

文章编号: 1001-1498(2003)03-0372-04

辐射百合雄性不育突变体的 RAPD 分析

张克中¹, 赵祥云¹, 陆长甸², 黄善武², 张启翔³

(1. 北京农学院园林系,北京 102206; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所,北京 100081;
3. 北京林业大学园林学院,北京 100083)

关键词: 王百合;辐射育种;雄性不育;RAPD 分析

中图分类号:S682.2⁺9 文献标识码:A

近年来,分子标记辅助育种取得了较大进展,各种标记方法的广泛使用极大地加快了新品种的选育速度。随机引物扩增 DNA 多态性分子标记(RAPD)因其灵敏度高、速度快,可对整个基因组进行标记且费用和技术难度较低,易于应用而倍受青睐^[1],已在植物亲缘关系与品种鉴定^[2-4]、遗传多样性检测^[5,6]、遗传图谱的构建与基因定位^[7]、辅助选择育种^[8,9]、育种材料的早期的选择、突变体的鉴定等方面得到了较多的应用^[10-13]。

由于突变体是植物基因组(达 2.0×10^9 bp)少数位点发生突变的结果,1 个随机引物仅能检测基因组的极少部分,因而突变体的检测相对困难,RAPD 分子标记数量大,而且在很短时间内可以探测大量的 DNA 位点,为区分突变体提供可能。人们通过 RAPD 鉴定出桃(*Amygdalus persica* L.)^[14]、樱桃(*Prunus avium* Thunb.)^[15]、美洲黑杨(*Populus deltoides* Marsh.)^[12]、菊花(*Chrysanthemum morifolium* Tzvel.)^[17]、白薯(*Ipomoea batatas* L.)^[18]等植物中发生的各种突变体便是很好的例证。

1998—2002 年期间,北京农学院园林系与中国农科院蔬菜花卉所合作,以⁶⁰Co 辐射王百合(*Lilium regale* Wilson.)种球,辐射后剥取外部鳞片扦插诱发不定芽植株,开花时初选出 17 个表现型突变体,其中 13 个为雄性不育突变体。本试验采用 RAPD 分子标记技术,对王百合及 13 个表现型雄性不育突变体进行 RAPD 分析,旨在从 DNA 水平进行早期筛选,淘汰非遗传因素形成的雄性不育个体,确定出真正的雄性不育突变体。

1 材料与方法

1.1 试验材料

王百合及其 13 个表现型雄性不育突变体‘王 1001’~‘王 1003’,‘王 2001’~‘王 2003’,‘王 2005’,‘王 2007’,‘王 2008’,‘王 3001’,‘王 3003’~‘王 3005’。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 取 0.3 g 百合新鲜嫩叶液氮研磨至粉末。DNA 提取采用 CTAB 法^[19]。

1.2.2 引物 选用 Operon 公司生产的随机引物 300 个:A01~A20,C01~C20,D01~D20,

收稿日期: 2002-10-25

基金项目: 北京市自然科学基金项目(6982008)的部分研究内容

作者简介: 张克中(1968—),男,湖北应城人,北京农学院教师,北京林业大学博士生。

F01 ~ F20, J01 ~ J20, K01 ~ K20, L01 ~ L20, N01 ~ N20, P01 ~ P20, Q01 ~ Q20, R01 ~ R20, U01 ~ U20, V01 ~ V20, X01 ~ X20, Y01 ~ Y20。Marker 采用鼎国生物技术公司生产的 D015-2。

1.2.3 PCR 反应 反应体系为:25 μL 反应体积,内含 DNA 模板浓度为 40 ~ 100 ng;10 \times buffer 2.5 μL ; MgCl_2 2.5 ~ 3.5 mmol L^{-1} ; dNTP200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; TaqDNA polymerase 1.5 单位(U);10 个核苷酸引物浓度为 16.5 ng。扩增反应在 PE480 DNA 扩增仪上进行,扩增程序如下:94 3 min 预变性;94 变性 50 s,36 复性 40 s,72 延伸 1 min 20 s,41 个循环;94 变性 50 s,36 复性 40 s,72 延伸 10 min,1 个循环;4 保温。反应物产物在 1.2% 琼脂糖胶上(加有 EB)以 3.5 V cm^{-1} 电场强度电泳 2.0 ~ 2.5 h。紫外检测仪上观察照像。

2 结果与分析

300 个随机引物中,对所有材料能扩增出带的引物有 93 个,其中‘王 1G01’、‘王 1G02’、‘王 2G01’、‘王 2G02’、‘王 2G05’、‘王 2G07’、‘王 2G08’、‘王 3G01’、‘王 3G03’、‘王 3G04’、‘王 3G05’与王百合 RAPD 图谱之间没有显著差异。

‘王 2G03’、‘王 1G03’与王百合 RAPD 图谱之间有显著差异,能产生稳定多态性差异的引物有 14 个(表 1,图 1),占所用引物的 4.7%。由表 1、图 1 可以看出,多态性主要表现为两种情况:一是不育比可育增加了扩增片段,二是不育比可育减少了扩增片段。‘王 2G03’与王百合相差 21 个多态性位点,‘金王二号’与王百合相差 25 个多态性位点。‘王 2G03’与‘金王二号’相差 21 个多态性位点。可见,‘王 2G03’、‘王 1G03’已经在 DNA 组成上发生了改变,可确定为真实突变体。‘王 2G03’与‘王 1G03’的扩增图谱也有较大差异,说明是两个不同的突变体。

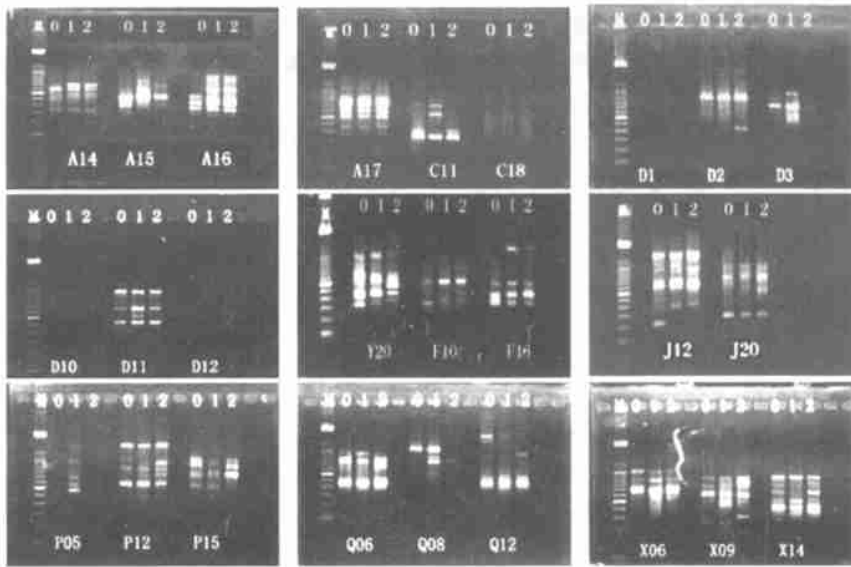
表 1 不育株与可育株的多态性位点

引物	碱基序列	检测位点			多态性片段长度/bp		
		王百合	王 2G03	王 1G03	王百合	王 2G03	王 1G03
A14	TCTGTGCTGG	4	5	5		800	800
A15	TTCGAACCC	2	2	2	400	600	800
A16	AGCCAGCGAA	3	4	4	600	500, 700	500, 700
C11	AAAGCTCGGG	2	3	3	400	700, 800	400
D02	GGACCCAACC	2	2	2	700	700	400
D11	AGCGCCATTG	6	6	6	1 400	600	600
F16	GGAGTACTGG	3	4	4		1 500	1 500
J12	GTCCCGTGGT	4	3	3	250, 400		
P12	AAGGGCGAGT	3	4	5		800	800, 1 100
P15	GGAAGCCAAC	4	2	5	1 100, 1 200		1 000, 1 100, 1 200
Q06	GAGCGCCTTG	3	3	3	1 200	1 200	800
Q08	CTCCAGCGGA	2	3	1		1 300	1 000, 1 300
X09	GGTCTGGTGTG	4	3	6	350, 900, 1 100	250, 350	250, 400, 900, 1 000, 1 100
X14	ACAGGTGCTG	3	3	3	600	600	450

3 讨论

导致植物雄性不育性的因素是多种多样的。雄性不育性可能是遗传的,也可能非遗传的,可能是自发产生的,也可能是诱导产生的。

辐射产生的表现型雄性不育突变体,可能是基因突变(遗传因素)、不良环境条件(如高温、干旱、不良光照等非遗传因素)及辐射产生的生物学效应(诱导因素)等引起的。辐射诱变处理



M 代表 Marker D015-2, 0 代表王百合, 1 代表突变体‘王 2003’, 2 代表突变体‘1003’

图1 王百合及其 2 个雄性不育突变体 RAPD 图谱比较

第一代可检测的一个重要生物学效应就是 M1 或 V1 植株的不育性。这种不育性有各种解释,包括点突变、染色体畸变(如缺失或易位等)、细胞质突变和生理效应;因而这种不育性可能是遗传的,也可能是非遗传的(可恢复的)。

常规检测雄性不育突变体的方法是采用表现型检测,如观察雄性器官的形状异常情况、花粉有无及花粉活力的大小等。由于表现型检测受辐射的后效应、环境及基因型的互作影响,检测结果直观但往往不可靠。DNA 分子标记检测由于直接对基因组进行检测,其灵敏性及可靠性都较高。表现型检测与分子标记检测的结合,可以尽早缩小真突变体的选择范围,提高了选育效率。

RAPD 分析结果表明,其中的 11 个表现型雄性不育突变体,目前的 93 个引物扩增的 RAPD 带型与王百合没有差异,是否为基因型突变体还有待进一步检测。另 2 个表现型雄性不育突变体‘王 2003’、‘王 1003’与王百合(可育对照)的 RAPD 图谱有明显差异,初步确定为基因型突变体;但是否为基因型雄性不育突变体,还有待进一步研究。因为某些生化突变可能也表现出 RAPD 标记的多态性,但在形态上不一定能识别出来。

通过鳞片扦插把‘王 2003’、‘王 1003’繁殖成无性系,形成 V2 代植株。V2 代植株开花时,其雄性败育情况与 V1 代表现一致,并且雄性不育无性系的花器官在内源激素^[15]、同功酶、氨基酸、蛋白质及糖类与王百合有显著差异,因而可基本确定这两个突变体为真雄性不育突变体。可见 RAPD 分子标记检测在雄性不育突变体的早期筛选中起了重要作用。至于这些 RAPD 标记是否为与雄性不育基因连锁的分子标记,将通过杂交及杂交后代的检测作进一步的验证。

参考文献:

- [1] 钱惠荣. DNA 标记与育种[J]. 生物工程进展, 1998, 18(3): 12~18
- [2] Novy R G, Vorsa N. Identification of intracultivar genetic heterogeneity in cranberry using silver-stained RAPD[J]. Hort Science, 1995, 30(3): 600~604

- [3] 罗正荣,米森敬三,杉浦明. 应用 RAPD 技术研究柿品种间的亲缘关系[J]. 果树科学,1998,15(4):311~316
- [4] 林同香,陈振光,戴思兰,等. RAPD 技术在龙眼品种分类中的应用研究[J]. 植物学报,1998,40(12):1159~1165
- [5] Luro F, Laigret F, Bover J M. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in citrus[J]. Hort Science, 1995, 30(5): 1063~1067
- [6] Graham J, Mcnicol R J, Mcnicol J W. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars[J]. Theor Appl Genet, 1996, 95: 402~406
- [7] Rajapakse S, Belthoff L E, Scorza R, et al. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 503~510
- [8] Tartarini S. RAPD markers linked to the Vf gene for scab resistance in apple[J]. Theor Appl Genet, 1996, 92 (7) :803~810
- [9] 王跃进,王西平,周鹏,等. 中国野生葡萄抗黑痘病基因的 RAPD 标记[J]. 园艺学报,2000,27(5):321~325
- [10] 卢孟柱,王晓茹,Alfred E Szmidt. PCR-SSCP 用于针叶树种遗传分析的可行性[J]. 林业科学研究,2000,13(4):349~354
- [11] 甘四明,施季森,白嘉雨,等. RAPD 标记在桉属种间杂交一代的分离方式研究[J]. 林业科学研究,2001,14(2):125~130
- [12] 余义勋,张俊卫,孙振元,等. 香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆与植物表达载体构建[J]. 林业科学研究,2002,15(3):256~260
- [13] 卓仁英,孟现东,陈益泰. 桉木群体遗传分化研究 I. DNA 提取和 PCR 条件的建立[J]. 林业科学研究,2003,16(1):117~122
- [14] 金勇丰,张耀洲,陈大明,等. 桃早熟芽变品种“大观一号”的 RAPD 分析及其特异片段的克隆[J]. 果树科学,1998,15(2):103~106
- [15] 张开春. 樱桃茎尖培养后的早熟变异与 RAPD 鉴定[J]. 果树科学,2000,17(3):225~227
- [16] Rani V, Paroda A, Rama S N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. [J]. Plant Cell Report, 1995, 14:459~462
- [17] Wolff K. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum[J]. Euphytica, 1996, 88:159~164
- [18] Villordon A Q, LaBonte D R. Genetic variation among sweet potatoes propagated through nodal and adventitious sports[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1996, 121(20):170~174
- [19] 顾红雅,瞿礼嘉. 植物分子生物学:实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998.3~12
- [20] 张克中,赵祥云,张启翔,等. 王百合雄性不育突变体花药发育过程中内源激素变化[J]. 北京林业大学学报,2003,25(1):112~116

RAPD Analysis on Male Sterility Mutant Initiated from Irradiation Lily

ZHANG Ke-zhong¹, ZHAO Xiang-yun¹, LU Chang-xun², HUANG Shan-wu², ZHANG Qi-xiang³

(1. Department of Landscape and Gardening, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;

2. Institute of Vegetable and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China;

3. College of Landscape and Gardening, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: RAPD analysis on *Lilium regale* and its 13 phenotype male sterility mutants initiated from irradiation bulbs was made by means of 300 random 10-mer primers. Of the tested primers, 93 primers produced ideal amplification bands on all materials, 14 primers generated stable different polymorphic bands among mutant 'Wang 2003', mutant 'Wang 3003' and *Lilium regale*. 21 different polymorphic bands were found between 'Wang 2003' and *Lilium regale*. 25 different polymorphic bands existed between 'Wang 1003' and *Lilium regale*. It was showed that 'Wang 2003' and 'Wang 1003' were two real different male sterility mutants of *Lilium regale*. From the 93 primers RAPD bands, the other 11 phenotype male sterility mutants showed no difference in comparison with *Lilium regale*. It was proposed that more test need to be made to identify whether they were real mutants.

Key words: *Lilium regale*; irradiation breeding; male sterility; RAPD analysis