

苹果花药培养植株倍性及其纯合基因型的鉴定

张利义¹, 杨振英¹, 丛佩华¹, 张开春², 刘建利³, 薛光荣¹

(¹中国农业科学院果树研究所, 辽宁兴城 125100; ²北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093; ³西北第二民族学院生命科学系, 银川 750021)

摘要: 用倍性分析仪对 3 株苹果花药培养植株进行了倍性鉴定, 并用 AS-PCR 分子标记分析其是否为纯合体。流式细胞法测定其倍性分别为二倍体、三倍体和四倍体; AS-PCR 分析证明它们为纯合基因型。可认为花药培养植株的多倍化现象可能是在组织培养条件下, 由起源于单倍体的细胞发生自然加倍所形成的结果。

关键词: 苹果; 花药培养; AS-PCR; 倍性; 纯合基因型

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0481-04

Analysis of Ploidy and Homozygous Genotype of Apple Plants Obtained by Anther Culture

ZHANG Li-yi¹, YANG Zhen-ying¹, CONG Pei-hua¹, ZHANG Kai-chun², LIU Jian-li³, and XUE Guang-rong¹

(¹ Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100, China; ² Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093, China; ³ Department of Life Sciences, the Second Northwest University for Minorities, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In this paper, the ploidy and homozygous genotype of three apple plants obtained by anther culture were analyzed by using methods of the flow cytometric analysis and AS-PCR marker, in order to confirm their haploid origin. The results have proved that they all have a true homozygous status by AS-PCR analysis although they are now diploid, triploid and tetraploid respectively by Ploidy Analyser, which is possibly regarded as a result of spontaneous polyploidisation from haploid cell during tissue culture.

Key words: Apple; Anther culture; AS-PCR; Ploidy; Homozygous genotype

对于苹果这样遗传背景高度复杂的多年生木本果树, 利用 DH (Double Haploid, 简称 DH) 材料进行遗传分析和品种选育等研究, 具有重要的价值 (薛光荣和杨振英, 1990; 何道一等, 2001; Höfer et al., 2002)。

已有报道 (薛光荣和牛健哲, 1984; 牛健哲等, 1994; Höfer & Grafe, 2000), 苹果花药培养植株试管苗早期染色体计数观察发现其单倍体细胞占优势, 后经过长时间的组织培养以及在田间栽培, 发现染色体数在不断变化, 常发生自然加倍现象。另外, 花药培养的植株可能起源于单倍体配子, 也可能起源于 2n 配子或体细胞。因而, 苹果花药培养植株往往为单倍体、加倍单倍体及其他倍性等混合群体。

尽早鉴定出真正起源单倍体的植株尤为必要, 这是了解其遗传背景和进一步应用的前提。本研究中采用倍性分析仪对 3 株苹果花药培养植株进行了倍性鉴定分析, 并用 S (Self-incompatibility) 基因 AS-PCR (Allele-Specific PCR, 简称 AS-PCR) 分子标记技术就它们是否为纯合体进行了鉴定分析, 以期为进一步开展苹果花药培养纯系杂交育种和创建苹果 DH 群体奠定研究基础。

收稿日期: 2006-07-21; 修回日期: 2006-12-29

基金项目: 国家“863”资助项目 (2001AA241144)

1 材料与方法

试材采自中国农业科学院果树研究所试验基地，为1987年嫁接成活的金冠苹果花药培养植株 ac_1 和 ac_2 ，以及2002年嫁接成活的嘎拉苹果花药培养植株 ac_3 。

分别取3~5个叶片，放在有冰块的冰壶中，带到华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室，采用流式细胞法（张俊娥等，2003）测定单个细胞核的DNA总量，每个样品测定5 000个细胞。以花药培养植株相对应的母本叶片的DNA含量为对照。DNA含量的分布曲线由倍性分析仪自动测定，采用PartecDPAC软件自动统计分析。

用于S基因AS-PCR分析的DNA采用CTAB法提取（Doyle & Doyle, 1990），但提取缓冲液组成略有变动。其组成为100 mmol·L⁻¹Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 mol·L⁻¹NaCl; 60 mmol·L⁻¹EDTA, pH 8.0; 2% CTAB; 1%疏基乙醇；2% PVP。将提取的DNA溶于适量的TE中，经紫外分光光度法和琼脂糖电泳定量法进行模板DNA定量。

根据文献（Broothaerts et al., 1995; Janssens et al., 1995），金冠品种S基因型为S2S3，嘎拉为S2S5。根据已明确的S基因序列，对其保守序列设计特异引物，进行PCR扩增。本研究所用引物引自Broothaerts（2003）发表的文章，具体见表1。

表1 S基因特异性PCR引物
Table 1 PCR primers specific for S genes

基因 Gene	引物(5'-3') Primers (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Band size (bp)
S2	Sf: GTTCAAACGTGACTTA TGGG	64	449
	Sr: GGTTTGGTTCCTTACCA TG		
S3	Sf: CAAACGA TAACAAA TCTTAC	54	500
	Sr: TA TA TGAAA ATCACCA TTGCG		
S5	Sf: GTAA TTGCAACGGGTCAAAA TA TGAG	62	346
	Sr: ACAACTCA GTA TTA GTTGCTGGATCA		

PCR反应体系：1×PCR buffer, 1.5 mmol·L⁻¹MgCl₂, 200 μmol·L⁻¹dNTPs, 两种引物各1 μmol·L⁻¹（上海生工生物公司合成），0.5 U Taq DNA聚合酶（Promega公司产品），50 ng DNA模板，总反应体积20 μL。

PCR程序：94℃预变性3 min; 然后按94℃1 min, 各S基因引物的退火温度（表1）30 s, 72℃延伸1 min, 30个循环；72℃延伸5 min。

将金冠对照及其 ac_1 、 ac_2 花药培养植株的S2 PCR产物分别与其相对应的S3 PCR产物混匀，同样将嘎拉的对照及其 ac_3 花药培养植株的S2 PCR产物分别与其相对应的S5 PCR产物混匀，在3.0%的琼脂凝胶上电泳，经EB染色后凝胶呈像系统中照相。试验重复3次。

2 结果与分析

2.1 花药培养植株倍性的鉴定

倍性分析仪测定结果（图1）显示，花药培养植株 ac_1 、 ac_2 和 ac_3 分别为二倍体、三倍体和四倍体。这和Höfer等（2000）采用流式细胞法测定苹果花药培养植株倍性所得到相类似的结果。但是这3株花药培养植株究竟是起源于二倍体细胞（如花药的药壁、药隔以及未减数2n配子等），还是起源于单倍体细胞在培养条件下发生自然加倍，还不能确定。

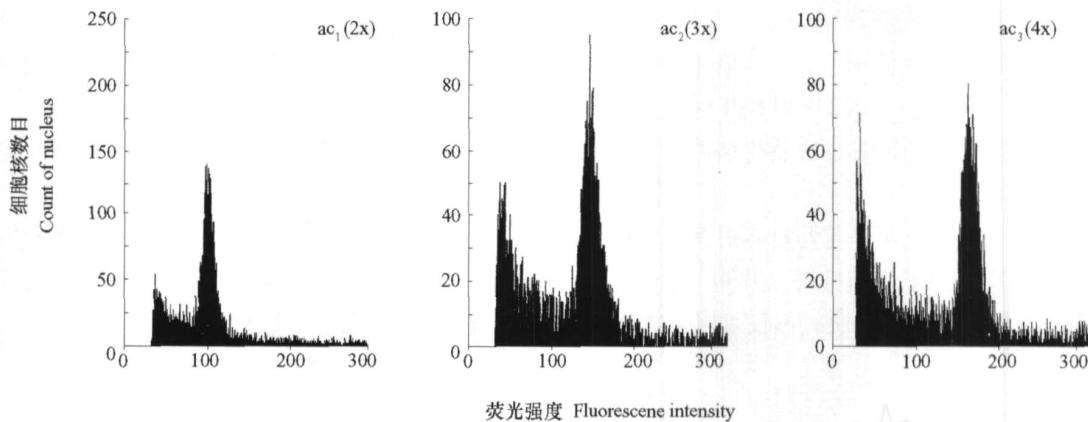
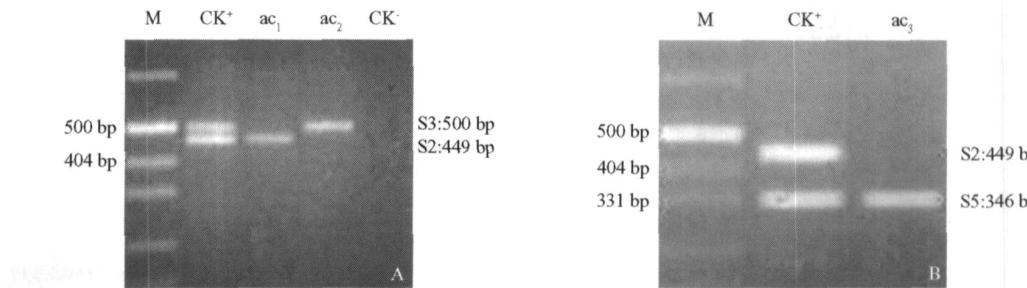


图 1 苹果花药培养植株的 DNA 流式细胞分析

Fig. 1 Flow cytometry of nuclear DNA content of apple anther-cultured plant

2.2 S 基因 AS-PCR 扩增

苹果是典型的配子体型自交不亲和性果树，其自交不亲和性是由复等位基因的单一位点控制，也称单位点自交不亲和性 (Broothaerts et al., 1995)。就苹果品种自交不亲和性基因型而言，迄今在苹果上已鉴定出了数十个 *S* 等位基因 (van Nerum et al., 2001; Broothaerts, 2003)。双亲 *S* 基因型与后代 *S* 基因型有着必然的联系，后代 *S* 基因型是父母本所包含的一对 *S* 基因之一的随机组合的结果 (Verdoort et al., 1998; 张绍铃等, 2003)。由此推断，二倍体品种含两种不同的 *S* 基因，单倍体品种只含一种 *S* 基因。通过花药培养所获得植株，不管最终加倍变成几倍体，如果其为单倍体起源，应只具有其亲本之一的一种 *S* 基因，如果为二倍体细胞起源，应该具有和亲本相同的两种 *S* 基因。譬如金冠 *S* 基因型为 *S2S3*，其花培植株如果起源于单倍体，不管最终加倍变成几倍体，其分子标记要么是 *S2*，要么是 *S3*，如果是二倍体细胞起源，那么必同现 *S2* 和 *S3*。我们的试验结果证实了这一点。所选用的 3 株花培植株均缺失一条谱带；金冠 ac_1 为 *S2* (449 bp)，缺失 *S3*，而 ac_2 为 *S3* (500 bp)，缺失 *S2* (图 2, A)。嘎拉 ac_3 为 *S5* (346 bp)，缺失 *S2* (图 2, B)。而对照 (CK^+) 均出现了两条标记谱带，金冠分别为 *S3* (500 bp) 和 *S2* (449 bp)，嘎拉分别为 *S2* (449 bp) 和 *S5* (346 bp)，与预料的一致。

图 2 AS-PCR 鉴定苹果及其花培植株的 *S* 等位基因的扩增结果

M. PCR marker; A: CK^+ . 阳性对照 (金冠); ac_1 , ac_2 . 金冠花培植株; CK^- . 阴性对照。

B: CK^+ . 阳性对照 (嘎拉); ac_3 . 嘎拉花培植株。

Fig. 2 AS-PCR analysis of *S*-alleles from apple and its anther-cultured plants

M. PCR marker; A: CK^+ . Positive control; CK⁻. Negative control; ac_1 and ac_2 . Anther-cultured plants

B: CK^+ . Positive control (Gala); ac_3 . Anther-cultured plant

Verdoodt等(1998)在对Braebum品种的30株花培植株进行AS-PCR标记鉴定后发现仅有一株S基因和亲本一样,其余29株均缺失一种S等位基因。Verdoodt等(1998)和本试验结果均说明通过花药培养获得的再生植株主要是单倍体起源,也即纯合体,并说明苹果花药培养植株自然加倍频率极高。这也与Höfer等(2002)用SSR标记方法分析苹果花药培养植株所得到结论相同。

此外,通过花药培养还可获得倍性丰富的纯合体植株,这为今后开展苹果倍性遗传育种研究提供了丰富的试材。

综上可见,通过苹果花药培养可获得倍性丰富的纯合基因型植株,这为今后开展苹果纯系和倍性遗传育种研究提供了基础材料。另外,对已明确S基因型品种的花药培养再生植株如同时使用流式细胞法和AS-PCR分子标记法,不仅可以快速确定其倍性,还能确定其是否为纯合体。

References

- Broothaerts W. 2003. New findings in apple S- genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S- alleles. *Theor Appl Genet*, 106: 703 - 714.
- Broothaerts W, Janssens G A, Proost P, Broekaert W F. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol*, 27 (3): 499 - 511.
- Doyle J J, Doyle J L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 - 15.
- He Dao-yi, Sun Shan, Cui De-cai, Chen Zhen-guang. 2001. Apple haploid induction by pollination with high dose irradiated pollen. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (3): 194 - 199. (in Chinese)
- 何道一,孙山,崔德才,陈振光. 2001. 应用高剂量辐射花粉受分级幼胚培养诱导苹果单倍体. 园艺学报, 28 (3): 194 - 199.
- Höfer M, Gomez M A, Aguiriano E, Manzanera J A, Bueno M A. 2002. Analysis of simple sequence repeat markers in homozygous lines of apple. *Plant Breeding*, 121: 159 - 162.
- Höfer M, Grafe C. 2000. Preliminary evaluation of doubled haploid material in apple. *Acta Hort*, 538: 587 - 592.
- Janssens G A, Goder I G, Broekaert W F. 1995. A molecular method for s-allele identification in apple based on allele specific PCR. *Theor Appl Genet*, 91: 691 - 698.
- Niu Jian-zhe, Xue Guang-tong, Cong Pei-hua, Yang Zhen-ying, Shi Yong-zhong. 1994. Anther culture induced apples. *Journal of fruit Science*, 11 (1): 1 - 4. (in Chinese)
- 牛健哲,薛光荣,丛佩华,杨振英,史永忠. 1994. 应用花药花药培养技术培育苹果新类型. 果树科学, 11 (1): 1 - 4.
- Verdoodt L, van Haute A, Goderis IJ, De Witte K, Keulemans J, Broothaerts W. 1998. Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. *Theor Appl Genet*, 96 (2): 294 - 300.
- van Nemer I, Geerts M, van Haute A, Keulemans J, Broothaerts W. 2001. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' S-alleles. *Theor Appl Genet*, 103: 584 - 591.
- Xue Guang-tong, Yang Zhen-ying. 1990. The technique of apple anther culture and the successful culture of pollen plantlets of 8 main apple cultivars. *Scientia Agricultura Sinica*, 23 (3): 864. (in Chinese)
- 薛光荣,杨振英. 1990. 苹果花药培养技术及8个主栽品种的花粉植株培育成功. 中国农业科学, 23 (3): 864.
- Xue Guang-tong, Niu Jian-zhe. 1984. A study on the induction of apple pollen plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 11 (3): 161 - 164. (in Chinese)
- 薛光荣,牛健哲. 1984. 诱导苹果花粉植株的研究. 园艺学报, 11 (3): 161 - 164.
- Zhang Jun-e, Liu Ji-hong, Deng Xiu-xin. 2003. Genetic variation of citrus calli revealed by the Ploidy Analyser. *Acta Genetics Sinica*, 30 (2): 169 - 174. (in Chinese)
- 张俊娥,刘继红,邓秀新. 2003. 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异. 遗传学报, 30 (2): 169 - 174.
- Zhang Shao-ling, Cao Sheng-min, Wu Hua-qing. 2003. Self-incompatibility genotypes of fruit trees and their identification methods. *Journal of Fruit Science*, 20 (5): 358 - 363. (in Chinese)
- 张绍玲,曹生民,吴华清. 2003. 果树自交不亲和性基因型及其鉴定方法. 果树学报, 20 (5): 358 - 363.