

99B × 海岛棉杂种2 代的 mtDNA RAPD 分析

朱美霞 孟庆福 王建树 (河北工程大学农学院, 河北邯郸056038)

摘要 [目的] 为 mtDNA RAPD 技术检测杂种后代的纯度的可行性提供参考, 为引物组合法广泛应用于植物纯度检测、遗传多样性分析提供依据。[方法] 应用6 对随机单引物和引物组合对99B 和海岛棉及其F₂ 代的 mtDNA 进行RAPD 扩增并进行多态性分析。[结果] 应用单引物对F₂ 代 mtDNA 进行RAPD 检测多态性分析, 从6 个单引物 RAPD PCR 扩增得到了3 个差异株, 结果表明该群体的纯度为95%, 应用引物组合扩增多态性分析表明, 从15 对引物 RAPD PCR 扩增检测到4 个差异株, 该群体的纯度为93%。表明引物组合扩增多态性分析具有准确性高、精确性好的优点, 也表明在植物种质纯度检测中引物组合法的优势及利用价值。[结论] mtDNA 的多态性检测具有很好应用价值和前景。

关键词 mtDNA; RAPD; 杂种二代; 纯度

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-07577-02

mtDNA-RAPD Analysis on Hybrid Second Generation of 99B × island Cotton

ZHU Mi-xia et al (Agronomy College of Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056038)

Abstract [Objective] The aim was to provide reference for the feasibility of detecting the purity of hybrid progenies by mtDNA RAPD technology and provide basis for the wide application of primer combination method in the plant purity detection and genetic diversity analysis. [Method] mtDNA of 99B, island cotton and their hybrid progeny F₂ was amplified by RAPD PCR using 6 random single primers and primer combination and then analyzed the polymorphism. [Result] The polymorphism analysis on the mtDNA of hybrid progeny F₂ through RAPD detection by using single primer showed that 3 different strains were obtained from 6 single primers after RAPD PCR amplification and the purity of the population was 95%. The polymorphism analysis using primer combination showed that 4 different strains were detected from 15 pairs of primers after RAPD PCR amplification and the purity of the population was 93%. The above result showed that the polymorphism analysis after amplification using primer combination had high accuracy and good veracity and it also showed that primer combination method had advantages and utilization value in the purity detection of plant germplasm. [Conclusion] The polymorphism detection had good utilization value and application prospect.

Key words mtDNA; RAPD; Hybrid second generation; Purity

线粒体是真核细胞能量产生转换的重要细胞器, 它具有自己的一套遗传控制系统, 同时又是受核基因组控制的半自主性细胞器。线粒体DNA 多为环形, 也有线形的。线粒体基因组结构简单、稳定, 植物线粒体基因组的长度为150~2 500 kb, 依种类不同而异。有些植物线粒体中还有小分子的类似质粒的环状DNA 和线状DNA。每个细胞中线粒体DNA 的拷贝数很高, 易于提纯及结构分析。一般动物细胞中平均有数百个, 植物细胞中线粒体的数量比动物细胞的要少。线粒体基因组遵循母系遗传的遗传方式, 1 个个体就能代表1 个母系集团, 只要少量材料就能反映群体的遗传结构, 便于进行群体分析。线粒体基因组进化速度快, 是单拷贝核基因的5~10 倍, 是进行群体遗传进化研究的良好材料。mtDNA 已经成为利用现代技术, 研究种群遗传学、进化遗传学、分类学及比较学的理想模型。笔者采用RAP-PCR 技术, 对99B × 海岛棉杂种2 代进行一致性分析, 以探讨 mtDNA RAPD 技术检测杂种后代的纯度的可行性。

1 材料与方

1.1 植物材料 99B、海岛棉, 随机取62 株99B × 海岛棉杂交2 代个体。

1.2 仪器 高速冷冻离心机, PTR-220 型PCR 仪, Image Master-VDS 凝胶成像系统, PE Lambda Bo40 型紫外可见光光度计, 冰箱。

1.3 引物 引物如表1 所示。

1.4 试剂

1.4.1 线粒体DNA 提取试剂。 0.500 ml/L Tris-HCl, 0.500

ml/L Sucrose, 0.005 ml/L EDTA·Na₂, 0.1% BSA, 0.005 ml/L - 巯基乙醇, 1.0%~2.0% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP, pH 值7.5), 0.050 ml/L Tris-HCl, 0.300 ml/L Sucrose, 0.010 ml/L MgCl₂; 1.0% PVP, 0.010 ml/L Tris-HCl, 0.600 ml/L Sucrose, 0.002 ml/L EDTA·Na₂ (pH 值7.5); 0.020 ml/L EDTA·Na₂, 0.050 ml/L Tris-HCl, 2.0% SDS (pH 值7.5), 20 ng/ml 蛋白酶K, 8.000 ml/L NH₄Ac, 平衡酚, 氯仿-异戊醇(24:1), 预冷无水乙醇, 70% 乙醇, TE 缓冲液。

表1 随机引物序列

Table 1 Random primer sequence

引物编号 No. of primer	引物序列 Primer sequence
SBS G02	GGCACTGAGG
SBS G05	CTGAGACGGA
SBS G12	CAGCTCACGA
SBS G17	ACGACCGACA
SBS H06	ACGCATCGCA
SBS H07	CTGCATCGTG

1.4.2 RAPD PCR 扩增、电泳试剂。 20~30 ng 模板DNA, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 μmol/L 引物, 1 U Taq DNA 聚合酶, 1 × PCR buffer (10.0 mmol/L Tris-HCl, pH 值8.3; 5.0 mmol/L KCl), 1 × TBE 缓冲液, 5 μl 溴酚蓝, EB, 1.0% 琼脂糖。

1.5 方法 线粒体基因组DNA 的提取参照甘娜等的方法^[1]; RAPD 扩增参照朱美霞等的方法^[2]; 电泳参照甘娜等的方法^[1]进行。

2 结果与分析

2.1 线粒体基因组DNA 的提取 mtDNA 样品用0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 所得条带在21.2 kb 处(图1)。经紫外分光光度计测定, A₂₆₀ 为0.468, A₂₈₀ 为0.263, A₂₆₀/A₂₈₀ 为1.779, 符

基金项目 河北省教育厅; 邯郸市科技局。

作者简介 朱美霞(1970-), 女, 河北武安人, 副教授, 从事分子植物育种的教学和研究。

收稿日期 2008-04-07

合 A_{260}/A_{280} 在 1.7 ~ 1.9 的经验比值, DNA 的纯度较高。

2.2 杂交亲本的 RAPD 多态性 以杂交群体的母本 99B 和父本海岛棉的 mtDNA 为模板, 通过 RAPD PCR 扩增、凝胶电泳, 从 SBS G01 ~ 20、SBS HD1 ~ 10 共 30 个随机引物中筛选出 SBS G12、SBS G05、SBS G17、SBS G02、SBS HD6 和 SBS HD7 共 6 条重复性好、稳定性强的多态性引物, 占能扩增出产物的引物的 20%。每一条引物可产生 1 ~ 7 条清晰的条带, 多态性条带 1 条以上, 每 1 个多态性条带记为 1 个等位基因。扩增获得的 DNA 的大小在 200 ~ 2 000 bp。

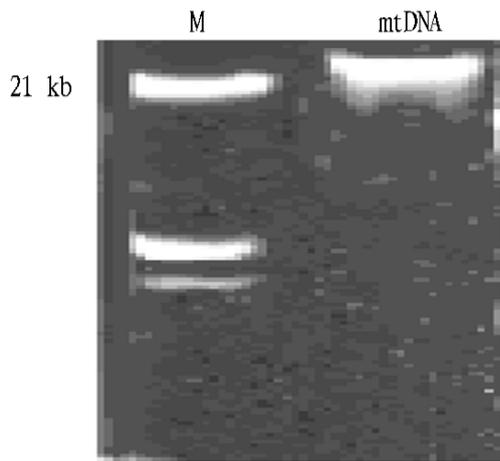


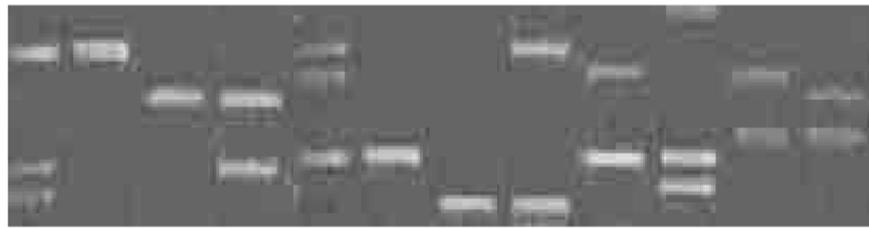
图1 99B × 海岛棉杂种2代 mtDNA 电泳图

Fig.1 mtDNA electrophoretogram hybrid F₂ of 99B × island cotton

2.3 99B × 海岛棉杂种2代 mtDNA 的 RAPD PCR 扩增多态性

2.3.1 单引物扩增多态性。 该研究分析了能稳定扩增的 6 个 RAPD 引物对双亲(图 2) 及 F₂ 代。结果表明, 6 个引物中有 SBS G12、SBS G02 共 2 个引物在 F₂ 群体的同一个体(F₂ 18) 中检测到差异, 引物 SBS G17、SBS HD7 分别在 F₂ 35 和 F₂ 47 个体检测到 1 个差异, 共检测到 3 个差异的植株。应用单引物对 F₂ 代 mtDNA 进行 RAPD 检测, 结果表明该群体的纯度为 95%。引物 SBS G12 的 RAPD 扩增见图 3 所示。

母本 父本 母本 父本 母本 父本 母本 父本 母本 父本 母本 父本



SBS G12 SBS G05 SBS G17 SBS G02 SBS HD6 SBS HD7

图2 多态性随机引物

Fig.2 Polymorphism random primer

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



图3 引物 SBS G12 的 RAPD 扩增

Fig.3 RAPD amplification of primer SBS G12

2.3.2 引物组合扩增多态性。 将 6 个 RAPD 引物两两组合形成 15 对引物, 进一步对该群体进行多态性分析。结果发现, SBS G12(SBS G02) 和 SBS G17 引物组合检出 F₂ 18 和 F₂ 35 2 个差异株, SBS G12(SBS G02) 和 SBS HD7 引物组合检出 F₂

18 和 F₂ 47 2 个差异株。此外, 引物对 SBS G05 和 SBS HD6 也从群体中检测到 1 个差异株 F₂ 48。60 个 F₂ 个体中有 4 个存在多态性。表明该群体的纯度为 93%。

3 结论与讨论

该研究的单引物扩增多态性分析表明, 6 个单引物扩增得到 3 个差异株, 该群体的杂异率为 5%; 引物组合扩增多态性分析表明, 15 对引物扩增检测到 4 个差异株, 该群体的杂异率为 7%。表明引物组合扩增多态性分析具有准确性高、精确性好的优点。此外, 王风格等^[3]、朱美霞等^[2] 的试验也证明了这一推断, 这为引物组合法广泛应用于植物纯度检测、遗传多样性分析提供了依据。

植物线粒体 DNA 的遗传方式为细胞质遗传。线粒体 DNA 的长度在 150 ~ 2 500 kb, 与核基因组相比要小得多; 且线粒体基因组拷贝数高、进化速率快^[4], 是单拷贝基因组的 5 ~ 10 倍^[5], 是群体遗传进化研究的良好材料, 尤其是在鉴定个别基因变异方面应用比较广泛。如 mt DNA 控制区的一段 poly C 结构是多种肿瘤的突变热点^[6-7]。mtDNA 中的 12S rDNA、16S rDNA 等 rRNA 基因, 控制区序列 D-loop、cytB 和 NA4 等基因常被选作分子标记^[8-9]。各种分子标记技术的发展和运用促进了 mtDNA 在物种起源和系统发生、种内遗传分化和遗传瓶颈效应等各方面的研究^[10-13]。甘娜等利用细胞质基因组对大花蕙兰 20 个不同品种的品种鉴定和遗传多样性进行了系统评价^[1]; 孟彦等对 10 个牛品种线粒体的 12S rRNA 基因多态性进行分析^[14], 充分证明了 mtDNA 多态性检测的应用价值和前景。

参考文献

- [1] 朱美霞, 李英芝, 王建树, 等. 利用 SSR 方法鉴定棉花品种纯度[J]. 安徽农业科学, 2005, 133(11): 2010, 2016.
- [2] 甘娜, 谭向红, 陈其兵, 等. 应用 RAPD 标记和细胞质基因组 PCR-RFLP 技术研究大花蕙兰的遗传多样性[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 349 - 355.
- [3] 王风格, 赵久然, 郭景伦, 等. 比较三种 DNA 指纹分析方法在玉米品种纯度及真伪鉴定中的应用[J]. 分子植物育种, 2003(1): 655 - 661.
- [4] BIANCHI NO, BIANCHI MS, RICHARDS S M. Mitochondrial genome instability in human cancers[J]. Mita Res, 2001, 488(1): 9 - 23.
- [5] 谢振宇, 杜继曾, 陈学群, 等. 线粒体控制区在鱼类种内遗传分化中的意义[J]. 遗传, 2006, 28(3): 362 - 368.
- [6] PARRELLA P, SERPE D, MATERA M G, et al. Mutations of the D810 mitochondrial noncoding repeat in primary tumors and cytological specimens[J]. Cancer Lett, 2003, 190(1): 73 - 77.
- [7] SANCHEZ CESPEDES M, PARRELLA P, NOMOTO S, et al. Identification of a noncoding repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7015 - 7019.
- [8] YU N, ZHENG C L, ZHANG Y P. Molecular systematics of Elks (Genus Ochotona) inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. Mol Phy Evol, 2000, 16(1): 85 - 95.
- [9] NAGATA J, MSUDAR, YOSHIDA MC. Nucleotide sequences of the Cytochrome b and the 12S rRNA genes in the Japanese Sika Deer[J]. J Mamm Soc Japan, 1995, 20(1): 1 - 8.
- [10] 魏彩虹. 动物 mtDNA 遗传研究进展及在育种上的应用[J]. 甘肃畜牧兽医, 1997(1): 23 - 25.
- [11] 肖武汉, 张亚平, 晔瑞光. 洱海四种鲤鱼线粒体 DNA 遗传相似性的初步研究[J]. 遗传, 2000, 24(1): 1 - 9.
- [12] 胡文革, 段子渊, 王金富, 等. 新疆 3 种雅罗鱼线粒体 DNA 控制区序列的差异和系统进化关系[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 970 - 975.
- [13] 朱松泉, 武云飞. 青海湖地区鱼类区系的研究 Q// 青海生物研究所. 青海湖地区的鱼类区系和青海湖裸鲤的生物学. 北京: 科学出版社, 1975: 9 - 24.
- [14] 孟彦, 许尚忠, 晔林森, 等. 10 个牛品种线粒体 12S rRNA 基因多态性分析[J]. 遗传, 2006, 28(4): 422 - 426.