

一个与甘蓝显性雄性不育基因连锁的 RFLP 标记

刘玉梅¹ 方智远¹ Michael D. McMullen² 庄 木¹ 杨丽梅¹ 王晓武¹
张扬勇¹ 孙培田¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² Plant Science Unit University of Missouri, USA)

摘 要: 运用 RFLP 技术, 采用集群分析 (BSA) 法进行了甘蓝显性雄性不育基因连锁的分子标记研究, 结果表明, 该显性不育基因与 RFLP 标记 pBN11 连锁, 经两个回交群体检测, 其遗传距离分别为 5.189 和 1.787 cM, 首次将该不育基因被定位于第 1 和第 8 条染色体上。

关键词: 甘蓝; 显性雄性不育; 基因; RFLP 标记; 基因定位

中图分类号: S 635 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0549-05

选育优良的雄性不育系并应用于甘蓝育种实践一直是国内外有关学者研究的热点。本课题组在国内外首次发现的甘蓝显性不育材料与甘蓝类其它雄性不育类型相比, 在蜜腺大小、开花结实等方面有明显的优势, 具有重要的应用价值^[1,2]。为了加速其转育和利用, 王晓武等筛选获得了与该不育基因连锁的 RAPD 标记^[3], 其连锁距离为 7.48 cM, 并将该标记转换成 ERPAD (Extended Random Primer Amplified DNA, 延长随机引物扩增 DNA)^[4]和 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region, 特异序列扩增) 标记^[5]。由于该标记为显性标记, 不能区分纯合基因型和杂合基因型, 因而不能用于显性纯合不育基因型的鉴定和辅助转育。而在育种实践中筛选显性纯合雄性不育株是甘蓝显性不育利用的关键, 目前仍然是用测交的方法, 于开花期观察育性表现而进行纯合不育株的筛选, 需花大量的人力和物力。RFLP 标记直接检测染色体 DNA 水平上的 RFLP 变异, 通常呈共显性, 能确定任何杂交组合植株某一位点的基因型。该标记不受环境的影响, 任何生育期都能检测到。由于 RFLP 标记直接反映了植物的基因型, 所以它们互相是独立的, 在任何遗传背景下都一样。该标记已在作物基因定位、与主基因的连锁分析及连锁图谱的建立等方面得到了广泛应用^[6]。

作者利用 RFLP 技术, 采用集群分析 (Bulked Segregant Analysis, BSA) 方法^[7], 筛选与甘蓝显性雄性不育基因连锁的分子标记, 以期为该基因的回交转育及显性纯合不育株的早期选择提供快速、可靠的辅助手段, 为该基因定位、克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以甘蓝显性不育材料中的不育株 301 Y₁-L₁₃ 为母本, 甘蓝自交不亲和系 8020 和 21-3 为父本, 分别配制出两个 F₁ 代 301 Y₁-L₁₃ × 8020 和 301 Y₁-L₁₃ × 21-3 及两个回交一代分离群体 (301 Y₁-L₁₃ × 8020) × 8020 和 (301 Y₁-L₁₃ × 21-3) × 21-3。

1.2 探针

选用分布甘蓝图谱的 50 个 pBN 系列的 cDNA 克隆为探针, 这些探针来自于甘蓝型油菜的 cDNA 克隆, 载体为 pBR322, 酶切位点为 Pst。所用探针均为美国加利福尼亚州立大学 Davis 分校 Carlos F. Quiros 教授赠送。

收稿日期: 2003 - 05 - 27; 修回日期: 2003 - 07 - 08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170642); 国家“863”计划项目; 人事部留学回国人员资助项目

1.3 分离群体育性调查和集团 (bulks) 组建

供试材料种植于中国农业科学院蔬菜花卉研究所实验农场, 分别于开花初期、盛期、末期逐株调查育性表现。根据育性分离进行遗传分析, 同时从回交分离群体中随机挑选不育株和可育株各 20 株, 单株提取 DNA 并等量混合, 组成不育和可育 DNA 池。

1.4 DNA 的提取

于植株抽薹期逐株取花茎上的鲜嫩叶片置于冰上, 然后迅速放在 -80℃ 冰柜中保存。取部分叶片加液氮研磨, 提取 DNA^[8]。鲜样 5~6 g, 加 20 mL 65℃ 预热的 CTAB 提取液 [100 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 0.7 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 1% β-ME (β-mercaptoethanol), 2% CTAB], 65℃ 水浴 45 min, 加等体积的氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提两次。上清液用 0.6 倍异丙醇沉淀 DNA。对酚和氯仿/异戊醇纯化后的 DNA 用洗液 (76% 乙醇, 0.2 mol/L NaOAc) 洗 20 min, 再用洗液 (76% 的乙醇, 10 mmol/L NaOAc) 洗 2 min, 用干净吸水纸吸干 DNA, 然后溶于适量 1 倍的 TE 溶液中, 置于 4℃ 溶解, 待 DNA 完全溶解后在 Beckman Du-65 紫外分光光度计下检测 DNA 质量和浓度。

1.5 RFLP 分析

1.5.1 探针制备 用作探针的质粒 DNA 用 Promega 公司的 Wizard DNA 试剂盒提取, 纯化后的 DNA 经 Pst I 酶切后, 用 0.7% 的低熔点胶进行电泳, 根据探针的分子量大小, 将其片断从凝胶中回收备用。

1.5.2 酶切、Southern 印迹、分子杂交 先用 50 个 RFLP 探针对双亲、F₁ 的 DNA 进行杂交, 筛选有多态性的探针、酶组合, 然后用双亲间有差异的探针, 在不育池和可育池间进行多态性检测, 再用两池间有多态性的探针对回交群体进行检测。酶切、Southern 印迹、分子杂交和放射自显影主要参照 Helentjaris 等^[9]的方法略加改进。30 μg 甘蓝基因组 DNA 用 5 种限制性内切酶 (GIBCO) EcoR、EcoR、Bgl II、Hind III 和 Xba I 进行酶切, 在 0.7% 的琼脂糖双层胶及 1×TAE 缓冲液中, 26 V 电泳过夜。电泳完后用细玻璃棒小心将双层胶分开。

凝胶依次进行变性、中和, DNA 经 Southern 转移到 MSI (Amersham) 尼龙膜上, 经紫外交链仪照射片刻, 80℃ 烘膜 1 h, 使 DNA 牢固结合在膜上。探针用 ³²P-dCTP 标记, 经分子杂交, 放射自显影, 在 X-光片上观察结果。

1.5.3 数据分析 根据回交群体基因型 RFLP 标记检测结果, 计算重组值。基因间的遗传距离根据 Kosambi 函数将重组值转换成遗传图距 (Centimorgan, cM)^[10], 确定其连锁程度。

2 结果与分析

2.1 雄性不育基因的遗传分析

经田间观察, 在 (301 Y₁-L₁₃ × 21-3) × 21-3 回交群体的 167 株中, 不育株为 91 株, 可育株为 76 株; 在 (301 Y₁-L₁₃ × 8020) × 8020 回交群体的 125 株中, 不育株为 64 株, 可育株为 61 株, 经卡平方测验, 均符合 1:1 的理论比值。表明该雄性不育主要为一对显性核基因控制, 进一步证实了方智远等人的研究结果^[11]。

2.2 甘蓝显性不育基因与 RFLP 标记的连锁分析及基因定位

2.2.1 亲本多态性检测和显性不育基因连锁分子标记的筛选 用 50 个 RFLP 探针 5 种酶切组合检测亲本, 显示亲本间多态性的探针有 35 个, 多态性表现频率为 70%。用上述 35 个探针检测回交群体中的一对不育和可育近等基因池, 结果探针 pBN11 与 Bgl II 酶切的组合, 在不育池和可育池中表现多态性 (图 1), 显示甘蓝显性不育基因与 pBN11 连锁。

2.2.2 RFLP 标记与甘蓝显性雄性不育基因间的连锁分析及基因定位 探针 pBN11 与 (301 Y₁-L₁₃ × 21-3) × 21-3 回交一代分离群体的 118 个单株的 Bgl II 酶切片断的 DNA 进行杂交, 结果显示, 在 58 个可育株中, 4 株为重组株, 2 株因 DNA 量少没能杂交, 其余 52 株均出现与可育池和可育亲本相同的一条带, 其片断大小约 0.8 kb。在 60 个不育单株中, 2 株为重组株, 其余 58 株除具有一条与可育株

和可育池相同的带外，另外还出现一条可育株没有的特异带，其片断大小约 1.0 kb。该特异带与不育亲本带型相同（图 2）。表明探针 pBN11 与甘蓝显性不育基因共分离，其回交群体不育/可育标记符合 1:1 的分离比 ($\chi^2 = 0.0088 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$)。该结果从分子水平上进一步验证了根据表型进行遗传分析结果的可靠性。根据 RFLP 标记对回交群体检测的结果，甘蓝显性不育基因与标记 pBN11 间的重组率为 5.172%，pBN11 标记与显性不育基因之间的连锁距离为 5.189 cM，表明 RFLP 标记 pBN11 与甘蓝显性雄性不育基因连锁。

为了进一步验证已获得的 RFLP 标记的可靠性和实用性，用探针 pBN11 与回交群体 (301 Y₁-L₁₃ × 8 020) × 8 020 的 114 个单株的 DNA Bgl 酶切片断进行分子杂交，结果显示，在 58 株可育株中（除 2 株因 DNA 量少未杂交上之外）

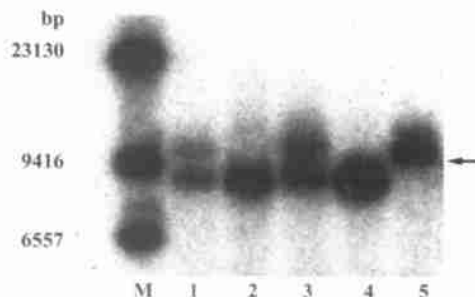


图 1 探针 pBN11 与 (301Y₁-L₁₃ × 21-3) × 21-3 BC₁ 群体不育池、可育池 DNA (经 Bgl 酶切) 片断产生的多态性 (箭头所示)

M: 分子量标记 (DNA/Hind + X 174 RF DNA/Hae);
1: 不育池; 2: 可育池; 3: F₁; 4: 21-3; 5: 301 Y₁-L₁₃。

Fig. 1 Hybridization patterns of pBN11 with DNA digested by Bgl in the F₁, male sterile DNA bulk, male fertile DNA bulk and their parents (The polymorphism is indicated by the arrow)

M: Mark (DNA/Hind + X174 RF DNA/Hae);

1. Male sterile DNA bulk; 2. Male fertile DNA bulk of; 3. F₁;
4. 21-3; 5. 301 Y₁-L₁₃.

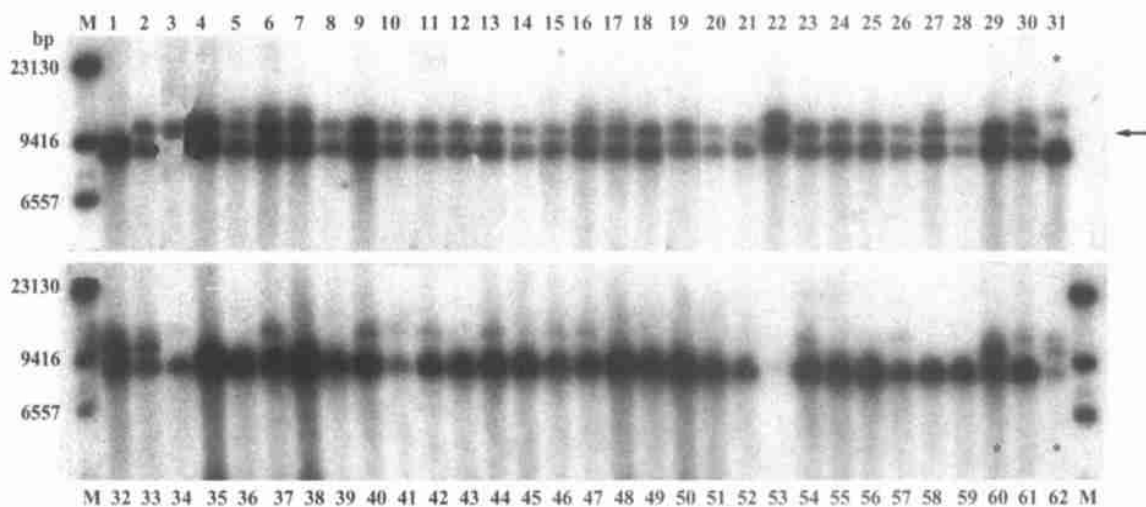


图 2 探针/酶组合 pBN11/Bgl 在亲本和回交一代群体 (301 Y₁-L₁₃ × 21-3) × 21-3 各单株间的杂交结果

M. 分子量标记 (DNA/Hind + X 174 RF DNA/Hae); 1. 21-3; 2. F₁; 3. 301 Y₁-L₁₃; 4~33. 不育单株; 34~62. 可育单株;
*发生交换的单株; 箭头所示为差异性片断。

Fig. 2 Hybridization patterns of pBN11/Bgl among parents and individuals from BC₁ of (301 Y₁-L₁₃ × 21-3) × 21-3

M: Mark (DNA/Hind + X174 RF DNA/Hae); 1. 21-3; 2. F₁; 3. 301 Y₁-L₁₃; 4~33. Male sterile individuals;
34~62. Male fertile individuals; *Interchanged plants; the polymorphism is indicated by the arrow.

有 54 株具有与可育亲本、可育池相同的一条带，其分子量约为 0.8 kb，另有 2 株发生交换。在 56 株不育株中除有一条与可育株相同的带外，还均有一条可育株没有的特异带，其分子量约为 1.0 kb。该带型与不育亲本和不育池相同（图 3）。回交群体的不育株/可育株的标记符合 1:1 的分离比 ($\chi^2 = 0.0089 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$)，甘蓝显性不育基因与标记 pBN11 之间的重组率为 1.786%，pBN11 标记与显性不育基因之间的连锁距离为 1.787 cM。进一步验证 RFLP 标记 pBN11 与甘蓝显性不育基因连锁，同时表明该标记可用于甘蓝显性雄性不育回交转育中不同基因型的筛选和鉴定。Kianian 等^[12]的研究表

明探针 pBN11 位于甘蓝第 1 和第 8 条染色体上, 而本研究显示甘蓝显性不育基因与 pBN11 标记连锁, 因此, 甘蓝显性雄性不育基因位于第 1 和第 8 条染色体上。

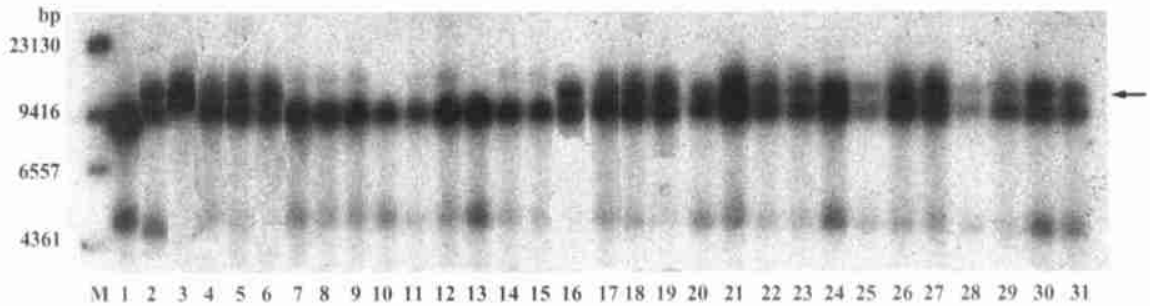


图 3 探针/酶组合 pBN11/ Bgl 在亲本和回交一代群体 (301 Y₁-L₁₃ ×8020) ×8020 各单株之间的杂交结果

M. 分子量标记 (DNA/ Hind + X174 RF DNA/ Hae); 1. 8020; 2. F₁; 3. 301 Y₁-L₁₃; 4~6 和 16~31. 不育单株;
7~15. 可育单株。箭头所示为差异性片断。

Fig. 3 Hybridization patterns of pBN11/ Bgl among parents and individuals from BC₁ of (301 Y₁-L₁₃ ×8020) ×8020

M: Mark (DNA/ Hind + X174 RF DNA/ Hae); 1. 8020; 2. F₁; 3. 301 Y₁-L₁₃; 4-6 and 16-31. Male sterile individuals;
7-15. Male fertile individuals. The polymorphism is indicated by the arrow.

3 讨论

本研究首次获得了一个与甘蓝显性雄性不育基因连锁的 RFLP 标记 pBN11。该标记与显性不育基因之间的遗传距离在两个分离群体中有所差异, 可能与所用回交父本的遗传背景不同有关。该标记呈共显性, 可将分离后代的不同基因型 (纯合及杂合) 在 DNA 水平上区分开, 可用于鉴定、筛选甘蓝显性纯合不育株及回交转育的辅助选择, 对加快该不育基因在甘蓝育种中的应用将发挥较大的作用。

RFLP 标记是基因组研究中使用最普遍的分子标记之一, 重复性好, 可信度高。但 RFLP 分析耗时长, 需放射同位素检测, 费用较高, 因而在一定程度上限制了 RFLP 标记在育种上的广泛应用, 因此有待进一步将 RFLP 标记转换为检测快速、费用较低的标记, 如 STS (Sequence tagged site) 标记; 还有待筛选其它检测快速、费用较低的共显性标记, 如 SSR 标记。

根据 Kianian^[12]的遗传图谱, 甘蓝显性不育基因虽然被定位在第 1 和第 8 条染色体上, 但由于只获得一个 RFLP 标记, 因而还不能将该基因定位于其染色体的准确位置上, 因此需要进一步筛选更多的分子标记, 以使该基因准确定位。

参考文献:

- 1 方智远, 孙培田, 刘玉梅, 等. 甘蓝显性雄性不育系的选育及其利用. 园艺学报, 1997, 24 (3): 249~254
- 2 方智远, 孙培田, 刘玉梅, 等. 几种类型甘蓝雄性不育的研究与显性不育系的利用. 中国蔬菜, 2001, (1): 6~10
- 3 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 一个与甘蓝显性雄性不育基因连锁的 RAPD 标记. 园艺学报, 1998, 25 (2): 197~198
- 4 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 甘蓝显性雄性不育基因的延长随机引物扩增 DNA (ERPAD) 标记. 园艺学报, 1999, 26 (1): 23~27
- 5 王晓武, 方智远, 刘玉梅, 等. 一个用于甘蓝显性雄性不育基因转育辅助选择的 SCAR 标记. 园艺学报, 2000, 27 (2): 143~144
- 6 Zhang G, Bharaj T S, Lu Y, et al. Mapping of the Rf-3 nuclear fertility-restoring gene for WA Cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. Theor. Appl. Genet., 1997, 94: 27~33
- 7 Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 9829~9832
- 8 Saghai Marof M A, Soliman K, Jorgensen R A, et al. DNA spacerlength polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: 8104~8108
- 9 Helentjaris T, King G, Slocum M, et al. Restricting fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Mol. Biol., 1985, 5: 109~118
- 10 Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Engen., 1944, 12: 172~175

- 11 Fang Z Y, Sun P T, Liu Y M, et al. A male sterile line with dominant gene (*Ms*) in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and its utilization for hybrid seed production. *Euphytica*, 1997, 97: 265 ~ 268
- 12 Kianian S F, Quiros C E. Generation of a *Brassica oleracea* composite RFLP map: linkage arrangements among various population and evolutionary implications. *Theor. Appl. Genet.*, 1992, 84: 544 ~ 554

Identification of a RFLP Marker Linked to a Dominant Male Sterile Gene in Cabbage

Liu Yumei¹, Fang Zhiyuan¹, Michael D. McMullen², Zhuang Mu¹, Yang Limei¹, Wang Xiaowu¹, Zhang Yangyong¹, and Sun Peitian¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Plant Science Unit University of Missouri, USA)

Abstract: Bulk segregant analysis was used to identify RFLP marker linked to a dominant male sterile gene in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). The dominant male sterile gene was found to be linked to RFLP marker pBN11. The genetic distance between the marker and the dominant male sterile gene is 5.189 cM and 1.787 cM in two backcross populations, respectively. The gene was located on chromosome 1 and 8.

Key words: Cabbage; Dominant male sterile gene; RFLP; Gene mapping

一种简易快速提取洋葱线粒体 DNA 的方法

刘 杰¹ 崔成日² 李景鹏^{1,*}

(¹ 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; ² 哈尔滨长日圆葱研究所, 哈尔滨 150020)

A Simple and Rapid Method for the Isolation of Mitochondrial DNA from Onion

Liu Jie¹, Cui Chengri², and Li Jingpeng^{1,*}

(¹ Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; ² Harbin Institute of Onion, Harbin 150020, China)

关键词: 洋葱; 线粒体 DNA; 细胞质雄性不育

中图分类号: S 633.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0553

以哈尔滨长日圆葱研究所提供的洋葱细胞质雄性不育系 A 为试材, 取其块茎 50 g 剪碎, 加入 100 mL 预冷的缓冲液 A [30 mmol/L 甘露醇, 50 mmol/L Tris-HCl, 3 mmol/L EDTA, 0.1% BSA, 10 mmol/L β-巯基乙醇 (pH 8.0)] (按 1:2 比例), 捣碎后, 4 层无菌纱布过滤, 滤液 1 500 g 离心 10 min, 弃沉淀, 上清液 12 000 g 离心 15 min, 弃上清, 加入 10 mL 缓冲液 A 悬浮沉淀, 1 500 g 离心 10 min, 弃沉淀。上清液加入 1 mol/L MgCl₂ 终浓度 10 mmol/L, DNase 至 100 μg/mL, 冰上放置 1 h, 然后加入 3 倍体积的缓冲液 B [1.25 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0)], 轻轻混匀, 12 000 g 离心 15 min, 弃上清。沉淀悬浮于 50 mL 缓冲液 C [50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0)] 中, 12 000 g 离心 15 min, 弃上清, 重复此步骤 3 次, 沉淀用 600 μL 缓冲液 D [100 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, 100 mmol/L β-巯基乙醇 (pH 8.0)], 苯酚/苯酚/氯仿各抽提 1 次, 12 000 g 离心 15 min, 取上清, 然后加入 2/3 体积异丙醇, 于 -20℃ 放置大约 20 min 沉淀 DNA, 12 000 g 离心 15 min, 收集沉淀, 70% 乙醇洗涤沉淀, 干燥, TE 溶解。

传统的方法利用梯度离心提取 mtDNA, 其成本高, 耗时长, 产率低, 不宜广泛应用。本方法用差速离心去除组织碎片, 高盐环境下反复洗涤与 DNase 结合除尽在线粒体膜上吸附的核 DNA, 保证线粒体 DNA 的高纯度, 省去了蛋白酶 K 及梯度离心的蔗糖, 降低了提取成本, 对离心机等其它仪器的要求也很低。通过此方法提取的 mtDNA 由紫外分光光度计测得浓度可知, 一般可以达到 0.5 ~ 1.5 μg/g, 和同类其它方法相比, DNA 的产率是相当可观的, 完全可以达到限制性内切酶及 RAPD 的分析要求。

收稿日期: 2003-05-21; 修回日期: 2003-08-11

基金项目: 黑龙江省科技厅国际合作项目 * 通讯作者 Author for correspondence