

与石刁柏性别基因 *M* 紧密连锁的 AFLP 新标记

韩莹琰^{1,2}, 杨 凯³, 范双喜^{1*}, 张振贤²

(¹北京农学院植物科学技术系, 北京 102206; ²中国农业大学农学与生物技术学院蔬菜系, 北京 100094; ³北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要: 运用 BSA 法构建石刁柏雌雄基因池, 用 64 种 AFLP 引物组合共检测到 4 个多态性位点, 单株验证结果表明, 引物组合 E-ACG/M-CTT 产生的多态性片段 (命名为 E-ACG/M-CTT-156) 与 *M* 基因连锁, 片段大小为 156 bp; 连锁遗传距离为 8.33 cM。

关键词: 石刁柏; 性别基因 *M*; AFLP 标记; BSA

中图分类号: S 644.6 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 03-0779-04

AFLP Markers Linked with *M* Gene in *Asparagus officinalis* L.

HAN Ying-yan^{1,2}, YANG Kai³, FAN Shuang-xi^{1*}, and ZHANG Zhen-xian²

(¹Department of Plant Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China; ²Department of Vegetable, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ³Key Laboratory of Agricultural New Technology and Application in Beijing, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstract: In present study, the male and female bulk were set up by means of BSA, and AFLP was used to study the sex difference on *Asparagus officinalis* L., 4 polymorphic segments were detected with 64 AFLP selective primer pairs. The result of individual amplification showed that the specific 156 bp fragment from primer combination (E-ACG, M-CTT), named E-ACG/M-CTT-156, was linked with *M* gene at a linkage genetic distance of 8.33 cM.

Key words: *Asparagus officinalis* L.; *M* gene; AFLP marker; BSA

石刁柏 (*Asparagus officinalis* L.) 系雌雄异株植物, 雄株产量比雌株高出约 20% ~ 30%, 而且雄株生长旺盛, 品质好, 产量高, 寿命长, 抗病性强。但石刁柏雌雄株在营养生长期形态特征极其相似, 早期无法辨别。因此, 石刁柏雌雄株性别的早期鉴别在生产实践中有着重要的应用价值。

石刁柏的性别控制属于单基因决定型, 其雄性基因型为 *M* -, 雌性基因型为 *mm*, *M* 对 *m* 显性 (任吉军 等, 1993)。

一般认为性别决定基因调节雄性或雌性分化途径的相对活性, 在性别分化程序表达中发挥决定性作用。性别决定基因的研究是性别分化中最高水平的研究, 也是彻底解决性别表达机理的关键所在 (汪俏梅 等, 2002)。

国外学者运用分子生物学手段在石刁柏性别鉴定方面做了大量工作 (Jiang et al, 1997; Jiang & Sink, 1997; Stalla et al, 1998)。Jiang 和 Sink (1997) 用 760 个 RAPD 随机引物进行筛选和研究, 得到了 2 个与 *M* 基因连锁的分子标记, 对其中 1 个标记进行克隆测序, 转化为 SCAR 标记。其研究小组 (Jiang et al, 1997) 还将所用材料母本植株的 163 个标记定位于 13 个连锁群上, 覆盖总基因长度为 1 281 cM, 标记平均间距为 7.9 cM, 父本的 183 个标记定位于 9 个连锁群上, 覆盖总基因长度为

收稿日期: 2007 - 01 - 04; 修回日期: 2007 - 04 - 18

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: fsx20@163.com)

1 324 cM, 标记平均间距 7.7 cM, 其中母本的 9 个连锁群与父本的 6 个是部分同源的。4 个 AFLP 标记和 14 个 RAPD 标记被定位在 *M* 基因所在的 L5 染色体上。Stella 等 (1998) 运用 BSA 和 AFLP 法找到了 9 个与石刁柏 *M* 基因连锁的 AFLP 标记, 但还未见这 9 个 AFLP 标记的序列分析的报道。

作者利用 AFLP 技术对与 *M* 基因连锁的基因组区域进行分析, 找出与 *M* 基因连锁的 AFLP 分子标记, 确认其在染色体上的位置, 同时对所获标记进行克隆测序, 为选择和分离 *M* 基因打下基础。

1 材料与方法

供试石刁柏来自北京农学院蔬菜实验站石刁柏资源圃, 选用 A₁₀ 品系, 根据田间性别鉴定结果, 分别取雌株、雄株各 30 份, 拟叶 DNA 等量混合成雌株、雄株集群基因池。

对雌株 DNA 池、雄株 DNA 池进行 AFLP 扩增, 在两池间产生多态性的引物组合即初步认为与石刁柏性别基因 *M* 连锁, 然后利用该引物组合对建池单株进行扩增, 进一步确定所筛选到的标记与目标性别基因的连锁关系, 并推算遗传距离 (Winter et al., 1998)。

DNA 的提取采用改良 CTAB 法 (Murray & Thompson, 1999); 采用本课题组建立优化的石刁柏 AFLP 反应体系 (王秀峰和李宪利, 2006)。AFLP 银染所需试剂购自北京华瑞新成科技有限公司, DNA 提取试剂、尿素、*Taq* DNA 聚合酶、AFLP 选择性扩增引物等为上海生工生物工程公司产品。*T₄* DNA Ligase 为 Promega 公司产品。

将银染 AFLP 凝胶特异带的区域用 70% 酒精灭菌, 用手术刀将特异条带从玻璃板上剥离, 放入离心管中, 加入 25 μ L 1 \times TE 缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 3 min, 1 000 r/min 离心, 取上清液 5 μ L 为模板, 利用相同 AFLP 特异引物选择扩增, 产物用聚丙烯酰胺变性凝胶电泳检测, DNA 片段长度正确。

PCR 产物用北京天为时代科技有限公司 DNA 产物纯化试剂盒纯化。PCR 产物回收纯化以后, 使用 pGEM-T Vector System I 或者 pGEM-T Easy Vector System I 进行连接反应 (Promega, USA)。使用“质粒小提试剂盒” (天根生化科技 (北京) 有限公司) 提取质粒 DNA 并纯化。由上海生工生物工程公司进行克隆片段的测序。

2 结果与分析

2.1 AFLP 引物的筛选

以 8 种 E 端引物和 8 种 M 端引物, 共 64 种引物组合对雌株 DNA 池和雄株 DNA 池进行 AFLP 分析, 全部电泳图谱共出现 6 798 条清晰可辨的 AFLP 带, 其中有 4 种引物组合产生差异片段 4 条 (表 1), 差异片段百分率仅为 0.06%, 遗传相似系数为 99.94%, 说明石刁柏雌雄群体的遗传背景具有高度的相似性。

表 1 各引物组合出现的 AFLP 带数及其多态性

Table 1 AFLP polymorphic fragment number in different primer combinations

引物 Primer	M-CTT	M-CAT	M-CAA	M-CTA	M-CAG	M-CTG	M-CAC	M-CTC
E-AGG	98	101	114	52	116	82	138	86
E-AGT	98	88	126	112	134	104	114	120
E-ACA	118	144	125 (1)	90	90	122	128	142
E-ACC	124	76	104	111 (1)	123	106	82	83 (1)
E-ACG	121 (1)	152	123	114	122	144	90	98
E-ACT	130	132	74	120	88	122	106	58
E-AGC	116	66	100	112	88	84	48	92
E-AAG	120	96	90	98	110	158	96	90

注: 括号内是初步观测发现的差异带数。

Note: Specific segments number by elementary observation in bracket

差异片段的最小分子量是 156 bp, 最大分子量是 300 bp, 这与 Stella 等 (1998) 的试验结果一致。但还未见 Stella 研究小组找到的与石刁柏性别基因 *M* 连锁的 AFLP 标记的序列分析的报道, 因此本工作须从建池开始。

引物组合 E-ACG/M-CTT 在雄株集群基因池中扩增出了一条长约为 156 bp 的多态性谱带, 命名为 E-ACG/M-CTT-156 (图 1)。

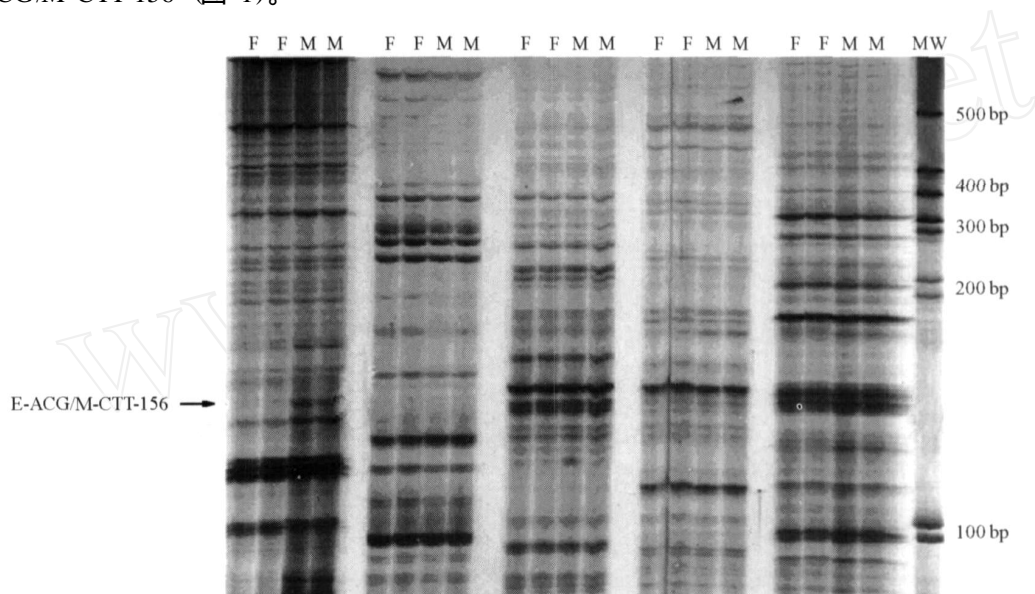


图 1 雌雄集群基因池 AFLP 扩增结果

MW: Ladder DNA; F: 雌集群; M: 雄集群。

Fig. 1 AFLP banding patterns from bulk DNA

MW: Ladder DNA; F: Female bulk; M: Male bulk

2.2 与 *M* 基因连锁片段的单株验证

将标记 E-ACG/M-CTT-156 在 60 株建池单株中进行验证 (图 2 和图 3)。

对 A_{10} 品系单株 (30 株雄株, 30 株雌株) 进行 AFLP 分析发现, 60 株中共有 5 株发生交换, 重组率为 8.33%, 遗传距离为 8.33 cM, 单株检出率为 91.67%。

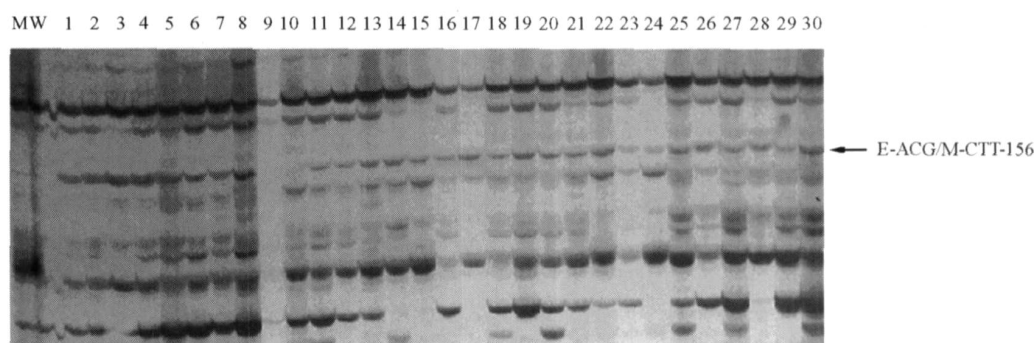


图 2 标记 E-ACG/M-CTT-156 对雄池单株的 AFLP 扩增结果

MW: Ladder DNA; 其余部分: 雄池单株。

Fig. 2 AFLP amplification with marker E-ACG/M-CTT-156 in male gene bulk individuals

MW: Ladder DNA; Other lanes: Male gene bulk individuals

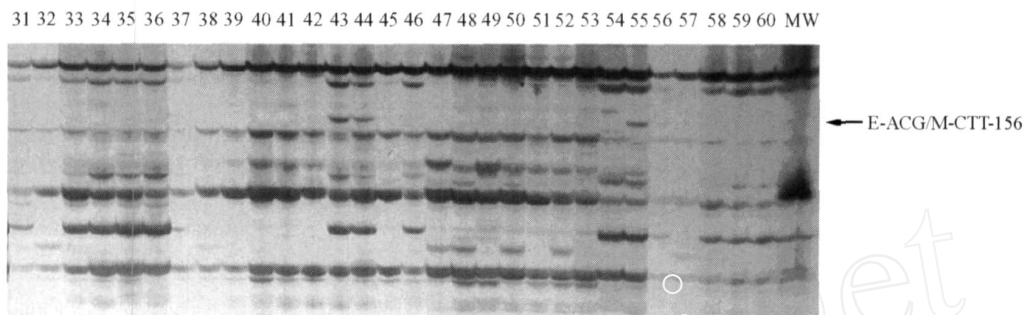


图 3 标记 E-ACG/M-CTT-156 对雌池单株的 AFLP 扩增结果

MW: Ladder DNA; 其余部分: 雌池单株。

Fig. 3 AFLP amplification with marker E-ACG/M-CTT-156 in female gene bulk individuals

MW: Ladder DNA; Other lanes: Female gene bulk individuals

2.3 E-ACG/M-CTT-156 标记的测序

对标记 E-ACG/M-CTT-156 进行克隆测序 (图 4), 经 NCBI 数据库查寻, 发现标记序列与 NCBI 公布的石刁柏 hypothetical protein ABD63124.1 克隆有 74.3% 的氨基酸同源性, 说明标记 E-ACG/M-CTT-156 在 NCBI 公布的石刁柏 locus_tag = 18. t00020 座位上。

```
GATGAGTCCTGAGTAACTTCACGCCGTTCAACGGGAAGGGTTCGCCCACTC
AGCATTGTGATCTACTTCAAATCCTACTTGGGTATGATCTCCGGTAATAAAGC
CTTGATGGTTCGGTCATTTCGTTACACGTTACGTTGAATTGGTACGCAGTC
```

图 4 标记 E-ACG/M-CTT-156 序列

Fig. 4 The sequence of the marker E-ACG/M-CTT-156

本研究找到了一个与 *M* 基因连锁的 AFLP 标记, 可用于石刁柏早期性别选择, 同时为利用已经公布的信息, 采用 STS 进一步逼近性别决定基因 *M*, 提供了可行性和信息。其他 3 个标记有待进一步验证。

References

- Jiang Chun-xiao, Sink K C. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in asparagus *Euphytica*, 94 (3): 329 - 333.
- Jiang Chun-xiao, Lewis M E, Sink K C. 1997. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus *Genome*, 40 (1): 69 - 76.
- Murray M G, Thompson W F. 1999. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 7 (2): 117 - 122.
- Ren Ji-jun, Wang Yan, Liu Hong-jia. 1993. Study of sex differentiation in higher plant. *Journal of Biology*, 53 (3): 4 - 7. (in Chinese)
- 任吉军, 王 艳, 刘洪家. 1993. 高等植物性别分化的研究概况. *生物学杂志*, 53 (3): 4 - 7.
- Stella M R, Jorg S, Christian J. 1998. AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. *Molecular Breeding*, 4: 91 - 98.
- Wang Qiao-mei, Sun Yun-zi, Yu Feng-chi. 2002. Progress of the plant sex determination genes research. *Chinese Journal of Cell Biology*, 24 (1): 30 - 34. (in Chinese)
- 汪俏梅, 孙耘子, 于凤池. 2002. 植物性别决定基因研究进展. *细胞生物学杂志*, 24 (1): 30 - 34.
- Wang Xiu-feng, Li Xian-li. 2006. Advances in Horticulture (). Beijing: China Agricultural Press: 292 - 295. (in Chinese)
- 王秀峰, 李宪利. 2006. 园艺学进展 (). 北京: 中国农业出版社: 292 - 295.
- Winter P C, Hickey G I, Fletcher H L. 1998. Instant notes in genetics. UK: B D S Scientific Publishers Limited: 141 - 147.