

RAPD 标记在植物航天诱变育种研究中的应用

高永利, 郭亚华, 谢立波, 王 雪

(黑龙江省农业科学院 园艺分院 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘 要: 简述了 RAPD 分子标记的原理和特点, 并就分子标记技术在植物航天诱变育种研究中的应用进展及前景进行了阐述。

关键词: RAPD; 植物育种; 航天诱变

中图分类号: S 129 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)05-0108-03

随着科技的发展, 各类飞行器(卫星、飞船、空间站、航天飞机)的应运而生, 人类对宇宙空间的探索也在更加深入, 继而广阔的空间资源正在被逐渐开发和利用, 其中航天诱变育种已引起我国乃至世界作物育种家的关注。所谓航天诱变育种也称空间诱变育种, 是指利用返回式卫星、飞船、高空气球将农作物种子、组织、器官等搭载到宇宙空间, 利用太空特殊的环境条件(微重力、高真空、强辐射和弱磁场等), 使材料内部产生遗传性变异(基因突变或染色体畸变), 进而导致生物体性状发生遗传变异, 经地面种植筛选出新种质、新材料、从而培育新品种的农作物育种新技术。它是航天技术与农业遗传育种技术相结合的产物, 可以在较短的时间内创造出目前地面诱变育种方法难以获得的罕见的种质材料和基因资源, 为选育突破性新品种创造条件^[1-3]。

目前, 在航天育种方面只有俄罗斯、美国和中国进行了研究试验, 而中国航天育种数量占世界航天育种总和的 1/4, 育种水平处于国际先进水平, 取得了丰硕的成果。但对突变体的筛选工作起初多是从空间诱变的植物在形态学性状、细胞结构和染色体的变异及生理生化特性的改变等方面来进行的^[4-9]。虽然这些方法在品种改良方面起重要的作用, 但仅凭这些形态特征和经典遗传学研究中的遗传标记很难对突变体的生物遗传基础进行有效分析, 而近年来发展和日趋成熟的各种分子标记技术, 特别是 RAPD 标记可以直接对诱变材料 DNA 碱基序列进行分析和比较, 成为目前从分子水平上研究

植物空间诱变效应及其突变后代遗传变异性的主要手段。

1 分子标记种类及 RAPD 标记的原理和特点

1.1 分子标记种类

分子标记(Molecular markers)是继形态标记、细胞标记和生化标记之后近年迅速发展起来的一种以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的新型遗传标记, 是 DNA 水平遗传多态性的直接的反映。依其所用的分子生物学技术的不同大致可分为 2 大类: 一是以分子杂交技术为核心的分子标记, 如 RFLP 等; 二是以 PCR 技术为核心的分子标记, 如 RAPD, 简单重复序列(SSR), 特定序列扩增区域(SCAR)等, 将这 2 种技术结合起来进一步发展了扩增片段长度多态性(AFLP)标记等技术。

1.2 RAPD 标记的原理

RAPD 是随机扩增多态性 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA)的简称, 是 Williams 等于 1990 年采用的以 PCR 技术为基础, 不必预先知道 DNA 序列信息的检测核苷酸序列多态性的分子标记。其原理是采用合成的较短的单个随机引物(最常用 10 个碱基)DNA 进行非定点 PCR 扩增, 每 1 条扩增产物带即代表基因组上的 1 个位点, 每 1 个引物只能检测基因组特定区域 DNA 多态性, 但一系列引物可使检测区域扩大到整个基因组。因此, 扩增片段的多态性便反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。

1.3 RAPD 标记的特点

RAPD 标记虽然灵敏, 具有重复性和稳定性较差, 不能鉴别杂合子和纯合子(RAPD 为显性标记)等缺点, 但 RAPD 技术也具有自身的诸多优点。RAPD 标记引物价格便宜, 成本较低, 其通用性强, 只要合成一套随机引物, 可适用于任何物种, 又不需 DNA 探针, 设计引物也无须预先知道序列信息, 操作比较简便而且快速, 对模板 DNA 用量少且要求不严格, 同时不受环境、发育、数量性状遗传等的影响, 能够客观地展示材料间的 DNA

第一作者简介: 高永利(1973-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事生物技术与航天诱变育种研究工作。E-mail: gaoyongli1109@126.com。

基金项目: 国家“863”资助项目(2007AA100104); 航天育种工程资助项目(2006HT20012); 黑龙江省科技攻关资助项目(GB06B111-4); 黑龙江省自然科学基金资助项目(C200508); 黑龙江省农业科学院园艺分院青年基金资助项目(YYQN-7)。

收稿日期: 2008-12-04

差异。因而该技术一经问世,就受到生物学家的高度重视,在品种鉴定、分类研究、系谱分析、遗传图谱构建、突变体检测和基因定位等遗传育种领域得到广泛应用^[9]。

2 RAPD 分子标记技术在植物航天诱变育种中的应用

我国自 1987 年首次搭载以来,已成功地进行了 21 次农作物种子的搭载试验,共搭载了 70 多种植物或菌种共 1 000 多份材料,并获得了一批各具特色的优异突变体,并从中选育出了可供生产利用的优良新品种(系)^[7],随着研究的深入,利用分子标记(特别是 RAPD 标记)技术从分子水平对诱变突变体的遗传物质的改变的研究工作也取得了可喜的成果。

2.1 园艺作物

刘敏^[8]等对搭载后育成的甜椒“宇椒一号”(原 87-2)与地面对照进行了 RAPD 分子检测,结果表明,42 个随机引物中有 4 个引物在扩增产物上有差异。

郭亚华^[9]等对 1996 年搭载后的辣椒突变体 kL₉₆₅₄₁ 的 RAPD 测试结果,60 个引物中 OPX₁₀ 引物使得对比突变体多出 3 条带。

鹿金颖^[10]等对“神舟三号”飞船搭载的天水羊角椒和天水牛角椒诱变处理分别得到的“021-7-1”和“024-3-1”2 个突变系、对照和两者杂交育成的航椒 6 号进行了 RAPD 分析,从 40 个引物中筛选出 S13 和 S18 两个有差异引物,“024-3-1”与天水牛角椒相比有 7 条差异条带,“021-7-1”与天水羊角椒相比产生 1 条差异条带,航椒 6 号有父母本共有带和特有带,并且保持航天诱变产生的变异带。

刘敏^[11]等对由俄罗斯和平号空间站搭载 6 年的番茄种子进行了 RAPD 研究,所用的 40 个引物中有 9 个产生了共 29 条多态性条带,多态性百分率为 10.8%,且空间搭载的番茄之间的带型也不同,说明长时间空间飞行可引起番茄遗传物质 DNA 水平上的变异。

王斌等^[12]将获得的长莢形突变系和其原始对照品系进行了 RAPD 分析,在 100 个引物当中,有 3 个引物在突变系和原始品系之间扩增出了稳定的重复性好的多态性产物。

薛淮等^[13]用 40 个随机引物对空间处理和地面对照的月季试管苗基因组 DNA 进行 PCR 扩增,有 36 个引物扩增出了 DNA 片段,共扩增出 148 条带,5 个引物在地面对照和空间处理扩增出的 DNA 带型表现多态性,这表明卫星搭载的月季的遗传物质发生了变化。

2.2 大田作物

邢金鹏等^[14]运用 RAPD 方法对卫星搭载获得的“农垦 58”大粒型水稻突变系进行多态性分析发现,140 个引物,在扩增的 200 多条 DNA 片段中仅有 5 个片段显示了多态性,并找出了一个与大粒性状相关的特异片

段 OPA18-3,说明该突变系 DNA 结构确实发生了改变。

易继才^[15]对卫星搭载后选出的 6 个突变体和 2 个优良水稻品系,选用了 130 个 RAPD 引物和 17 对 AFLP 引物,分别对其基因组 DNA 进行多态性位点扫描分析,结果显示,不同突变体与对照之间存在不同程度的 DNA 多态性差异,从分子水平上证明了空间环境对植物种子的诱变作用。

Xu 等^[16]用 RAPD 对航天诱变后获得的突变体宇航 1 号和粳稻 10 号进行分析,认为两者的矮化基因由 *sd1* 基因控制,该变异由 DNA 上多位点突变产生。

刘福霞等^[17]对太空诱变玉米细胞核雄性不育基因进行了 RAPD 分析,在 152 个随机引物中筛选出 2 个差异引物与雄性不育基因相连锁,为以后开展玉米育种提供标记基因打下了基础。

龚振平等^[18]在对经空间搭载所获得的高粱诱变体进行 RAPD 研究,使用了 22 对随机引物,有 8 对引物在诱变体与对照间扩增出了明显的 RAPD 差异条带,其中 D 7 引物能使 3 个试材相互区别。

3 其它分子标记在植物空间诱变育种中的应用

除了 RAPD 标记、SSR 和 AFLP 标记在植物空间诱变育种研究中也有一定的应用。

杨存义等^[19]选用 121 对 SSR 引物,对经卫星搭载的水稻品种“秋光”获得的 7 个变异株系进行分子检测,33 对引物共检测出 96 个位基因,且 12 条染色体上都有表现多态性的微卫星标记,表明变异发生在整个基因组。王丰等^[20]对 10 个培矮 64S 的 SP3 变异株进行的 SSR 分析结果也表明了水稻经卫星搭载后 DNA 确实发生了变异。

周桂元等^[21]对空间诱变的 21 个突变花生植株进行了 SSR 多态性分析,5 对引物 PM 23、PM 41、PM 7 扩增的谱带中,部分株系比对照多 1 条带;引物 PM 53 扩增的谱带中,株系 1、2、8、9、11、21 与原种相比,缺失第一条谱带;引物 PM 127 扩增的谱带,株系 1~18 与对照相比,第一条主带位置低于对照,说明处理扩增片段长度较对照短,并推断株系 1~18 发生了碱基缺失变化。

洪彦彬等^[22]对经空间诱变处理的“丽江新团黑谷 LR8”SP2 代抗稻瘟病基因进行标记定位,结果将该基因定位于第 9 染色体上,且与微卫星标记 RM409 连锁。

霍建泰等^[23]对搭载的天水羊角椒和甘农线椒诱变处理后分别获得的第 4 代自交系 021-1-5、022-2-2 选 1 及地面对照和两者的杂交种航椒 3 号做了 AFLP 分析,结果得出:在 021-1-5 和天水羊角原种之间,64 对引物中 11 对引物扩增的 DNA 带型有差异。在 022-2-2 选 1 和甘农线椒原种之间,64 对引物中 16 对引物扩增的 DNA 带型有差异,航椒 3 号则保持了父母本的变异。

向跃武等^[24]利用 AFLP 分子标记的方法对水稻空

间诱变突变体及亲本进行基因组对比分析, 找出突变体多态性 DNA 片段, 经过一系列引物筛选, 找到了 5 条多态性 DNA 条带, 对开展突变体基因功能研究和水稻杂种优势利用有重要意义。

4 问题与展望

空间诱变育种以其变异幅度大、频率高、良性变异多(早熟、质优、抗病变异), 变异可很快稳定等优点成为培育生物新品种的有效途径, 特别是近年来我国航天事业的飞速发展, 为人类开拓利用空间资源提供了有力的保障, 使空间诱变育种具有更广阔的应用前景。将分子标记技术引入空间诱变领域, 从分子水平上对变异材料的遗传物质进行变异检测, 将有助于阐明空间条件对生物诱变的原因及作用机理, 也为品系选育工作提供了分子生物学水平的指导。植物育种的关键是将基因型选择与表型选择相结合, 从而提高选择的有效率, 而长期以来育种者是以表型选择为主, 对于遗传基础比较复杂的数量性状的选择有效性很低, 因此利用分子标记技术对空间诱变的物种进行变异检测, 将找到的分子标记与所选育的优良性状有效地连锁起来, 仍是在空间诱变育种中使用分子标记技术有待解决的问题。随着分子标记技术的不断发展以及各种生物基因组测序的完成, 分子标记辅助选育应用于空间育种的条件将日益成熟, 空间诱变育种的研究定会取得突破性进展。

参考文献

- [1] 密士军, 郝再彬. 航天诱变育种研究的新进展[J]. 黑龙江农业科学, 2002(4): 431-433.
- [2] 温贤芳, 张龙, 戴维序, 等. 天地结合开展我国空间诱变育种研究[J]. 核农学报, 2004, 18(4): 241-246.
- [3] 温贤芳, 张龙, 戴维序, 等. 我国空间诱变育种研究的进展[C]//空间诱变育种研究与开发进展—航天育种高层论坛论文选编. 福州, 2005: 7-14.
- [4] 贾建航, 王斌. 空间诱变育种研究进展[J]. 核农学报, 1999, 13(3): 187.
- [5] 杨致芬, 郭春绒. 空间诱变育种研究进展及其在辣椒中的应用[J]. 山西农业科学, 2008, 36(6): 21-25.
- [6] Atienzar F A, Verier P. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA(RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations[J].

Mutation Research, 2002, 521: 151-163.

- [7] 周秀艳, 金晓霞, 秦智伟, 等. 航天诱变育种及其在蔬菜中的应用[J]. 中国农学通报, 2008, 24(6): 291-295.
- [8] 刘敏, 李金国, 王亚林, 等. 卫星搭载的甜椒 87-2 过氧化酶同工酶检测和 RAPD 分子检测初报[J]. 核农学报, 1999, 13(5): 291-294.
- [9] 郭亚华, 谢立波, 王雪, 等. 辣椒空间诱变育种技术创新及新品种(品系)的选育[J]. 核农学报, 2004, 8(4): 205-208.
- [10] 鹿金颖, 韩新运, 梁芳, 等. 空间诱变育成辣椒新杂交种航 6 号及其 RAPD 分析[J]. 核农学报, 2008, 22(3): 265-270.
- [11] 鹿金颖, 刘敏. 俄罗斯和平号空间站搭载的番茄随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 航天医学与医学工程, 2005, 18(1): 72.
- [12] 王斌, 李金国, 邱芳, 等. 绿豆空间诱变育种及其分子生物学分析[J]. 空间科学学报, 1996, 16(增刊): 121-124.
- [13] 薛淮. 空间封闭系统对月季组培苗生物学特性的影响[D]. 北京: 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 2004: 20-32.
- [14] 邢金鹏, 陈受宜, 朱立煌, 等. 水稻种子经卫星搭载后大型型突变系的分子生物学分析[J]. 航天医学与医学工程, 1995(8): 109-112.
- [15] 易继才, 庄楚雄. 空间搭载诱导水稻种子突变的分子标记多态性分析[J]. 生物物理学报, 2002, 18(4): 478-483.
- [16] Xu J L, Lin Y Z. Rice mutant induced by space condition[J]. Acta Agricultural Zhejiang Gensis, 1999, 11(2): 63-66.
- [17] 刘福霞, 曹墨菊, 荣廷昭, 等. 太空诱变玉米细胞核雄性不育基因与 RAPD 标记的连锁分析[J]. 四川农业大学学报, 2005, 23(1): 19-23.
- [18] 龚振平, 刘自华, 刘根齐. 高粱空间诱变效应研究[J]. 农业科学技术, 2003, 19(6): 16.
- [19] 杨存义, 陈芳远, 王应祥, 等. 粳稻品种秋光空间诱变突变体的微卫星分析[J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1550.
- [20] 王丰, 李永辉, 柳武革, 等. 水稻不育系培矮 64S 的空间诱变效应及后代的 SSR 分析[J]. 核农学报, 2006, 20(6): 449-453.
- [21] 周桂元, 洪彦彬, 林坤耀, 等. 花生空间诱变及 SSR 标记遗传多态性分析[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(3): 238-241.
- [22] 洪彦彬, 杨祁云, 林佩珍, 等. 水稻空间诱变稻瘟病抗性变异研究及抗性变异基因的分子标记[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(4): 96-100.
- [23] 霍建泰, 张廷纲, 包文生, 等. 利用太空诱变、AFLP 技术及日光温室加代选育航椒 3 号辣椒一代杂种[J]. 干旱地区农业研究, 2007, 25(5): 85-88.
- [24] 向跃武, 郑家奎, 蔡平钟, 等. 航天诱变水稻突变体遗传变异分子标记[C]//空间诱变育种研究与开发进展—航天育种高层论坛论文选编. 福州, 2005: 36-40.

Study of The RAPD Molecular Markers and Their Applications in Plants Space Mutation

GAO Yong-li, GUO Ya-hua, XIE Li-bo, WANG Xue

(Horticultural Institute of Heilongjiang Academy of Agriculture Science, Harbin, Heilongjiang 150069, China)

Abstract: The principles and characteristics of RAPD techniques were described in this paper, and the key factors that affected the plants mutation in space mutation were discussed.

Key words: RAPD; Plant breeding; Space mutation