

共显性 RAPD 标记的检测及应用

李春丽

郑康乐

(无锡轻工大学, 无锡 214036) (中国水稻研究所, 杭州 310006)

摘要 将 42 个 RAPD 标记应用于杂交稻组合的 F_2 群体的 108 个单株进行检测, 结果表明: 在 2 个座位分别有 2 对标记呈共显性分离。这种共显性的 RAPD 标记可以快速、准确地确定 F_2 代植株的基因型。

关键词 随机扩增多态性 DNA; 共显性; 杂交稻

分类号 Q753

0 前 言

近年来,随着水稻基因组和人类基因组研究的不断深入,分子标记技术发展迅猛。各种分子标记如 RFLP、RAPD 和 AFLP 相继出现。其中随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNAs, RAPD) 是 Williams 等在 1990 年创立的遗传标记^[1]。它是利用含有 10(或 9)个碱基的随机引物(单引物),通过聚合酶链式反应(PCR)对模板 DNA 进行随机扩增,通过对扩增的某一 DNA 片段的有无来比较不同基因组 DNA 的差异。目前, RAPD 已广泛地应用于植物遗传育种的各个领域^[7],主要有:品种或品系遗传纯度的测定,品种间或品系间遗传关系的测定;遗传图谱的构建与补充;在基因定位中的应用。RAPD 标记由于其样品用量少,灵敏度高,检测容易等具有 RFLP 所无法比拟的优点,因而比 RFLP 更易于应用^[2]。但 RAPD 的一个明显的不足就是显性标记,不能在分离群体中区别纯合显性和杂合显性个体,找到呈共显性的 RAPD 标记将有效地克服这一缺点。笔者以衍生于强优势杂交稻组合的 F_2 群体,找到了 2 对共显性的 RAPD 标记,从而克服了 RAPD 本身的不足,将分离群体中个体的基因型区分开。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以生产上广泛应用的杂交稻组合汕优 10 号的保持系珍汕 97B 和恢复系密阳 46 分别作母本 (P_1) 和父本 (P_2),配置组合,构建 F_2 群体。对亲本 P_1 和 P_2 , F_1 以及在 F_2 群体中随机选取 108 个个体进行 RAPD 分析。

1.2 试验方法

DNA 的提取参照卢扬江等的方法^[3]。RAPD 反应参照陆军等的方法^[4]。

2 实验结果

2.1 RAPD 标记检测亲本多态性、 F_1 的鉴定

用 400 个 10 碱基的随机引物扩增 2 个亲本——珍汕 97B 和密阳 46, 其中有 330 个引物扩增出清晰可辨的带型, 有 148 个引物的扩增产物在珍汕 97B 和密阳 46 间表现多态, 多态性高达 44.83%。有 33 个引物具有 2 条甚至 3 条多态性带。这些扩增反应所产生的带数为 2~11 条, 大小为 0.2~3 kb。

笔者共用了 32 个在亲本间表现多态性的引物检测 F_1 , 均证实了 F_1 为真杂种 (图 1)。这 32 个引物在 F_2 代的分离也证明该 F_1 为真杂种。



1 为母本珍汕 97B, 2 为父本密阳 46, 3 为 F_1 代。A~J 分别为引物 RP215, RP203, RP487, RP419, RP112, RP174, RP218, RP188, RP296, RP603。由于 RAPD 为显性分子标记, 所以 F_1 代的带型包括了父母本的所有条带。

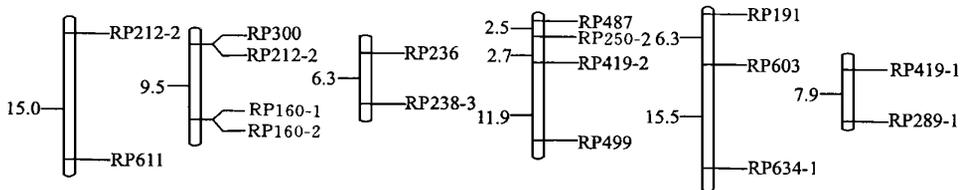
图 1 验证 F_1 为真杂种

2.2 RAPD 标记在 F_2 代分离规律的研究

选择 32 个多态性引物扩增出的 42 条清晰可辨的多态性带, 用来检测 F_2 植株的基因型。在这 32 个引物中, 其中 RP238 扩增出 3 条多态性带, 8 个引物扩增出两条多态性带。 χ^2 分析结果表明: 在这 42 个标记中, 40 个标记的分离比符合 3:1, 只有 1 个标记显著偏离这一比例, 1 个标记极显著地偏离这一分离比, 共占 4.76%, 说明这一群体适用于做遗传分析。

2.3 RAPD 标记的连锁情况

应用 Mapmaker Version 3.0 根据 RAPD 标记计算出这些标记间的连锁。设置最小 LOD 值为 3.0, 最大图距单位为 50.0 cM, 结果见图 2。



Unlinked= RP106, RP112, RP174, RP176, RP188, RP196, RP203, RP215, RP218-1, RP218-2, RP238-1, RP238-2, RP244, RP250-1, RP261, RP289-2, RP296, RP299, RP420-1, RP420-2, RP433, RP456, RP625, RP634-2, RP694

图 2 应用 Mapmaker Version 3.0 计算 RAPD 标记的连锁情况

2.4 共显性 RAPD 标记的检测

这 42 个标记中有 17 个标记被分成 6 个连锁群, 另外 25 个标记不与任何标记连锁, 这表明该 42 个标记代表了水稻基因组 31 个以上独立的座位。这 42 个标记中, 有 2 对标记呈

完全共分离 其中一对标记来源于同一引物 RP160(图 3),另一对标记来源于 RP212-2和 RP300(图 4),表明 RP212-2和 RP300 RP160-1和 RP160-2分别在同一座位或紧密连锁的不同座位上.利用这些呈共显性的标记可推导出 F₂ 植株的基因型(表 1和表 2).

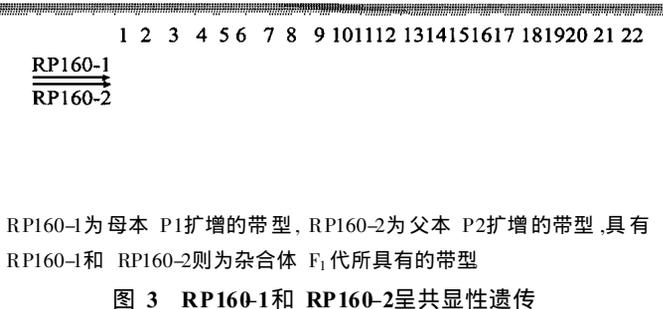


图 4 RP212-2和 RP300呈共显性遗传

表 1 RP160-1和 RP160-2的共分离

植株号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
RP160-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP160-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
基因型	P ₂	H	H	P ₂	H	P ₂	P ₁	P ₁	P ₁	H	H	H	H	H	P ₁	H	P ₁	P ₂	P ₁	P ₁	P ₂	P ₁

表 2 RP212-2和 RP300的共分离

植株号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
RP212-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
基因型	P ₁	H	P ₁	P ₂	P ₁	H	P ₂	H	H	P ₁	H	P ₂	H	H	P ₂	P ₂	P ₁

3 讨 论

1) RAPD引物在这 2个亲本间扩增的多态性片段的比例很高,为 45%,但并不是所有的检测到多态性的引物都可检测群体的。由于 RAPD所用的引物较一般的 PCR引物短,有时产生的多态性 DNA电泳图谱比较复杂,会给实验分析检测带来一定的困难。为了避免引起实验误差或错误,我们不使用这类引物。同样在扩增的多态性片段比较大(大于 1Kb时)或较弱时, RAPD的重复性差,在这种情况下不能区分出未扩增出是由于样品本身的差异还是扩增反应不稳定造成的,这样的引物也不适用于 F₂群体的检测

2) RAPD扩增片段的多少除与基因组的特性有关外,同时也受反应体系严谨程度的影响,游离的 Mg²⁺浓度的高低是重要因素之一。笔者采用游离 Mg²⁺浓度为 1.5 mmol/L的反应体系,平均每个引物扩增片段为 5.06条。因此使用严谨度较高的 RAPD反应体系,获取虽然量少但相对稳定可靠的多态性片段

3) 对 RAPD 标记的卡平方 (χ^2) 测验表明, 本研究中的 RAPD 标记绝大部分符合 3:1 的分离比率, 发生偏离的标记仅为 4.76%, 这一方面是由于所用的群体为籼稻×籼稻, 基因在 F_2 群体中分布较随机, 由配子选择所引起的基因异常分离较少。另一方面也缘于 RAPD 标记本身。通常 RFLP 只能检测基因组单拷贝序列的座位, 而在单拷贝序列中许多是基因序列, 它们在基因组中的分布是不随机的, 而 RAPD 不仅能扩增单拷贝序列, 而且能扩增基因组中的重复序列, 其检测的座位分布相对随机, 所以 RAPD 标记更能反映出基因组的一般特征, 较少地受选择的影响。

4) 笔者所用的群体在 32 个引物中发现了来自不同引物的一对标记呈共显性遗传, 而另一引物本身所扩增的即是共显性标记, 因此, 可通过筛选具有 2 条以上多态性带的共显性标记, 利用这种呈共显性的引物来克服 RAPD 本身的不足, 揭示更多的遗传信息。

参 考 文 献

- 1 Williams J G K, Anne R, Kubelik, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531~ 6535
- 2 Waugh R, Powell W. Using RAPD markers for crop improvement. *Tibtech*, 1992, 10: 186~ 191
- 3 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法. *中国水稻科学*, 1992, 6(1): 47~ 48
- 4 陆军, 钱惠荣. 利用 RAPD 技术检测水稻的基因组变化. *科学通报*, 1993, 38(23): 2181~ 2182
- 5 陈洪, 朱立煌. RAPD 标记构建水稻分子连锁图. *植物学报*, 1995, 37(9): 677~ 684
- 6 李春丽, 郑康乐. 应用 RAPD 标记检测与水稻株高和抽穗期有关的 QTLs. *遗传学报*, 1998, 25(1): 34~ 39
- 7 李春丽. 应用分子标记差异性预测作物杂种优势的研究进展. *遗传*, 1997, 19(1): 46~ 48

Detection and Application of Co-dominant RAPD Markers

Li Chunli

(Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Zheng Kangle

(Department of Biotechnology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

Abstract In the paper, the F_2 population was derived from the maintainer Zhenshan 97B and the restorer Miyang 46 of hybrid rice combination Shanyou 10 which is widely planted in Southern China. Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) was used to detect the polymorphisms among P_1 , P_2 , F_1 and F_2 . The polymorphisms between parents detected with RAPD was 44.9 percent. The segregations of 40 markers among the 42 surveyed were in accordance with 3:1 in the F_2 population. Two pairs of co-dominant RAPD markers were found, which were at the same locus or at tightly linked loci. The 17 markers among 42 were divided into six linkage groups, and the other 25 markers were unlinked with others.

Key words RAPD; co-dominant; hybrid rice

(责任编辑: 陈 娇)