

栽培亚麻×野生亚麻种间杂交种的真实性鉴定

张丽丽,白 苇,米 君,曲志华,乔海明,李世芳,李爱荣,马建富,郭 娜,刘晶晶

(河北省张家口市农科院,河北 张家口 075000)

摘要:为进一步证明亚麻种间杂交种的真实性,对前人开发的14对SSR引物进行了再次筛选,对栽培种亚麻与多年生宿根型野生亚麻的种间杂交种和亲本之间的亲子关系进行鉴定。结果显示,7对引物能很好地标记出双亲,并成功标记出了1份杂交种与亲本之间存在亲子关系,鉴定了种间杂交种的真实性。

关键词:亚麻;种间杂交;SSR标记;引物筛选

中图分类号:S565.9 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)增刊-0057-04

Identification Interspecific Hybridization between Cultivated Flax and Wild Flax

ZHANG Li-li, BAI Wei, MI Jun, QU Zhi-hua, QIAO Hai-ming, LI Shi-fang, LI Ai-rong,
MA Jian-fu, GUO Na, LIU Jing-jing

(Zhangjiakou Academy of Agriculture Science, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: In order to further prove the authenticity of the hybrids, this article was about the test screened primer from the previous 14 SSR primers and identified the parental relationship between the hybrids and parents. The results showed that 7 primers marked the parents and marked out the parental relationship between hybrid and parents successfully, identified the authenticity of interspecific hybrids.

Key words: Flax; Interspecific hybridization; SSR marker; Screen primer

油纤兼用型亚麻(*Linum usitatissimum* L.)是我国华北和西北的主要油料作物。经过长期的自然选择,人工驯化进行定向培育,由多年生窄叶型野生亚麻演变进化而来。近些年,由于杂交育种所使用的亲本相对集中,新品种的遗传基础渐趋狭窄,性状雷同,但在产量和品质方面再进一步实现大的突破,必须增加和创新种质资源。

多年生野生宿根型亚麻(*Linum perenne* L.)原产中欧、东欧、近东、西伯利亚^[1],据《河北植物志》记载,在我国河北张家口也有分布。通过收集、整理等工作保护野生亚麻资源,开展种间杂交新技术选育亚麻新品种,具有一定的创新作用 and 意义。

米君等^[2-3]通过对亚麻野生种与栽培种种间杂交及种质创新研究,提出了亚麻种间杂交的技术系列,首次获得了亚麻种间杂交的成功^[2-3]。DNA分子标记是20世纪80年代发展起来的一类遗传标记技术,它具有不受环境影响、世代间稳定遗传的特

点,SSR(Simple sequence repeat)普遍存在于真核生物基因组中,又称为简单重复序列。SSR的变异来源于生物长期进化过程中不等交换积累起来的重复次数的变化。SSR两端序列多是相对保守的单拷贝序列,可据两端序列设计一对特异引物,通过PCR扩增得到包含SSR的DNA片段,再经聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶电泳分离并显示SSR变异产生的DNA片段多态性。微卫星标记检测手段简便易行,且结果稳定可靠、重复性好;一般微卫星标记呈现共显性遗传,可以揭示完整的遗传信息;由于SSR标记的多态性主要依赖于基本单元重复次数的变异,而这种变异在生物群体中大量存在,因此,SSR标记的最大优点是具有大量的等位差异,多态性十分丰富。目前,SSR分子标记已经广泛应用到各种作物当中,也已成功地应用到亚麻亲本鉴定,本试验利用前人已开发的SSR分子标记,通过鉴定筛选出具有多态性的标记,验证杂交种的真实性。

收稿日期:2012-08-10

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-22);胡麻种间杂交种的鉴定(Y10-4)

作者简介:张丽丽(1983-),女,河北保定人,助理研究员,硕士研究生,主要从事胡麻育种与栽培技术研究。

1 材料和方法

1.1 材料

母本坝亚 7 号、父本多年生野生宿根型亚麻以及杂交种子一代,均由张家口农业科学院提供。分子标记试验于华中农业大学完成。

由于本试验中的双亲不属于同一种,我们必须根据前人对栽培种亚麻 SSR 引物筛选的结果^[4]进行进一步筛选。

1.2 DNA 的提取

在亚麻幼苗期,田间收集单株叶片于 1.5 mL 离心管中。参照 Sahai-Maroo^[5] 的 CTAB 方法提取 DNA 并稍加改动。

将所取叶片置于研钵中,加入 500 mL CTAB 溶液,研磨至匀浆。

65℃ 水浴 30 min,水浴期间要温和震荡 2~3 次,水浴后取出离心管放于室温自然冷却 5 min。

向离心管中加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1 V/V),轻轻摇动混匀,然后于高速离心机中以 12 000 g 的转速离心 10 min。

取上清液于 1.5 mL 离心管中,加入等体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA。

12 000 g 离心 10 min,去上清。加 75% 乙醇洗沉淀 30 min,去乙醇。重复 3 次,最后去 75% 乙醇,干燥 DNA。

待完全干燥后,加 200 μ L 的 ddH₂O 溶解 DNA,溶解后置于 -20℃ 条件下保存备用。

1.3 SSR 扩增

PCR 扩增反应体系见表 1。

表 1 PCR 扩增反应体系

Tab. 1 Reaction system of PCR

成分 Stock	原浓度 Original	一次反应用量/ μ L Amount of one reaction
Buffer	10 \times	2
DNA	10~20 ng	2
Mg ²⁺	2 mmol/L	1.5
Taq Enzyme	5 U/ μ L	0.2
dNTP	2.5 mmol/L	0.4
Primer F	5 μ mol/L	1
Primer R	5 μ mol/L	1
ddH ₂ O		11.9
Total		20

注:加入一滴矿物油覆盖反应物。

Note: Cover reactant by adding a drop of mineral oil.

PCR 反应程序如下:预变性 94℃ 5 min;变性 94℃ 40 s,退火 50~56℃ 45 s,延伸 72℃ 40 s,35

cycles;延伸 72℃ 5 min。

扩增产物与 8~10 μ L Loading Buffer 混匀,95℃ 变性 5~10 min,立即转至冰上冷却。检测方法:琼脂糖胶电泳、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色。

1.4 检测子一代与亲本之间亲子关系

用筛选出来的引物对子一代以及双亲进行标记,方法同 1.3。

2 结果与分析

2.1 引物验证

以父本、母本的 DNA 检测 14 对引物的多态性。由图 1 所示(2 个父本 2 个母本,每 4 孔为一对引物),筛选出来 7 对引物(表 2),双亲有明显的多态性,可以用于检测子一代与亲本的关系。

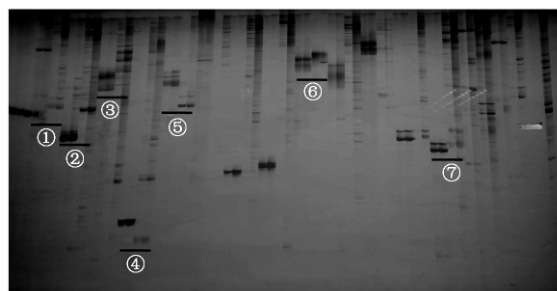


图 1 双亲引物筛选与多态性检测

Fig. 1 Screening and polymorphism of markers in parents

2.2 子一代与亲本之间的亲子关系

利用以上筛选出的引物,对亲本以及 20 份子一代亚麻材料进行 SSR 标记。7 对引物在不同亚麻材料间的多态性扩增情况表明,第 1 份亚麻种间杂交的子一代材料与父本、母本具有相同带型(图 2),说明了种间杂交的成功,由此验证了种间杂交的真实性。其余 19 份只具有与母本相同的带型。

3 讨论

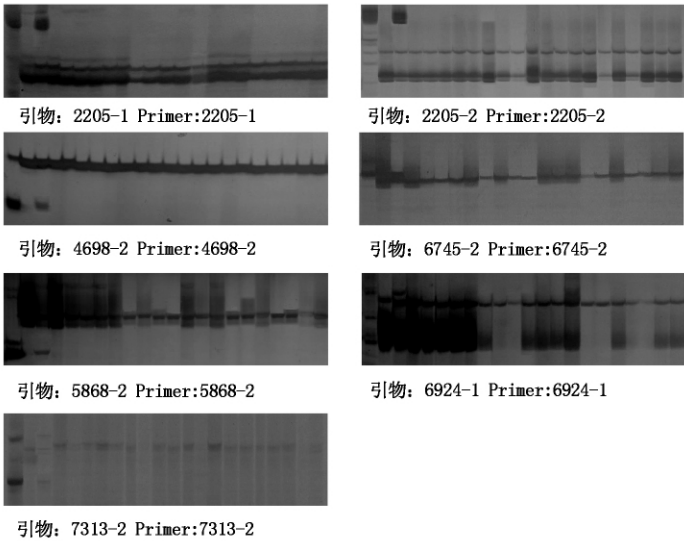
3.1 亚麻分子研究进展

我国亚麻生物技术研究发展迅速,花药的培养^[6]、转基因技术、基因克隆、分子标记^[7]等方面开展了深入研究并获得显著成果。高凤云等^[8]在 252 条随机引物中得到 2 条引物,分别有 1 个与显性核不育雄性基因有关的 RAPD 分子标记。王福亮、黄文功^[9-10]利用 3 个有代表性的亚麻品种从 70 条引物中筛选出 12 条多态性好、重复性高的引物,并对亚麻 RAPD 反应条件进行了优化。梁毅莉等^[11]用 600 个随机引物对白花和山西大同 2 个亚麻品种进行 RAPD 分析,筛选出 31 条两品种间具多态性的 RAPD 特异引物。王斌等^[12]建立了亚麻 SRAP-PCR

反应的优化体系。张建平^[4]、龙松华^[13]、王斌^[14]等对亚麻 SSR 进行了大量的试验,进行了引物筛选以及反应体系的建立。于文静等^[15]用 SSR 技术对 26 个亚麻品种(品系)间亲缘关系进行了分类。

表 2 亚麻 EST-SSR 引物序列
Tab. 2 The sequences of EST-SSR primers of flax

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ T _m	重复单元 SSR	扩增片段大小/bp Product size	扩增条带数 No. of amplification
4698-2	5'-TGGCGATTTCAGTCAAAGC-3'	54.50	AAC	115	4
	5'-GTGCTGGAAGGAGAACAAG-3'				
6745-2	5'-TCATAACTATCCAAGGCACT-3'	49.45	CAT	378	6
	5'-AGGCGAGGTAAATAATCC-3'				
5868-2	5'-CATCGTCGGTATGTTTGG-3'	51.85	CTAG	253	1
	5'-TGAATCTGAGCGTTGAGC-3'				
2205-2	5'-CCGCCACTTCTACTCACC-3'	53.25	TCT	342	6
	5'-CAAGGCTCGTCACTGTCC-3'				
6924-1	5'-CTACGCCCACTCCCTTGT-3'	55.50	TCC	367	1
	5'-CTGGCTGTCTCGGTTTC-3'				
7313-2	5'-ACTGCCATCGCCACTACCT-3'	57.55	GAA	476	1
	5'-ACCGCATCTTGTCCCTCC-3'				
2205-1	5'-CCGCCACTTCTACTCACC-3'	53.20	TCT	212	6
	5'-AAATGTCAATCGGCAACC-3'				



从左到右泳道 1 2. 父本和母本; 泳道 3 ~22. 20 份杂交种。
Line 1 and 2 from left to right. Father and mother; Line 3 ~22. 20 hybrid.

图 2 亲子关系鉴定

Fig. 2 Faternity determination

3.2 SSR 在亲子鉴定中的应用

沈童伟等^[16]以 16 个玉米杂交种及其双亲和 202 个骨干自交系利用 SSR 标记技术鉴定了玉米品种亲子关系。谢春梅等^[17]用 SSR 技术对马铃薯杂交实生种子进行了纯度鉴定。王一峰等^[18]建立了一套快速可靠的油菜杂交种纯度的 SSR 鉴定方法。

3.3 亚麻种间杂交种的真实性鉴定

亚麻种间杂交技术一直是个难题。栽培亚麻与野生亚麻种间杂交技术能有效克服种间不亲和性,并且结实率达 3.0% ~9.52%。米君等^[2-3]对亲本

及 F₁ 的花粉粒进行了观察鉴定, F₁ 花粉出现大小差异明显的花粉粒,其形状与父母本有明显的差别,趋于双亲类型。本试验通过分子标记技术,从分子遗传的角度进一步证明种间杂交技术的成功。由于种间杂交的结实率很低,本试验中只有 1 份杂交子一代材料检测到了双亲的多态性,其余 19 份杂交种均未检测出与父本相同的带型。造成这种结果的原因可能是在种间杂交试验环节有所疏漏,19 份杂交种其实为假杂交。笔者认为种间杂交技术成功率低,有待进一步提高并推广。

参考文献:

- [1] 李冬梅. 部分亚麻属植物遗传多样性及分子进化研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [2] 米 君, 李爱荣, 钱合顺, 等. 亚麻种间杂交技术研究初报[J]. 中国麻业科学, 2008, 30(3): 136-140.
- [3] 王 丽, 马晓娣, 米 君, 等. 栽培亚麻×野生亚麻种间杂交胚胎发育的研究[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(5): 19-22.
- [4] 张建平, 王 斌, 赵丽娟, 等. 亚麻 EST 序列中 SSR 标记的筛选[J]. 西北植物学报, 2009, 29(5): 0867-0873.
- [5] Sahai-Maroo M A, Biyashev R M, Yang G P. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal location and population dynamics [J]. PNAS(USA), 1994, 91: 5466-5470.
- [6] 张志扬, 陈信波. 亚麻生物技术研究进展[J]. 2006, 17(5): 834-836.
- [7] 何东锋, 陈信波, 高国赋, 等. 亚麻分子标记应用研究进展[J]. 湖南农业科学, 2009(5): 21-23.
- [8] 高凤云, 张 辉, 斯钦巴特尔. 亚麻显性雄性核不育基因的 RAPD 标记[J]. 华北农学报, 2007, 22(1): 129-131.
- [9] 王福亮, 黄文功. 亚麻 RAPD-PCR 体系的优化及引物的筛选[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 6911-6913.
- [10] 黄文功. 亚麻 RAPD 的反应体系优化及引物筛选[J]. 黑龙江农业科学, 2009(2): 4-6.
- [11] 梁毅莉, 陈信波, 陈婕妤. 亚麻 RAPD 反应体系的优化和品种间多态性标记的筛选[J]. 湖南农业科学, 2009(2): 7-10, 14.
- [12] 王 斌, 党占海, 张建平, 等. 亚麻 SRAP 反应体系的优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(4): 760-764.
- [13] 龙松华, 李 翔, 邓 欣, 等. 亚麻 EST-SSR 信息分析与标记开发[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(5): 634-638.
- [14] 王 斌, 张建平, 党占海, 等. 亚麻 SSR-PCR 优化体系的建立[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 4: 69-73.
- [15] 于文静, 陈信波, 邱财生, 等. 利用 SSR 标记分析亚麻栽培种的遗传多样性[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(11): 2632-2635.
- [16] 沈童伟, 陆徐中, 刘勋辉, 等. SSR 标记鉴定玉米品种真实性及纯度的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8904-8908, 8913.
- [17] 谢春梅, 林 蓉, 孙 雁, 等. 应用 SSR 标记技术鉴定马铃薯杂交实生种子的纯度[J]. 种子, 2008, 27(8): 7-9, 13.
- [18] 王一峰, 董军刚, 董振生, 等. 甘蓝型油菜秦优 10 号杂交种纯度鉴定的 SSR 引物筛选[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 72-77.