

番木瓜两性基因的RAPD标记

周国辉 李华平 张曙光 范怀忠

(华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要: 应用混合分离群体分析法, 在205个10碱基随机引物中, 寻找番木瓜两性基因(M_2)的RAPD标记; 发现两个多态性RAPD条带: OPQ-07₁₈₀₀和OPE-06₁₀₅₀。它们仅能在两性DNA池中扩增到, 而不能在雌性DNA池中扩增到。用上述两引物检测了210株番木瓜单株DNA, 结果表明, OPQ-07₁₈₀₀和OPE-06₁₀₅₀与 M_2 基因紧密连锁, 它们位于 M_2 基因的两侧, 其遗传距离分别为4.5和1.9 cM。

关键词: 两性基因; 番木瓜; RAPD标记

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2001)03-0190-04

RAPD MAKERS FOR HERMAPHRODITE GENE IN PAPAYA

ZHOU Guo-hui LI Hua-ping ZHANG Shu-guang FAN Hwei-chung

(College of Natural Resources and Environment, South China Agri. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Bulked segregant analysis was used to identify RAPD markers linked to the hermaphrodite gene (M_2) in papaya (*Carica papaya* L.). DNA bands amplified from 205 random 10-mer primers were screened. Two polymorphic bands, OPQ-07₁₈₀₀ and OPE-06₁₀₅₀, were found, which were present in the hermaphrodite bulked DNAs and absent in the female bulked DNAs. 210 individual papaya plants were then tested with these two primers. The results indicated that the RAPD markers, OPQ-07₁₈₀₀ and OPE-06₁₀₅₀, were tightly linked to M_2 , which located at both sides of M_2 , and have a map distance of 4.5 cM and 1.9 cM, respectively.

Key words: Hermaphrodite gene; Papaya; RAPD marker

番木瓜是一种优质的热带、亚热带果树, 其株性有雌株、雄株及两性株三种类型, 不同性别的植株其结果性能、果实形态及品质均存在较大差异^[1]。在苗期鉴定植株的性别, 对番木瓜育种及栽培均具有一定的意义。番木瓜从种子萌发到开花一般需要6个月以上的时间, 在此之前不能从形态上判断植株性别^[2], 有人^[3]试图采用物理、化学及培养的方法来预测植株的性别, 结果均不理想。

番木瓜的株性由三个等位基因控制: M_1 (雄性)、 M_2 (两性) 及 m (雌性)^[4], 其中 M_1 、 M_2 为显性, m 为隐性。雄株及两性株的基因型分别为 M_1m 及 M_2m , 雌株基因型为 mm , 而基因型为 M_1M_1 , M_1M_2 及 M_2M_2 合子均败育^[5]。

收稿日期: 2000-12-19

基金项目: 广东省重点科技项目 (99M04202G); 深圳市农业局资助
李文涛老师协助基因连锁分析, 特此感谢!

番木瓜栽培品种可分为两种类型：雌株两性株类型及雌株雄株类型。我国主栽品种“穗中红”属于前者。本文报道了采用随机扩增多态性DNA (RAPD) 技术在番木瓜品种“穗中红”中寻找 M_2 分子标记的研究结果。

1 材料和方法

植物材料 番木瓜 (*Carica papaya* L.) 品种“穗中红” (Suizhonghong) (种子购自广州市果树研究所) 两性株花粉给雌株授粉, 收集单果种子培育成性别分离群体, 开花期观察证实其性别分离比符合1 (雌性): 1 (两性) 理论预期值, 分单株采集幼叶, 抽提DNA。

番木瓜DNA抽提及性别DNA池的构建 按文献[6]的方法抽提番木瓜植株DNA; 用DU₆₄₀核酸蛋白分析仪 (Beckman公司) 测定OD₂₆₀/OD₂₈₀值, 判断其纯度; 采用Warburg-christian公式求算浓度并用0.8%琼脂糖凝胶电泳加以验证; 试验所用DNA产物要求OD₂₆₀/OD₂₈₀值为1.8-2.0, 电泳呈单条带。根据混合分离群体分析法 (BSA)^[7]原理, 分别等量混合7株雌株及7株两性株DNA, 分别构成雌性DNA池及两性DNA池。

RAPD反应 RAPD反应参照文献[7]进行。反应总体积25 μ l: 10 \times 缓冲液 (含25 mmol/L MgCl₂) 2.5 μ l, 10 mmol/L dNTP 0.25 μ l, Taq DNA聚合酶0.5 U (基因公司产品), 10碱基随机引物1 μ l (约5 pmol/L, Operon公司产品), 模板DNA 20-30 ng, 加双蒸水至25 μ l。覆盖20-30 μ l石蜡油。扩增反应在Biometra公司的UNO II热循环仪上进行。热循环条件为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 36 $^{\circ}$ C, 2 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 5个循环后改为94 $^{\circ}$ C, 0.5 min; 36 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min; 35个循环后于72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶 (含0.5 μ g/ml EB), 0.5 \times TBE缓冲液中电泳, 在紫外灯下观察并照相。

连锁分析 应用MAPMAKER 3.0软件, 计算分子标记与性别基因的连锁距离, 临界LOD取3.0, 并用Kosambi函数将重组率转换成图距单位厘摩 (cM)。

2 结果和分析

2.1 引物筛选

以雌性DNA池和两性DNA池为模板, 平行进行RAPD反应, 结果每反应可产生0-8条扩增带。共筛选了205个随机引物, 找到2个引物: OPQ-07 (5'-CCCCGATGGT-3') 及 OPE-06 (5'-AGACCCCTC-3') 能在两性DNA池中各产生一条特异性的扩增带 (图1), 重复三次, 结果均一致。OPQ-07引物的扩增条带大小约为1 800 bp, 命名为OPQ-07₁₈₀₀; OPE-06引物的扩增条带大小约为1 050 bp, 命名为OPE-06₁₀₅₀。

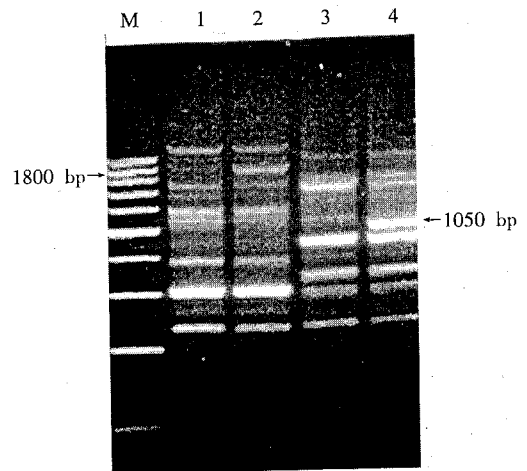


图1 引物OPQ-07及OPE-06在雌性及两性DNA池中的扩增结果

Fig. 1 RAPD profile obtained by OPQ-07 and OPE-06 in female and hermaphrodite DNA bulks

M: 分子量标准 (200 bp梯度) Molecular marker (200 bp ladder);
 1: OPQ-07扩增雌性池Female DNA bulk by OPQ-07;
 2: OPQ-07扩增两性池Hermaphrodite DNA bulk by OPQ-07;
 3: OPE-06扩增雌性池Female DNA bulk by OPE-06;
 4: OPE-06扩增两性池Hermaphrodite DNA bulk by OPE-06

2.2 RAPD标记与两性基因连锁分析

以OPQ-07和OPE-06为引物,进行RAPD标记连锁分析。性别分离群体共210株,其中两性株96株,雌株114株。96株两性株中,可扩增出OPQ-07₁₈₀₀的有91株,可扩增出OPE-06₁₀₅₀的有94株;而114株雌株中,可扩增出OPQ-07₁₈₀₀的仅4株,可扩增出OPE-06₁₀₅₀的仅2株;表明这两个RAPD条带与两性基因存在着明显的协同分离现象(图2)。

应用MAPMAKER 3.0程序包进行连锁分析,结果表明,RAPD标记与两性基因 M_2 间的连锁顺序为OPQ-07₁₈₀₀— M_2 —OPE-06₁₀₅₀,遗传距离分别为4.5 cM和1.9 cM(图3)。

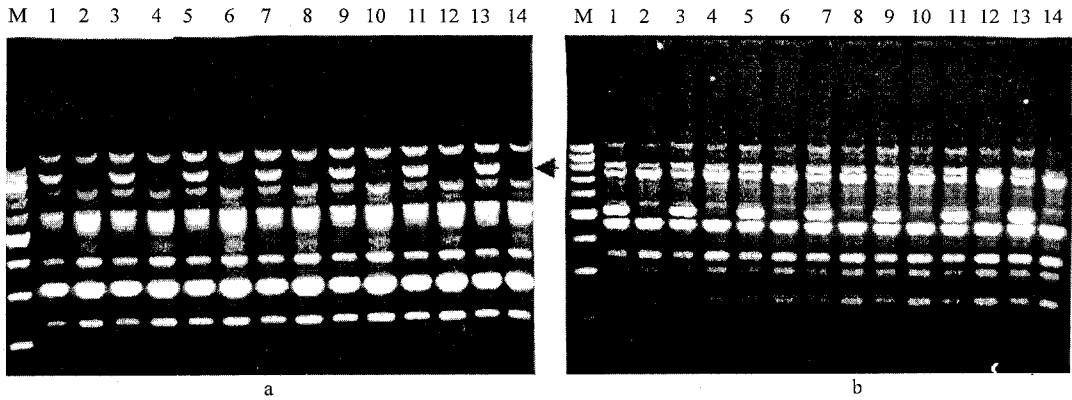


图2 引物OPQ-07 (a)及OPE-06 (b)对番木瓜雌性及两性单株扩增出的RAPD带型

Fig. 2 RAPD profile obtained by OPQ-07 (a) and OPE-06 (b) in papaya individual plants

M:分子量标准(200 bp梯度) Molecular marker (200 bp ladder); 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13:两性株Hermaphrodite plants; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14:雌性株Female plants.

2 讨论

本研究应用BSA法,确立了两个与番木瓜两性基因紧密连锁的RAPD标记,它们与两性基因的遗传距离分别为4.5 cM和1.9 cM;为番木瓜性别基因的精细定位和克隆打下了良好基础。Sondur等^[8]曾用RAPD技术构建了一个番木瓜遗传连锁图谱,其中在性别决定座位两边各有一个标记,但遗传距离为7 cM。Somsri等^[9]应用DNA扩增指纹(DAF)技术也曾对番木瓜性别基因标记进行了研究,虽然找到了多个性别相关的标记,但未进行遗传连锁分析,而且由于DAF反应所需的随机引物用量大(是RAPD反应的20倍)、操作较繁琐,不适用于性别选择工作,又因其条带的回收、克隆存在一些技术困难,这些标记被证明不能转化为特征序列扩增片段(Sequence characterized amplified region, SCAR)标记。

RAPD技术具有快速、直接和简便等特点。理论上,本研究所建立的两个分子标记能够在苗期鉴别番木瓜植株的性别,有关试验正在进行中。但是RAPD技术也有不尽人意之处,主要是RAPD应对模板DNA的质量和浓度有较严格的要求,在大量样品的鉴定中往往不易达到。因此我们正在试图将这两个RAPD标记转化为以特异引物PCR为基础的SCAR标记。本研究确立的两个两性基因分子标记,是否也适用于番木瓜的其他品种,有关研究正在进行中。

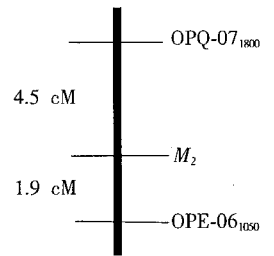


图3 OPQ-07₁₈₀₀, OPE-06₁₀₅₀与两性基因(M_2)连锁示意图

Fig. 3 A linkage map of OPQ-07₁₈₀₀ and OPE-06₁₀₅₀ with M_2 locus for hermaphrodite

参考文献:

- [1] Arkle T D J, Nakasome H Y. Floral differentiation in the hermaphrodite papaya [J]. Hort Sci, 1984, 19: 832-834.
- [2] Gupta S K. Sibmate papaya for obtaining breeders' seed [J]. Indian Hort, 1989, 36: 16-19.
- [3] Rao O P, Singh R N, Singh B P. Sex identification in papaya through colorimetric tests and morphological characters of leaf petiole [J]. Prog Hort, 1985, 17: 340-346.
- [4] Storey W B. Genetics of papaya [J]. J Hered, 1953, 44(2): 70-78.
- [5] Storey W B. Segregation of sex types in solo papaya and their application to the selection of seed [J]. Amer Soc Hort Sci, 1938, 35: 83-85.
- [6] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321-4324.
- [7] Williams J K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primer and useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [8] Sondur S N, Manshardt R M, Stiles J I. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 547-553.
- [9] Somsri S, Drew R, Jobin M, et al. Developing molecular markers for sex prediction in papaya (*Carica papaya* L.) [J]. Acta Hort, 1998, 461: 141-148.

《防护林科技》2002年征订启事

《防护林科技》是由国家林业局三北防护林建设局、黑龙江省防护林研究所和黑龙江省林业厅三北站共同主办,是全国唯一关于防护林科学研究和防护林体系建设方面的专业性期刊,国内外公开发行。国内统一刊号CN 23-1335/S。

《防护林科技》立足三北,面向全国,为全国十大生态工程(三北防护林、长江中上游防护林、沿海防护林、平原农田防护林、太行山绿化、防沙治沙、黄河中游、淮河太湖流域、珠江流域、辽河流域防护林体系建设等工程)建设服务。刊登范围包括农田防护林、水土保持林、草牧场防护林、防风固沙林以及平原绿化、治沙等方面的科技成果、试验研究、实用技术、生产经验、建议、讨论、综述、简讯等;刊登防护林体系建设成就,综合开发利用和多种效益等方面的文章;同时也刊登与防护林建设密不可分的种苗、造林、林木育种、速生丰产技术、病虫害防治等学科领域的各类稿件。以防护林地区各级领导干部、科技人员、林业院校师生和广大林业工作者为对象。

可在当地邮局订阅,邮发代号14-244,也可直接汇款至本刊编辑部订阅,地址:齐齐哈尔市富拉尔基区,电话:0452-6981581;传真:6981540