

芦笋超雄株的 DNA 分子标记辅助筛选

周劲松, 汤泳萍, 罗绍春, 谢启鑫, 张岳平, 陈光宇*

(江西省农业科学院蔬菜花卉研究所, 江西省农业科学院生物工程中心, 南昌 330200)

摘 要: 以芦笋两性株自交 S_1 代雄株为试验材料, 首先与优良雌株进行测交, 然后利用与芦笋性别决定基因紧密连锁的显性 DNA 分子标记对苗期各单株进行性别鉴定, 推断出超雄株, 为芦笋全雄育种提供亲本材料。研究表明: 显性标记 Asp1-T7 和 Asp1-T7sp 特异性好, 扩增效果稳定, 均能够鉴别芦笋雌、雄性别; 一共测验了 14 株芦笋两性株自交 S_1 代的雄株, 从中筛选出 2 株超雄株; 对田间测交组合单株显花后性别表型调查的结果表明, DNA 分子标记检测结果与田间实际相符, 2 株超雄株所对应的组合被确证为全雄组合。

关键词: 芦笋; 超雄株; DNA 分子标记辅助选择; 测交

中图分类号: S 644.6

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 11-2182-07

Selection of Super-male Plants in Asparagus with DNA Molecular Marker

ZHOU Jin-song, TANG Yong-ping, LUO Shao-chun, XIE Qi-xin, ZHANG Yue-ping, and CHEN Guang-yu*

(Institute of Vegetables and Flowers/Biotechnology Center, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract: DNA molecular marker assisted selection of super-male plants was conducted for all-male breeding of asparagus. Males in S_1 population of andromonoecious plants were test-crossed with elite females. Two DNA molecular markers tightly linked to sex determining gene *M*, Asp1-T7 and Asp1-T7sp, which showed stable and specific amplification, were used for sex identification of individuals in the progeny at seedling stage. Putative ‘supermales’ (*MM*) were differentiated from the normal males (*Mm*) by the presence or absence of ‘all-male’ population in the progeny. Two out of 14 male plants test crossed were distinguished as putative ‘supermales’. The test result of DNA molecular marker-assisted selection was highly consistent with that of the sexual phenotype in field survey. The corresponding combinations originated from the two super-male plants were also identified as all-male combinations.

Key words: *Asparagus officinalis*; super-male plant; DNA molecular Marker-Assisted Selection; testcross

芦笋 (*Asparagus officinalis* L.) 雌、雄异株, 雄株因不结种子而消耗养分少, 产量比同期生长条件相同的雌株高出 25% 以上, 且寿命长, 抗性强, 为此全球正在大力开展芦笋全雄育种 (陈光宇, 2005; Riccardi et al., 2011)。

收稿日期: 2012-05-15; **修回日期:** 2012-10-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771376); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003074)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: genebksh@hotmail.com)

芦笋性别是由性染色体上的一对等位基因控制, 决定雄性的基因相对于决定雌性的基因为显性, 雄性为 Mm , 雌性为 mm (Bracle et al., 1991)。但是自然群体中偶尔发现极少数雄性株 (Mm) 会产生两性花, 引起自花或异花授粉, 产生雄、雌比例 3:1 的后代 ($Mm \times Mm \rightarrow 1MM + 2Mm + 1mm$ 即 3♂ + 1♀), 其中 MM 是具有活力的, 也表现为雄性, 称之为超雄株, 以它作为杂交父本进行芦笋全雄育种 ($mm \times MM \rightarrow Mm$), 后代全部为雄株。因此, 超雄株的筛选是芦笋全雄育种的关键。然而, 超雄株与普通雄株即使在开花期表型上也没有任何差异, 且芦笋从播种到开花大约需要 2 年时间, 故难以直接将它们区分开来。DNA 分子标记辅助选择, 不受外界环境影响, 可以在苗期快速准确高效鉴定各种性别基因型, 筛选出超雄株。

寻找和定位与芦笋性别决定基因连锁的 DNA 分子标记, 国内外先后有许多研究报道 (Jiang & Sink, 1997; Reamon-Büttner et al., 1998; Reamon-Büttner & Jung, 2000; Jamsari et al., 2004; Nakayama et al., 2006; Gebler et al., 2007; Kazuna et al., 2011; Shiobara et al., 2011; Ii et al., 2012a, 2012b)。前人开发的 DNA 分子标记受试验群体限制, 不具有通用性 (Ii et al., 2012), 且绝大多数是显性标记, 仅有的紧密连锁共显性标记 Asp2-SP6 (Jamsari et al., 2004) 在本试验供试材料中没有多态性而无法使用。为此, 作者利用筛选到的具有多态性且与芦笋性别决定基因紧密连锁的显性标记 Asp1-T7 (Jamsari et al., 2004) 以及 Asp1-T7sp (Nakayama et al., 2006), 结合测交试验进行 DNA 分子标记辅助筛选超雄株与全雄组合研究, 以期加速芦笋全雄育种进程, 提高育种效率。

1 材料与方法

1.1 供试材料及测交

以芦笋品种 ‘Backlim’ (编号为 B25) 两性株自交 S_1 群体 (周劲松 等, 2007), 以及 ‘AT3’、‘B1-a’、‘B2-a’、‘B3-a’、‘B5-c’ 自选优良雌株为试验材料。

2007 年春季以 ‘Backlim’ 两性株自交 S_1 群体中提前开花的雄株 (被测验种) 为父本 (这些雄株依次编号为雄株 1、2、3……14), 与上述优良雌株 (测验种) 一一配组杂交, 按组合收获杂交种子, 秋季播种成苗, 2008 年春季移栽。

1.2 测交组合单株性别 DNA 分子标记苗期鉴别

1.2.1 DNA 分子标记

DNA 提取采用 CTAB 法 (Stewart & Via, 1993), 苗期按单株随机提取每个测交组合 16 ~ 24 个单株以及父、母本的 DNA, 若经检测为全雄组合, 则提取该组合所有单株 DNA 供进一步检测验证。

2007 年冬季利用与芦笋性别决定基因紧密连锁的显性 DNA 分子标记 Asp1-T7 对测交组合父、母本间的多态性进行分析, 在此基础上检测各组合单株, 鉴别各单株性别。引物 Asp1-T7 (Jamsari et al., 2004): 5'-CTTGCGTGAATACGTTGC-3' (F); 5'-TCTCTTGTTCAATATACTC-3' (R)。

2009 年秋季使用由 Asp1-T7 转化而来, 扩增更稳定的 DNA 分子标记 Asp1-T7sp 对 Asp1-T7 检测出的全雄组合进行扩大检测验证。引物 Asp1-T7 sp (Nakayama et al., 2006): 5'-ATATGCGAGGCATTTGGAAG-3' (F); 5'-CTGCTACTGAGATACCTTAC-3' (R)。

1.2.2 PCR 分析

Asp1-T7 与 Asp1-T7sp 分子标记 PCR 反应体系均采用为 25 μ L: 10 \times 扩增缓冲液 2.5 μ L; $MgCl_2$ (25 mmol \cdot L⁻¹) 2.5 μ L; dNTPs (1 mmol \cdot L⁻¹) 2.5 μ L; 引物 (5 pmol \cdot L⁻¹) 2 μ L, 模板 DNA (1.25 ~

20 ng · μL⁻¹) 2 μL; *Taq* DNA 聚合酶 (1 U · μL⁻¹) 1 μL; 加入 ddH₂O 补齐到 25 μL。

在 PCR 仪上按下面的循环程序进行 PCR 扩增: 预变性 94 °C 30 s; 94 °C 30 s, 50 °C (Asp1-T7sp, 为 59 °C) 30 s, 72 °C 40 s, 32 个循环; 最后延伸 72 °C 5 min, 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中 200 V 电泳 1 h, 紫外灯下观察、拍照。

1.3 性别表型田间调查

测交组合显花后, 对单株性别表型进行田间调查, 着生有雌花的单株视为雌株, 着生普通雄花的单株为雄株, 着生两性完全花的单株是雄性雌型株, 基因型上仍归属于雄株 (陈光宇 等, 2007), 统计各组合雌雄株数, 对 DNA 分子标记检测结果进行验证。

2 结果与分析

2.1 测交父、母本间 DNA 分子标记 Asp1-T7 的多态性分析

首先利用分子标记 Asp1-T7 对测交父、母本进行 DNA 的多态性分析 (图 1)。结果表明, 在测交父本雄株中都能扩增出 1 条 440 bp 左右的特异片段 (另 1 条约 300 bp, 同样具有多态性, 但原始参考文献中无此片段), 而母本雌株中都未检测到该片段, 说明 Asp1-T7 在测交组合父母本间具有多态性, 是一显性标记, 且已知该标记是与芦笋性别决定基因 *M* 紧密连锁, 遗传距离仅为 0.2 cM (Jamsari et al., 2004), 符合 DNA 分子标记辅助选择的要求, 能够用来对本试验中芦笋测交后代进行苗期性别快速鉴定。

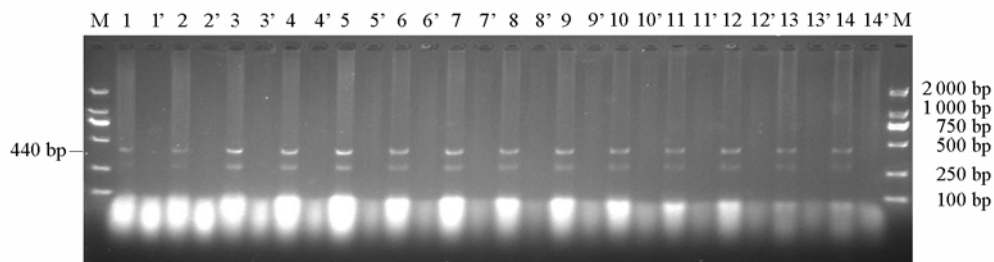


图 1 Asp1-T7 标记对测交父母本的扩增结果

M: DL2000 marker; 1~14: 测交父本; 1'~14': 测交母本。

Fig. 1 PCR products with Asp1-T7 marker on the male and female parents of each testcross in asparagus

M: DL2000 marker; 1~14: The male parents; 1'~14': The female parents.

2.2 测交后代 DNA 分子标记 Asp1-T7 检测分析

2007 年冬季利用与芦笋性别决定基因紧密连锁的显性 DNA 分子标记 Asp1-T7 对测交组合单株进行检测 (图 2)。一共检测了 14 个组合 (表 1), 结果发现, 其中有 2 个测交组合所有单株均携带有上述约 440 bp 雄性特异 DNA 片段。组合 B1-a × B25(05)-1 检测了 16 株 (图 2, A), 另一组合为 AT3 × B25(04)-15 检测了 17 株 (未附图), 都表现为雄性, 由此判断这 2 个测交组合为全雄组合。相对应的测交父本 (被测验种) B25(05)-1 和 B25(04)-15 可以初步被推断为超雄株, 加以重点跟踪调查。

其余测交组合单株检测结果均存在超过 2 株以上未扩增出上述约 440 bp 雄性特异 DNA 片段, 表现为雌性, 是非全雄组合。其中测交组合 B5-c × B25(05)-8 共检测了 18 株, 10 株雄株, 8 株雌株

(图 2, B), 在排除 DNA 质量影响或遗传交换可能之后, 所对应的测交组合的父本可以推断为普通雄株, 基本可淘汰否定。

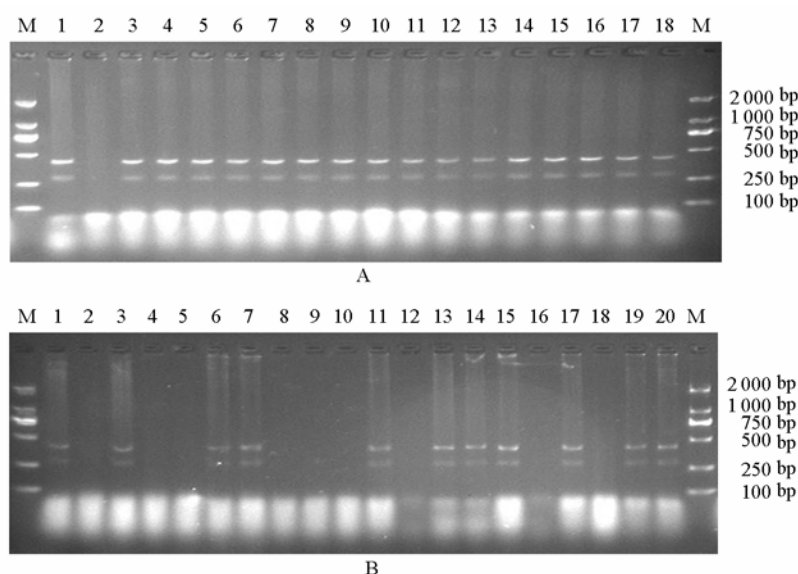


图 2 Asp1-T7 标记对测交后代的扩增结果

M: DL2000 marker; 1: 测交父本; 2: 测交母本; 3~20: 测交后代单株。

Fig. 2 PCR products with Asp1-T7 marker of individuals in the testcross progeny

M: DL2000 marker; 1: The male parents; 2: The female parents;

3 - 20: Individuals in the testcross progeny.

2.3 DNA 分子标记 Asp1-T7sp 检测验证

利用 DNA 分子标记 Asp1-T7sp 对上述 Asp1-T7 检测出的全雄组合进行扩大检测验证, 首先需要进行目标测交组合父、母本间的 Asp1-T7 sp 多态性分析 (图 3)。

结果表明, 在这 2 对测交父本中都能扩增出 1 条 300 bp 左右的特异片段, 而母本中均未检测到该片段, 说明 Asp1-T7sp 在这些目标测交组合父、母本间具有多态性, 也是一显性标记, 已知该标记是通过 Asp1-T7 转化而来, PCR 扩增更稳定, 且是与芦笋性别决定基因 *M* 紧密连锁的, 遗传距离与 Asp1-T7 大致相同 (Nakayama et al., 2006), 符合 DNA 分子标记辅助选择的要求, 也能够用来对本试验中芦笋测交后代进行性别苗期快速鉴定。

2009 年秋季利用新标记 Asp1-T7sp 对 Asp1-T7 检测出的 2 个全雄组合进行扩大检测验证, 这 2 个组合已定植成株, 部分已提前开花, 组合 B1-a × B25(05)-1 共有 16 株, 组合 AT3 × B25(04)-15 共有 33 株。

取所有的单株进行 Asp1-T7sp 的 PCR 扩增检

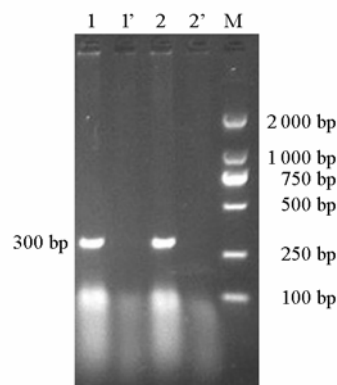


图 3 Asp1-T7sp 标记对芦笋 2 对测交父、母本的扩增结果

1、2: 测交父本; 1'、2': 测交母本;

M: DL2000 marker。

Fig. 3 PCR products with Asp1-T7sp on the parents of two test-cross combinations in asparagus

1, 2: The male parents; 1', 2': The female parents;

M: DL2000 marker.

测, 结果发现, 这两对测交组合所有单株均携带有上述约 300 bp 雄性特异 DNA 片段, 都表现为雄性, B1-a × B25(05)-1 (图 4), AT3 × B25(04)-15 (图 5), 与 Asp1-T7 检测结果一致, 提前开花的单株 DNA 带型也与实际性别表型 (雄株) 相符。这表明, DNA 分子标记 Asp1-T7sp 鉴别芦笋雌雄性别准确, Asp1-T7 检测结果可靠, B1-a × B25(05)-1 和 AT3 × B25(04)-15 从分子检测数据上分析确可被判断为全雄组合。

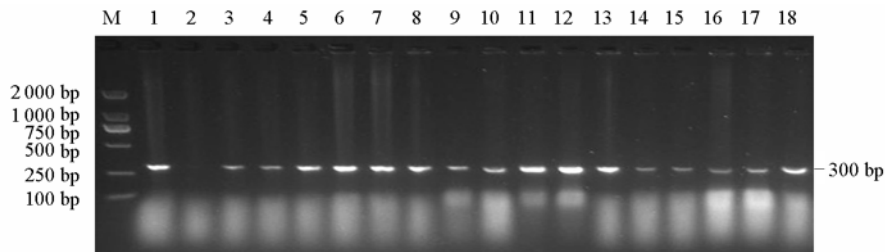


图 4 Asp1-T7sp 标记对全雄组合 B1-a × B25(05)-1 的扩增结果

M: DL2000 marker; 1: 测交父本; 2: 测交母本; 3~18: 测交后代单株。

Fig. 4 PCR products with Asp1-T7sp marker on individuals in the testcross progeny

M: DL2000 marker; 1: The male parent; 2: The female parent;
3 - 18: Individuals in the testcross progeny.

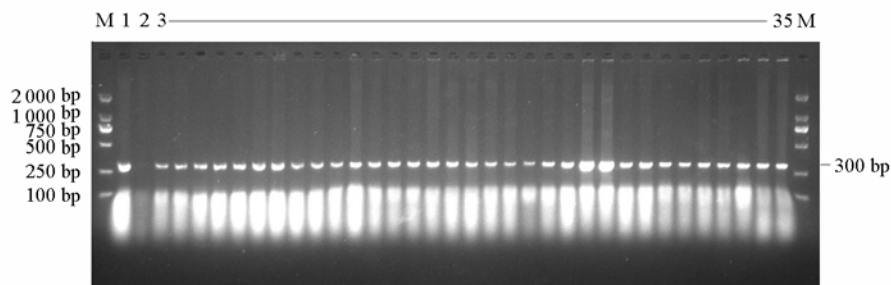


图 5 Asp1-T7sp 标记对全雄组合 AT3 × B25(04)-15 的扩增结果

M: DL2000 marker; 1: 测交父本; 2: 测交母本; 3~35: 测交后代单株。

Fig. 5 PCR products with Asp1-T7sp marker on individuals in the testcross progeny

M: DL2000 marker; 1: The male parent; 2: The female parent;
3 - 35: Individuals in the testcross progeny.

2.4 性别表型田间调查验证

2008、2009、2010 年连续 3 年对所有测交组合性别表型进行田间调查, 对 DNA 分子标记辅助筛选的超雄株的真实性进行验证分析, 测交后代 DNA 分子标记 Asp1-T7 检测与田间性别表型调查结果见表 1。

由表 1 可知, DNA 分子标记检测推断为普通雄株所对应组合均出现 2 株以上雌株, 可认定为非全雄组合, 免除后续其他单株性别调查; DNA 分子标记检测为全雄组合的, 多年逐株跟踪调查, 结果发现, 组合 B1-a × B25(05)-1 田间共 16 株, 全部表现为雄性, 组合 AT3 × B25(04)-15 田间共 33 株, 也全部表现为雄性, 都未发现雌株, 它们被确证为全雄组合。

DNA 分子标记检测与性别田间调查实际表型结果基本吻合, 说明本试验 DNA 分子标记辅助选择芦笋超雄株结果真实, 方法可行。

表 1 测交后代性别检测与田间调查结果

Table 1 Sex identification in the progeny by DNA molecular marker-assisted selection and field survey

编号 No.	测交组合名称 The test-cross combinations	分子标记检测结果 The test results from marker detection			田间调查结果 The results from field survey			结论 Conclusion
		总株数 Total	♂	♀	总株数 Total	♂	♀	
1	B1-a × B25(05)-1	16	16	0	16	16	0	MM
2	AT3 × B25(04)-15	17	17	0	33	33	0	MM
3	B25(04)-11 × B25(04)-7	24	22	2	23	21	2	Mm
4	B25(04)-11 × B25(04)-8	19	15	4	24	≥8	≥3	Mm
5	AT3 × B25(04)-2	24	12	12	37	≥16	≥8	Mm
6	B3-a × B25(04)-10	16	9	7	18	≥6	≥5	Mm
7	B2-a × B25(04)-16	24	12	12	30	≥10	≥6	Mm
8	B2-a × B25(04)-13	16	11	5	25	≥9	≥2	Mm
9	B5-c × B25(04)-14	23	10	13	30	≥8	≥8	Mm
10	B25(04)-5 × B25(04)-1	19	13	6	32	≥11	≥4	Mm
11	B1-a × B25(05)-4	21	12	9	26	≥12	≥8	Mm
12	B2-a × B25(05)-7	16	7	9	18	≥5	≥3	Mm
13	B5-c × B25(05)-8	18	10	8	24	≥4	≥2	Mm
14	AT3 × B25(05)-11	16	7	9	16	≥5	≥3	Mm

3 讨论

芦笋超雄株的筛选可以通过测交 ($mm \times MM \rightarrow Mm$, 全部为 ♂ 当选; $mm \times Mm \rightarrow 1Mm + 1mm$, 淘汰), 或利用与芦笋性别决定基因紧密连锁的共显性 DNA 分子标记辅助选择, 早期快速鉴别出 3 种基因型, 筛选出超雄株。由于芦笋是多年生的, 从种子到显花要 1 ~ 2 年时间, 且花期不一, 以致整个测交过程需要 3 ~ 4 年甚至更长, 费时费工; 后一种方法快速准确, 不受外界环境干扰, 是超雄株筛选的首选方法。但是, 在本研究中, 由于没有筛选到有多态性的共显性 DNA 分子标记, 根据实际情况将上述两种方法结合起来, 利用与芦笋性别决定基因紧密连锁的显性 DNA 分子标记 Asp1-T7 及 Asp1-T7sp 早期快速鉴别出测交后代雌雄性别, 根据测交后代性别表现规律, 推断筛选超雄株, 这样省去了等测交后代开花再统计性别的时间, 缩短了测交工作周期。而且, 测交同时可以进行组合比较试验, 测定分析超雄株所对应组合配合力, 只要筛选出来超雄株, 其所对应的高产组合很可能就是理想的芦笋全雄新品系, 一举两得。

普通雄株测交后代雌雄比例, 受样本容量等因素影响, 可能与理论上 1:1 不符; 但由于雌株的基因型是 mm , 雌株表型与基因型是直接对应的, 田间性别表型调查, 凡发现 1 株雌株, 在排除混杂情况下, 所在测交组合的父本必含 m , 即可推断为普通雄株 Mm , 无需考虑实际的雌雄比例, 该组合的其他单株性别表型也可省去调查。至于显性 DNA 分子标记 Asp1-T7 早期快速鉴别芦笋雌雄性别可行性已有分析讨论, 是完全可行和有效的 (周劲松 等, 2007), Asp1-T7sp 后期才应用, 其 PCR 扩增更稳定, 作为 Asp1-T7 的一种有益补充和替代进行后续验证, 以避免假阴性和假阳性现象。根据选择准确率 $P = (1 - r)^2$ (方宣钧 等, 2000), Asp1-T7 理论选择准确率可达 96.04%, 1 株雌株检测错误率为 4.96%, 检测出 2 株雌株同时都发生错误, 概率为 0.24%, 是小于 1% 的小概率事件, 故以分子标记检测出的 2 株雌株为排除全雄组合的基准, 必要时 (如出现 1 株雌株) 结合性别表型调查验证即可。同时, 根据在 F_2 代要求至少选到 1 株目标基因型, 即使不用标记辅助选择 (相当于标记与目标基因间无连锁, 重组率为 0.5), 则至少需选择 16 株, 有 99% 的把握能保证其中有 1 株为目标基因型 (方宣钧 等, 2000)。本试验中测交群体类似 BC_1 , 与 F_2 代相比, 只有 2 种基因型, 至少需选择单株数理应更少。据此, 每个测交组合随机选择 16 株及以上, 1 株雌株都没有, 就有 99% 的把握保证可推断为全雄组合。因此, 本研究中利用显性 DNA 分子标记结合测交筛选芦笋超雄株的方法在理论和实践上均是可行有效的, 能够显著缩短超雄株筛选时间, 还可同时进行组合比较试

验,提高芦笋全雄育种效率。本研究中筛选出的全雄组合 AT3 × B25(04)-15 最近申报了新品种审定,并通过了江西省农作物品种审定委员会组织的专家现场考察评议。

References

- Bracle M, Caporali E, Galli MG, Longo C, Marziani-Longo G, Rossi G, Spada A, Soave C, Falavigna A, Raffaldi F, Maestri E, Restivo F M, Tassi F. 1991. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Science*, 80: 67 – 77.
- Chen Guang-yu. 2005. Production technology of free-pollution *Asparagus*. Beijing: China Agricultural Press: 1 – 3. (in Chinese)
- 陈光宇. 2005. 芦笋无公害生产技术. 北京: 中国农业出版社: 1 – 3.
- Chen Guang-yu, Zhou Jin-song, Tang Yong-ping, Luo Shao-chun, Zhan Feng-xi, Yin Fu-qiang. 2007. Investigation and preliminary utilization on the andromonoecious plants in *Asparagus officinalis* L. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 19 (9): 31 – 34. (in Chinese)
- 陈光宇, 周劲松, 汤泳萍, 罗绍春, 占丰溪, 尹富强. 2007. 芦笋两性株调查与初步利用研究. *江西农业学报*, 19 (9): 31 – 34.
- Fang Xuan-jun, Wu Wei-ren, Tang Ji-liang. 2000. DNA molecular marker-assisted crop breeding, Beijing: Science Press: 92 – 93. (in Chinese)
- 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 2000. 作物DNA标记辅助育种. 北京: 科学出版社: 92 – 93.
- Gebler P, Wolko L, Knaflewski M. 2007. Identification of molecular markers for selection of supermale asparagus plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 48 (2): 129 – 131.
- Jamsari A, Nitz I, Reamon-Büttner S M, Jung C. 2004. BAC-derived diagnosetic markers for sex determination in asparagus. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1140 – 1146.
- Jiang C, Sink K C. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in asparagus. *Euphytica*, 94: 329 – 333.
- Kazuna H, Yumiko A, Noboru K. 2011. Identification of homozygous male plants by quantitative analysis of a nucleotide sequence linked to the sex-determination locus in *Asparagus officinalis* L. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80 (3): 308 – 313.
- Li Y, Uno Y, Kanechi M, Inagaki N. 2012a. Screening of sex in asparagus at early growth stages. *HortTechnology*, 22 (1): 77 – 82.
- Li Y, Uragami A, Uno Y. 2012b. RAPD-based analysis of differences between male and female genotypes of *Asparagus officinalis*. *Horticultural Science*, 39 (1): 33 – 37.
- Nakayama H, Ito T, Hayashi Y. 2006. Development of sex-linked primers in garden asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Breeding Science*, 56: 327 – 330.
- Reamon-Büttner S M, Jung C. 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 432 – 438.
- Reamon-Büttner S M, Schöndelmaier J, Jung C. 1998. AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. *Molecular Breed*, 4: 91 – 98.
- Riccardi P, Casali P E, Mercati F, Falavigna A, Sunseri F. 2011. Genetic characterization of asparagus doubled haploids collection and wild relatives. *Scientia Horticulturae*, 130 (4): 691 – 700.
- Shiobara Y, Yoshino M, Uragami A, Widiastuti A, Omori A, Kuba K, Saito H, Hirata Y, Sonoda T, Koizumi T, Sato T. 2011. Sex distinction of asparagus by loop-mediated isothermal amplification and observation of seedling phenotypes. *Euphytica*, 177: 91 – 97.
- Stewart C N, Via L E. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 14: 748 – 750.
- Zhou Jin-song, Tang Yong-ping, Luo Shao-chun, Yin Fu-qiang, Zhan Feng-xi, Liang Guo-hua, Chen Guang-yu. 2007. Quick distinguishing the sex of asparagus plant at early growth stage by a sts marker. *Molecular Plant Breeding*, 5 (3): 363 – 366. (in Chinese)
- 周劲松, 汤泳萍, 罗绍春, 尹富强, 占丰溪, 梁国华, 陈光宇. 2007. DNA 分子标记早期快速鉴别芦笋雌雄株. *分子植物育种*, 5 (3): 363 – 366.