1	1	1	151 61	3 1	1 415 1	0 10~ 0 25
	OPA S10-1200/3	1	1	171 41	3 1	3 327 0	0 05~ 0 10
第III组 (12)	OPA P07-830/3	1	0	125 87	1 1	6 457 5	0 005~ 0 01*
	OPA P07-490/2	0	1	66 146	1 1	29 438 7	< 0 005*
	OPA P07-400/3	0	1	67 145	1 1	27 967 0	< 0 005*
	OPA P07-250/2	0	1	77 135	1 1	15 325 5	< 0 005*
	OPA P10-570/1	1	0	123 89	1 1	5 136 8	0 01~ 0 025*
	OPA S14-1350/2	0	1	71 141	1 1	22 457 5	< 0 005*
	OPA S14-950/3	1	0	138 74	1 1	18 721 7	< 0 005*
	OPA S18-490/2	1	0	139 73	1 1	19 929 2	< 0 005*
	OPA S20-1030/2	0	1	73 139	1 1	19 929 2	< 0 005*
	OPA S20-430/2	1	0	136 76	1 1	16 419 8	< 0 005*
第IV组(1)	OPA S14-750/2	0	1	146 66	1 1	29 438 7	< 0 005*
	OPA S18-630/3	0	1	145 67	1 1	29 967 0	< 0 005*
	OPA P10-530/2	1	1	134 78	3 1	15 100 6	< 0 005*

注: \* 示显著偏离 0 05 水平。

基因的存在<sup>[16-18]</sup>; (4) 与研究材料有关, 如种间杂种比种内杂种的偏分离比例大<sup>[19]</sup>; (5) 单个亲本的细胞质基因组的细微影响<sup>[10]</sup>; (6) 染色体在杂交过程中存在结构重排、缺失、插入和突变<sup>[20, 21]</sup>。本研究中, 亲本树种尾叶桉与细叶桉遗传差别较大, 尾叶桉主要天然分布于印度尼西亚及附近岛屿, 细叶桉主要天然分布于澳大利亚, 且两树种在树皮颜色、叶色、叶形、叶子大小及果形等方面也差别明显, 因此亲本的较大遗传差异可能是导致RAPD标记偏分离严重的重要原因。另外, Heun 和 Helentjaris<sup>[10]</sup>为了解决偏分离的问题, 提出判读位点时可把RAPD标记分为“质量多态性”(Unambiguous polymorphism)和“数量多态性”(Quantitative polymorphism), 前者指直观的有/无谱带, 后者指谱带强度的多态性, 即把相同长度的片段按强度不同而分别统计。这虽可在一定程度上减少偏分离位点的数量, 但在实际操作中, 谱带强弱的判断有很大的主观性, 所以在实用中难于把握, 较少应用。

有的研究报道, 子代中有非亲RAPD标记出现, 这是因为两亲本的不同长度的等位核苷酸序列在子代形成异源双链体<sup>[22, 23]</sup>。但在本研究中, 子代的所有谱带均可在亲本中找到, 亲本的谱带也可在子代中找到, 表明RAPD位点具有可靠的遗传性。同时, 有一定数量的谱带服从孟德尔的一对等位基因的遗传规律, 表明RAPD可以作为遗传标记<sup>[10, 22]</sup>, 并且第I组的位点是将来遗传图谱构建的有用标记。这为利用RAPD标记进行桉树遗传连锁图谱构建提供了理论支持。

## 参考文献

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531~ 6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24): 7213~ 7218.
- [3] 卢江. 随机放大多态性DNA (RAPD) ——一种新的遗传标记技术[J]. *植物学报*, 1993, 35(增刊): 119~ 127.
- [4] 邹喻萍. RAPD 分子标记简介[J]. *生物多样性*, 1995, 3(2): 104~ 108.
- [5] 甘四明, 施季森, 白嘉雨, 等. 林木分子标记研究进展[J]. *林业科学研究*, 1998, 11(4): 428~ 434.
- [6] Carlson J E, Tulsieram L K, Glaubitz J C, et al. Segregation of random amplified DNA markers in F<sub>1</sub> progeny of conifers [J]. *Theor Appl Genet*, 1991, 83(2): 194~ 200.
- [7] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudotestcross mapping strategy and RAPD markers [J]. *Genetics*, 1994, 137(4): 1121~ 1127.
- [8] Roy A, Frascaria N, MacKay J, et al. Segregating random amplified polymorphic DNA s (RAPDs) in *Betula alghaniensis* [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 85(2): 173~ 180.
- [9] Reiter R S, Williams J G K, Feldmann K A, et al. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA s [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(4): 1477~ 1481.
- [10] Heun M, Helentjaris T. Inheritance of RAPDs in F<sub>1</sub> hybrids of corn [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85(6): 961~ 968.
- [11] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1990, 12(1): 13~ 14.
- [12] 甘四明, 施季森, 白嘉雨, 等. 尾叶桉和细叶桉无性系 RAPD 指纹图谱构建研究[J]. *南京林业大学学报*, 1999, 23(1): 11~ 14.
- [13] Neale D B, Harry D E. Genetic mapping forest trees: RFLPs, RAPDs and beyond [J]. *AgBioTech News Inf*, 1994, 6: 107~ 114.
- [14] Xu Y. Quantitative trait loci: separating, pyramiding, and cloning [J]. *Plant Breeding Reviews*, 1997, 15: 85~ 139.
- [15] Virk P S, Ford-Lloyd B V, Newbury H J. Mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and an investigation of segregation distortion [J]. *Heredity*, 1998, 81(3): 613~ 620.
- [16] Sniezko R A, Zobel B J. Seedling height and diameter variation of various degrees of inbred and outcross progenies of loblolly pine [J]. *Silvae Genet*, 1988, 37(1): 50~ 60.
- [17] Lanham P G. Estimation of heterozygosity in *Ribes nigrum* L. using RAPD markers [J]. *Genetica*, 1996, 98(1): 193~ 197.
- [18] O'Leary M C, Boyle T H. Segregation distortion at isozyme locus *Lap-1* in *Schltum bergera* (Cactaceae) is caused by linkage with the gametophytic self-incompatibility (S) locus [J]. *J Hered*, 1998, 89(3): 206~ 210.
- [19] Byrne M, Murrell J C, Allen B. An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91(6~ 7): 869~ 875.
- [20] 刘孟军, Shin Yong-Uk, Yae Byeong-Woo. RAPD 标记在苹果属种间杂交一代的分离方式[J]. *园艺学报*, 1998, 25(3): 214~ 219.
- [21] Faure S, Noyer J L, Horry J P. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa accuminata*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 87(4): 517~ 526.
- [22] Riedy M F, Hamilton W J, Aquadro C F. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(2): 918~ 924.
- [23] Ayliffe M A, Lawrence G J, Ellis J G, et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause non-parental RAPD bands [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(9): 1632~ 1636.

## Segregation of RAPD Markers: A Case in Interspecific Cross of *Eucalyptus*

GAN Siming<sup>1</sup>, SHI Jisen<sup>2</sup>, BAI Jiayu<sup>1</sup>, WU Kunming<sup>1</sup>, WU Juying<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** Seven 10-mer primers were used for analysis on segregation of RAPD (Random amplified polymorphic DNA) markers in an interspecific  $F_1$  population of *Eucalyptus urophylla*  $\times$  *E. tereticornis*, including 2 parents and 212 sibs. Of the total 40 fragments amplified, 28 (70%) were polymorphic between parents and 24 (60%) segregant in the sibs, indicating a high level of polymorphism and heterozygosity at RAPD loci between the two parents. There were 27 markers segregating in a Mendelian pattern, including 9 markers presenting in both parents and all sibs (representing a genotypic combination AA  $\times$  AA, AA  $\times$  Aa or Aa  $\times$  AA), 7 markers polymorphic between the parents but homologous in all sibs (AA  $\times$  aa or aa  $\times$  AA), 2 markers presenting in both parents and segregating in the sibs in a ratio 3 : 1 (Aa  $\times$  Aa), and 9 markers polymorphic between the parents and segregating in the sibs in a ratio 1 : 1 (Aa  $\times$  aa or aa  $\times$  Aa). There were 13 markers segregating in a nonmendelian pattern, including 12 markers polymorphic between parents but segregating in the sibs in a ratio distortive from 1 : 1, and 1 marker homologous in both parents but segregating in the sibs in a ratio distortive from 3 : 1. Those markers that were polymorphic between parents and segregating 1 : 1 in the sibs, following a pseudo-testcross configuration, could be potentially useful for genetic linkage map construction of the representative species, which would lay a theoretical basis for genetic linkage map construction using RAPD markers and  $F_1$  population.

**Key words:** RAPD marker; *Eucalyptus*; segregation