

亚麻显性雄性核不育基因的 RAPD 标记

高风云¹, 张 辉², 斯钦巴特尔²

(1. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019, 2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要:应用 252 条 10-mer 随机引物对遗传背景相似的可育株和不育株亚麻进行了 RAPD 分子标记, 在不育株与可育株之间寻找 DNA 的多态性差异带, 结果发现, 在 252 条随机引物中有 2 条引物(即 S62 和 S135)可分别得到 1 个与显性核不育的雄性基因有关的 RAPD 分子标记为 S62-500 和 S135-350。

关键词: 亚麻; 显性雄性核不育; RAPD 标记

中图分类号: S563.235.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)01-0129-03

A Study on RAPD Markers Linked to Dominant Male Nucleus Sterile Gene of Flax

GAO Feng-yun¹, ZHANG Hui², SI Qin-ba-teer²

(1. Institute of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010019, China;

2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: A total 252 arbitrary 10-mer primers were used to screen the dominant male genomic sterile and male fertile gene in flax. Two primers were found, S62 and S135, respectively, could produce RAPD markers correlated with dominant genomic male sterile gene, which are S62-500 and S135-350.

Key words: Flax; Dominant Genomic Male Sterile; RAPD Markers

雄性不育是植物界一种普遍存在的现象, 迄今已在 43 个科 162 个属 617 种植物中发现了这一现象, 其中包括水稻、小麦、玉米、油菜、棉花和亚麻等主要农作物^[1]。而亚麻雄性核不育是由内蒙古农牧业科学院首次发现并报道^[2], 其不育类型为显性核不育。在亚麻的形态学研究中, 对花粉发育过程的观察, 发现不育株花粉退化的原因是由于绒毡层过早解体, 即在减数分裂中期 I 开始解体, 到了四分体时期, 绒毡层基本解体。小孢子自四分体释放出来后, 得不到供养而退化败育^[2,3]。

近年来, 分子标记辅助改良农作物品种在国内 外取得了较大的进展, 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^[4]。随机扩增 DNA 多态性分子标记因其灵敏度高、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^[3], 已在农作物高产、优质、抗病虫害等性状和作物品系鉴定, 构建高密度遗传图谱等方面得到了较多的应用^[4-8]。目前分子标记在亚麻上的应用比较少^[9], 迄今为止有加拿大的 Yong-BiFu 等对

加拿大的植物基因资源中的亚麻分子特征进行过 RAPD 标记, 我国的薄天岳等人对亚麻抗锈病基因^[10]、抗枯萎病基因进行了标记^[11]。因此, 采用 RAPD 技术对亚麻显性雄性核不育基因进行分子标记的初步研究, 将为亚麻雄性不育基因的分离和克隆并深入研究其表达特征, 以至于阐明雄性不育机理和拓宽作物杂种优势的利用范围, 都有极其重要的意义, 同时, 也为亚麻育种提供了一个新的发展方向。

1 材料和方法

用 1 对遗传背景相似的可育和不育亚麻为材料(由内蒙古农牧业科学院甜菜所亚麻组提供), 将杂种 F₁ 亚麻播种, 出苗后直到开花时从花色、花药形态及花粉有无辨别可育和不育, 即为杂种 F₁ 产生的育性分离, 从而, 可得到遗传背景相似的可育株和不育株亚麻。分别以可育株和不育株的新鲜叶片为材料, 用 252 种随机引物进行了 RAPD 分析, 寻找两者之间的 DNA 多态性差异。

收稿日期: 2006-01-13

基金项目: 国家自然科学基金(30460069); 内蒙古自然科学基金(200508010301)

作者简介: 高风云(1977-), 女, 内蒙古化德人, 硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究工作

通讯作者: 张 辉(1961-), 女, 内蒙古集宁人, 硕士生导师, 主要从事作物遗传育种研究工作。

引物: 10-mer 随机引物购自 Sangon; HotStart Taq DNA 聚合酶购自北京天为时代科技有限公司。PCR 仪: 德国, 型号为 Eppendorf。

1.1 亚麻总 DNA 的提取

取亚麻幼苗的新鲜叶片, 采用北京天为时代科技有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)进行亚麻基因组 DNA 的提取。

1.2 RAPD 反应

采用 25 μ L 反应体系, 成分包括 2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μ L; 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L; 10 μ mol/L 10-mer Primer 2.0 μ L; 17 ng/ μ L DNA 2.0 μ L; 2.5 U/ μ L HotStart Taq DNA 聚合酶 1.5 μ L; 灭菌的超纯水 14.5 μ L。按反应体系加反应液后, 先经 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行以下热循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 37 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶, 在 0.5 \times TBE 缓冲液中, 60 V 电压下进行电泳(平板电泳), 160 min 后, 溴乙锭染色 30 min(溴乙锭浓度为 0.5 μ g/mL), 在紫外光下观察后, 再把凝胶放在多通道分子成像仪中拍照。

2 结果与分析

2.1 提取的亚麻总 DNA 的浓度与质量检测

2.1.1 亚麻总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析 从图 1 提取的亚麻总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果可以看出, DNA 谱带既亮又整齐没有出现拖尾和弥散现象, 并且加样孔又没有蛋白和其他物质, 说明 DNA 纯度很高, 没有其他杂质的污染, 也没有降解。提取的 DNA 可以作为 RAPD 分析中 PCR 反应的模板。

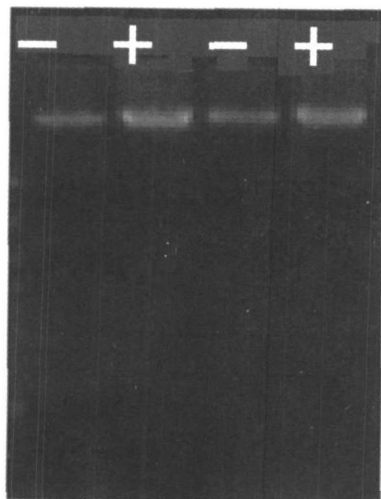


图 1 用试剂盒法提取的亚麻 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig 1 Gel electrophoresis graph of Flax DNA extracted by Kit

2.1.2 亚麻总 DNA 紫外分光光度计检测 经紫外

分光光度计检测以上提取的 DNA 在 OD₂₆₀处都有显著吸收峰, A₂₆₀/A₂₈₀为 1.92, 在 1.8~2.0。上述两种检测结果显示, 提取的亚麻总 DNA 浓度和纯度都达到了 RAPD 的分析标准。

2.2 RAPD 标记产物的琼脂糖凝胶电泳结果分析

用 252 条引物对 F₁ 产生的育性分离得到遗传背景相似的可育株和不育株亚麻的核 DNA 进行扩增反应, 在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳上分离出大小不同的 DNA 片段。不同的引物扩增的 DNA 片段从 1~6 条不等, 平均每条引物产生 3 条扩增带, 扩增产物的大小变化在 200~2000 bp。

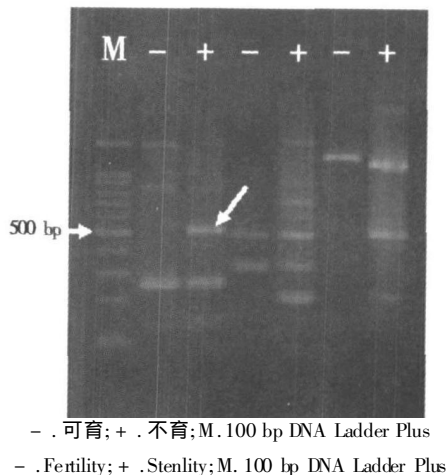


图 2 引物 S62 的 RAPD 反应
Fig 2 The RAPD reaction of primer of S62

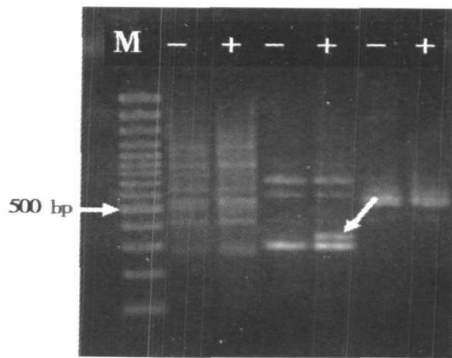


图 3 引物 S135 的 RAPD 反应

Fig 3 The RAPD reaction of primer of S135

从图 2, 3 可以看出, 在 252 条随机引物中, 有 2 条引物 S62(GTGAGGCGTC), S235(CCACTACTCC) 在杂种 F₁ 产生的育性分离得到遗传背景相似的可育株和不育株亚麻中扩增出稳定的多态性带, 经过多次的重复试验, S62 和 S135 均表现出不育株比可育株多 1 条带, 其差异带的大小分别约为 500 和 350 bp。根据所用引物名称及扩增片段的大小, 我们把差异片段分别命名为 S62-500, S135-350。由于 F₁ 产生的育性分离得到的可育株和不育株亚麻的遗传背

景相似,主要是在育性上存在差异,因此,可以推断出这些差异与显性核不育的雄性基因有关。

3 讨论

在试验中发现,由于试验条件的改变,对于同一材料,使用同一引物,合成的谱带可能会有出入。而引物 S135 和 S62 获得的稳定的多态性差异带,出现的频率分别为 71.4% 和 75.0%。尽管 RAPD 标记的可靠性差,但可以将 RAPD 标记进行克隆测序转换成 SCAR 标记,这样可极大地提高其标记的准确性和可靠性,并把它用在亚麻的育种工作中。

参考文献:

- [1] 刘秉华. 作物显性核不育基因的分类起源及在杂种生产中利用的可能性[J]. 作物杂志, 1991(3): 26–28.
- [2] 张辉, 陈鸿山, 王宜林. 显性核不育亚麻的雄性不育研究[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(增刊): 144–146.
- [3] 钱惠荣, 郑康乐. DNA 标记和分子育种[J]. 作物工程进展, 1998, 18(3): 12–18.
- [4] 柯枫英, 石永刚, 郑用璉, 等. 玉米淀粉修饰基因 *du* 的 RAPD 标记研究[J]. 作物学报, 1999, 25(1): 1–7.
- [5] 涂金星, 郑用璉, 傅延东. 甘蓝型油菜核不育材料育性

基因的 RAPD 标记[J]. 华中农业大学学报, 1997, 26(4): 218–222.

- [6] Jean M, Brown G G, Landry B S. Targeted mapping approaches to identify DNA markers link to RFPL restorer gene for the Polima CMS of canola (*Brassica napus* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1998(97): 431–438.
- [7] Rector B G, All J N, Parrott W A. Identification of molecular Linked to quantitative trait loci for soybean resistance to con earworm [J]. Theor Appl Genet, 1998(96): 786–790.
- [8] Somer D J, Friesen K R D, Grakow. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in *Brassica napus* [J]. Theor Appl Denet, 1996(96): 897–903.
- [9] 高风云, 张辉, 斯钦巴特尔. 亚麻分子标记技术研究进展[J]. 内蒙古农业科技, 2006(2): 30–31.
- [10] 薄天岳, 叶华智, 王世全, 等. 亚麻抗锈病基因 M4 的特异分子标记[J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 922–927.
- [11] 薄天岳, 叶华智, 李晓兵, 等. 抗枯萎病基因 *Fuj7(t)* 的分子标记[J]. 中国农业科学, 2003, 36(3): 287–291.
- [12] 陈鸿山. 核不育亚麻研究科技[J]. 华北农学报, 1986, 1(1): 87–91.
- [13] 张辉, 张慧敏, 丁敏, 等. 核不育亚麻不育性子标记能的遗传研究[J]. 华北农学报, 1997, 12(3): 73–76.
- [14] 赵君. 几种常用的分子标记技术的比较[J]. 内蒙古农业科技, 1999(3): 32–33.