

DOI:10.11937/bfyy.201517021

宁夏羊角椒雄性不育基因 ISSR 的分子标记

颜秀娟¹, 何鑫², 王学梅¹, 高晶霞¹

(1. 宁夏农林科学院 种质资源研究所, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏森林病虫害防治检疫总站, 宁夏 银川 750001)

摘要:以宁夏羊角椒雄性不育系为试材,应用 ISSR 技术,对其不育系及其相应的可育系基因组 DNA 进行了比较分析,从 50 条随机引物中筛选了 35 条引物在两系之中都获得了 ISSR-PCR 扩增产物。结果表明:在不育系中获得 4 条稳定扩增的特异片段 ISSR-10₈₅₀、ISSR-13₈₅₀、ISSR-14₈₀₀ 和 ISSR-15₁₈₀,初步认定这可能是导致宁夏羊角椒雄性不育系花粉败育的不育基因相关的分子标记。

关键词:宁夏羊角椒;雄性不育;ISSR 标记

中图分类号:S 641.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0082-03

宁夏羊角椒雄性不育系是宁夏农林科学院种质资源研究所辣椒课题组田间发现的自然突变的不育系资源。经过多代的回交,已获得了稳定的两用系资源。该试验通过 ISSR 技术对其进行分子标记研究,进而对宁夏羊角椒雄性不育系与其可育系的基因差异进行初步研究。ISSR(Inter-simple sequence repeat)标记方法是近年来在微卫星技术上发展起来的一种新型分子标记技术^[1]。由于 ISSR 技术不仅可以快速、高效和灵敏地检测出基因组 DNA 的多态性,有很好的重复性,而且操作简单、成本较低,已被广泛地应用于动植物的基因定位和遗传多样性研究,以及种质资源鉴定方面的研究^[2-5]。该试验通过 ISSR 标记技术,筛选与宁夏羊角椒雄性不育基因连锁分子标记片段,以期在分子水平上进一步探索宁夏羊角椒雄性不育系的败育机制,同时为分子标记辅助育种选育奠定理论基础。

第一作者简介:颜秀娟(1981-),女,吉林长春人,硕士,助理研究员,研究方向为辣椒育种与栽培。E-mail:aixin0516@163.com

基金项目:宁夏农林科学院自主研发资助项目(NKYG14-14, NKYG-15-01)。

收稿日期:2015-04-24

1 材料与方法

1.1 试验材料

宁夏羊角椒雄性不育系及其可育系,由宁夏农林科学院种质所提供。引物及 PCR 扩增试剂购自上海捷瑞生物工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 参考改良 CTAB 法^[6]提取基因组 DNA,用 100 μ L 的 TEbuffer,加入 1/100 体积的 RNaseA(10 mg/mL),37℃温浴 30 min。用核酸蛋白检测仪检测 DNA 纯度与浓度,并将浓度稀释到 100 ng/ μ L,保存于-20℃用于后续试验。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增体系和扩增程序 ISSR 扩增体系(20 μ L)含有:10 \times Buffer 2 μ L,40~50 ng DNA 模板、引物 0.5 μ mol/L、dNTPs 200 μ mol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U。ISSR 的扩增程序如下:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,42℃退火 45 s(不同引物设定不同退火温度),72℃延伸 90 s,35 个循环;72℃延伸 10 min;4℃保存。

1.2.3 ISSR-PCR 扩增产物检测 采用分离和分析 DNA 常用的琼脂糖凝胶电泳的方法。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,用 DNA ladder Marker(100 bp)

Abstract: The tender leaves and single-bud stem segment of *Vaccinium bracteatum* Thunb. were used as the explants to study the effect of different factors on bud induction by comparing the function of different disinfection methods, material parts, the way of placement and hormone. The results showed that a combination way of 30 seconds with 75% alcohol and then 6 minutes with 0.1% mercuric chloride reached the best effect; the single-bud stem segment was more suitable than tender leaves as the explants; the single-bud stem segment transverse in the culture medium was better; the ZT had better induction effect than other hormones, and the concentration of 4 mg/L was the best.

Keywords: *Vaccinium bracteatum* Thunb.; initial culture; influencing factors

作为标准分子量对照,电泳缓冲液为 1×TAE,电泳结束后经 10 mg/mL EB 染色,使用 Alpha Innotech(Inc,USA)凝胶成像系统观察、照相、记录。

1.2.4 引物筛选 采用 50 条 ISSR 引物,筛选与宁夏羊角椒雄性不育基因紧密连锁的 ISSR 分子标记(表 1)。

表 1

试验所用 ISSR 引物

Table 1

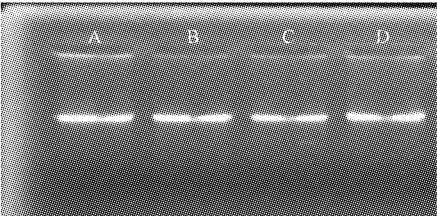
ISSR primer sequence used in present study

引物编号	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	引物编号	引物序列(5'-3')	退火温度/℃
ISSR-1	ATATATATATATATAT	20	ISSR-26	AGAGAGAGAGAGAGGYA	36
ISSR-2	ATATATATATATATATG	21	ISSR-27	TATATATATATATATART	18
ISSR-3	ATATATATATATATATC	21	ISSR-28	TATATATATATATATARC	20
ISSR-4	TATATATATATATATAA	19	ISSR-29	TATATATATATATATARG	21
ISSR-5	TATATATATATATATAC	20	ISSR-30	GAGAGAGAGAGAGAGYT	36
ISSR-6	TATATATATATATATAG	20	ISSR-31	GAGAGAGAGAGAGAGYC	39
ISSR-7	AGAGAGAGAGAGAGAGT	43	ISSR-32	GAGAGAGAGAGAGAGYG	39
ISSR-8	AGAGAGAGAGAGAGAGC	45	ISSR-33	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	36
ISSR-9	AGAGAGAGAGAGAGAGG	44	ISSR-34	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	39
ISSR-10	GAGAGAGAGAGAGAGAT	42	ISSR-35	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	39
ISSR-11	GAGAGAGAGAGAGAGAG	42	ISSR-36	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	56
ISSR-12	GAGAGAGAGAGAGAGAA	42	ISSR-37	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	59
ISSR-13	CTCTCTCTCTCTCTCTT	42	ISSR-38	AGT AGT AGT AGT AGT AGT	38
ISSR-14	CTCTCTCTCTCTCTCTA	40	ISSR-39	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	41
ISSR-15	CTCTCTCTCTCTCTCTG	43	ISSR-40	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	41
ISSR-16	CACACACACACACACAT	47	ISSR-41	TGCATGCATGCATGCA	49
ISSR-17	CACACACACACACACAA	47	ISSR-42	GGATGGATGGATGGA	41
ISSR-18	CACACACACACACACAG	48	ISSR-43	GATAGATAGATAGATA	27
ISSR-19	GTGTGTGTGTGTGTGTA	46	ISSR-44	GACAGACAGACAGACA	43
ISSR-20	GTGTGTGTGTGTGTGTC	48	ISSR-45	CCCTCCCTCCCTCCCT	51
ISSR-21	ATATATATATATATATYA	18	ISSR-46	CTAGCTAGCTAGCTAG	39
ISSR-22	ATATATATATATATATYC	20	ISSR-47	BHBGAGAGAGAGAGAGA	35
ISSR-23	ATATATATATATATATYG	21	ISSR-48	VDVCTCTCTCTCTCTCT	35
ISSR-24	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	36	ISSR-49	DVDTCCTCTCTCTCTCTC	35
ISSR-25	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	39	ISSR-50	BDBCACACACACACACA	35

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 质量检测

采用优化后的 CTAB 法提取的 DNA 不仅完整性好,而且点样孔干净,说明提取辣椒叶片基因组时,这种方法不仅能去除多糖还能去除其它严重干扰辣椒叶片基因组 DNA 提取的物质(图 1)。紫外分光度测量表明,DNA 纯度、质量浓度均符合 ISSR 标记对基因组 DNA 的要求,可以满足后续试验。



注:A 为可育系;B 为不育系。下同。

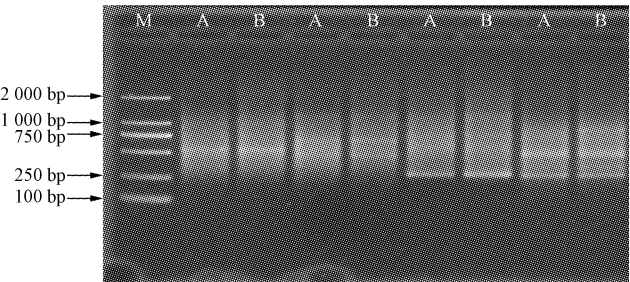
Note:A, maintainer; B, sterile line. The same below.

图 1 辣椒基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 DNA electrophoresis of pepper

2.2 不育系和保持系基因组 DNA 多态性 ISSR 引物筛选 该试验中共使用了 50 条 ISSR 引物对不育池和可

育池进行了扩增,其中 35 条引物在两系之间获得了扩增产物,扩增产物谱带数为 1~6 条,分子量范围在 150~1 800 bp。从结果可以看出,引物表现的遗传多样性主要有 3 种类型:一是条带位置的差异;二是条带数目的差异;三是条带强弱的差异。



注:M 为 Marker DL 2 000。下同。

Note:M is Marker DL 2 000. The same below.

图 2 ISSR 引物筛选扩增电泳图

Fig. 2 ISSR primers screening amplification electrophoresis

2.3 不育系和保持系基因组 DNA 的 ISSR 标记筛选 选用具有多态性的引物 ISSR-10、ISSR-13、ISSR-14 和 ISSR-15 对辣椒雄性不育系和可育系基因组 DNA 进行重复扩增,结果显示 4 条引物在宁夏羊角椒不育系池

和可育系池中均能扩增出条带,但在不育池中能扩增出一条碱基数大约依次为 850、850、800、180 bp 的清晰特异谱带,标记为 ISSR-10₈₅₀、ISSR-13₈₅₀、ISSR-14₈₀₀ 和 ISSR-15₁₈₀ (图 3),初步认定为这 4 个片段可能与 NYB 辣椒雄性不育基因连锁^[7]。

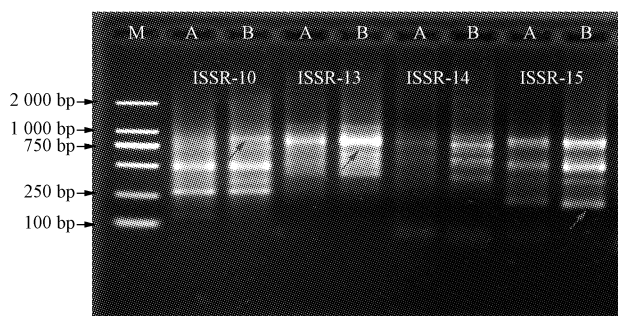


图 3 引物 ISSR-10、ISSR-13、ISSR-14 和 ISSR-15 扩增图谱

Fig. 3 ISSR primers-10-14 and ISSR, ISSR-13, ISSR and 15 amplification

3 讨论

近年来,应用 ISSR 标记进行基因定位受到许多学者关注。冒维维^[8]利用 ISSR 分子标记筛选菜薹雄性不育相关基因,研究结果表明,引物 UBC843 在不育系和可育系扩增出了特异片段,并进行回收克隆测序得到该片段大小为 462 bp。丁明忠等^[9]利用 ISSR 构建四川苎麻雄性不育分子标记体系,利用 ISSR 引物 U835 筛选到了 1 个雄性不育分子标记,并将其扩增产物克隆测序,结果表明该序列大小为 658 bp。根据该序列,此标记被转化成稳定的 SCAR 标记。吴小丽^[10]用 ISSR 方法筛选辣椒

与抗 CMV 基因连锁的分子标记,为辣椒抗 CMV 育种提供遗传学与分子生物学的理论依据。该研究在宁夏羊角椒雄性不育系与其可育系中找到 4 个很能与不育基因连锁 ISSR 标记,这 4 个差异基因片段很可能决定了宁夏羊角椒雄性不育系的花粉败育。试验结果为宁夏本地不育系品种的选育提供了有效的选择方法和理论依据。

参考文献

- [1] 谢佳燕,张知彬. ISSR 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用[J]. 兽类学报,2004,24(1):71-75.
- [2] 刘玲,李显日,王广华,等. 国内辣椒雄性不育育种及分子生物学研究进展[J]. 生物技术进展,2011,1(4):254-259.
- [3] 朱岩芳,祝水金,李永平,等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用[J]. 种子,2010,9(2):55-57.
- [4] 肖熙鸥,王勇,李冠男,等. 茄子种质资源的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 华南农业大学学报,2012,33(3):296-300.
- [5] RAI N K, SAHU P P, GUPTA S, et al. Identification and validation of an ISSR marker linked to tomato leaf curl New Delhi virus resistant gene in a core set of tomato accessions [J]. Vegetable Science, 2014, 40(1):1-6.
- [6] 桑维维,高贵珍,张兴桃,等. 辣椒基因组 DNA 两种提取方法的比较[J]. 宿州学院学报,2012,27(8):21-24.
- [7] 魏兵强,王兰兰,陈灵芝. 辣椒胞质雄性不育基因的分子标记[J]. 西北农业学报,2010,19(10):166-168,173.
- [8] 冒维维. 菜薹雄性不育和抽薹性分子标记筛选及定位研究[D]. 扬州:扬州大学,2008.
- [9] 丁明忠,潘光堂,张中华,等. 用 ISSR 分析四川苎麻品种(系)间的遗传关系及雄性不育分子标记的建立[J]. 核农学报,2008,22(2):183-187.
- [10] 吴小丽. 辣椒抗黄瓜花叶病毒(CMV)遗传分析及 ISSR 分子标记筛选[D]. 扬州:扬州大学,2007.

ISSR Marker of Male Sterility in Pepper of Ningxia

YAN Xiujuan¹, HE Xin², WANG Xuemei¹, GAO Jingxia¹

(1. Institute of Germplasm Resources, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. General Station of Forest Pest Management and Quarantine of Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750001)

Abstract: Taking male sterility of pepper in Ningxia as material, the comparative analysis of genomic DNA between male sterile line NYB and its maintainer were made by means of ISSR technique. 35 primers were amplified bands in two lines from 50 random primers among which the specific fragment ISSR-10₈₅₀, ISSR-13₈₅₀, ISSR-14₈₀₀ and ISSR-15₁₈₀ of NYB pepper was found. The results showed that ISSR-10₈₅₀, ISSR-13₈₅₀, ISSR-14₈₀₀ and ISSR-15₁₈₀ were likely linked with male sterile gene.

Keywords: pepper of Ningxia; male sterility; ISSR marker