

亚麻温敏雄性不育系的遗传、杂种优势和育性基因的 RAPD 标记研究

摘 要

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)新型温敏雄性不育系的创建和研究,对于亚麻杂种优势利用具有十分重要的意义。本研究以新型亚麻温敏雄性不育系 1S 为研究对象,结合常规育种和分子生物学研究和分析方法,重点开展了雄性不育的遗传、杂种优势和育性基因的 RAPD 分子标记研究,取得的主要结论如下:

1. 雄性不育的遗传

通过在自然条件下对不育系杂交后代 F_1 、 F_2 群体的育性鉴定,结果 F_1 代全部可育, F_2 代育性发生分离,出现雄性可育和雄性不育株,表明该不育系的不育性受隐性核基因控制;对 F_2 群体育性分离数据的 χ^2 测验表明,所有 F_2 调查群体育性分离均符合单基因遗传 3:1 的分离比,表明亚麻温敏雄性不育系的不育性受隐性单基因控制。

2. 杂种优势表现

通过对 6 个杂交组合 F_1 、 F_2 代主要农艺性状和产量性状杂种优势的测定和分析,结果表明:不同杂交组合 F_1 、 F_2 代在株高和工艺长度上的平均优势均表现为负向超父本优势,而各产量性状上的平均优势均表现出很强的正向超父本优势;但与 F_1 代相比, F_2 代平均优势明显下降。产量性状构成因素平均优势大小顺序为:单株产量>结实果数>千粒重>每果粒数。不同组合间 F_1 、 F_2 代杂种优势表现差异较大,其中 1S×黑亚 15 号组合产量性状的超父本优势最强, F_1 、 F_2 代均表现出很强的杂种优势。

3. 亚麻基因组 DNA 最佳 RAPD 反应体系及程序的建立

通过优化组合,建立了适合本实验的亚麻基因组 DNA 最佳 RAPD 反应体系,25 μ l 体系组成包括:1U Tag 酶、10×buffer(200mM Tris-HCl、100mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、100 mM KCl、1% Triton X-100、pH 8.8) 2.5 μ l、2mM Mg^{2+} 、150 μ M dNTPs、0.4 μ M random primer、30ng 模板 DNA。

优化反应程序为:94℃ 预变性 5min; 94℃、45s, 37℃、60s, 72℃、90s, 共 35 个循环;最后 72℃延伸 10min。

4. 育性基因的 RAPD 标记

通过分离群体分组分析法 (BSA), 利用 1S×Argus 杂交组合 F_2 分离群体所构建的可育基因池 (BF) 和不育基因池(BS)进行育性基因的 RAPD 标记筛选。经多次重复实验, 在所用的 240 条 10bp 随机引物中筛选出 1 条多态性引物 S1113, 其序列为: CACGGCACAA。S1113 在可育基因池中扩增出大小约为 450bp 的多态性 DNA 片段, 暂命名为 S1113₄₅₀, 与亚麻温敏雄性不育系可育基因连锁; 但与育性基因的连锁程度及应用价值如何, 还要通过 F_2 分离群体进一步进行分析和评价。

关键词: 亚麻; 温敏; 雄性不育; 遗传; 杂种优势; RAPD

Studies on Heredity、 Heterosis and RAPD Markers of Fertility

Gene for Thermo-sensitivity Male-sterile Line of Flax

Summary

A new thermo-sensitivity male-sterile line of Flax (*Linum usitatissimum* L.) were studied in this paper. With the research methods of traditional breeding and molecular biology, this work mainly focus on the analysis of heredity、 heterosis and RAPD Markers of fertility gene for the new thermo-sensitivity male-sterile line 1S of Flax. The main results in this paper are as follow:

1. Heredity of the thermo-sensitivity male-sterile line of Flax

The identification of male fertility for F_1 and F_2 generations from six cross combinations under the natural conditions showed that all of F_1 populations were male fertile and in F_2 populations , there were fertile plant individuals and sterile ones, which indicated that the sterility of thermo-sensitivity male-sterile line of Flax was controlled by recessive nucleus genes. Through chi-square tests, the segregation ratios of fertile plants to sterile ones in observed F_2 segregation populations were coincided with the ratio 3:1 that is the segregation ratio of recessive single gene in F_2 generations.

2. Heterosis of the thermo-sensitivity male-sterile line of Flax

The heterosis of main agronomic and yield characters of F_1 and F_2 generations respectively from six cross combinations was analyzed. As far as the average heterosis of different cross combinations was concerned, both F_1 and F_2 genarations expressed negative over male-parent heterosis in plant height and technical length traits, however, positive over male-parent heterosis existed obviously in yield traits, including fruits per plant、 seeds per fruit、 1000-seed weight and seeds yield per plant. Compared with F_1 generations , the average heterosis of F_2 generations was lower. The order of heterosis is seed yield per plant > fruits per plant > 1000-seed weight > seeds per fruit. The heterosis expression of F_1 and F_2 generations from different cross combinations was different. The heterosis of 1S × Heiya No.15 in yield traits was the largest among the six cross combinations not only in F_1 genarations but also in F_2 genarations.

3. The most optimal RAPD system of Flax DNA

The most optimal RAPD system for this research was set up. The RAPD reaction mixture was 25µl volume and contains 1U Tag DNA polymerase, 10× buffer (200mM Tris-HCl, 100mM(NH₄)₂SO₄, 100mM KCl, 1%Triton X-100, pH 8.8) 2.5µl, 2mM Mg²⁺, 150µM dNTPs, 0.4µM random primer and 30ng DNA template.

The PCR amplification was performed for 35 cycles after predenaturing at 94°C for 5min in Mycycler™32 Thermal cycler. Each cycle consisted of 94°C for 45s, 37°C for 60s and 72°C for 90s. The 35 cycles were followed by a final extension at 72°C for 10min.

4. RAPD molecular markers linked to fertility gene for the thermo-sensitivity male-sterile line of Flax

With bulked segregant analysis(BSA), bulked male-fertile DNA pool and bulked male-sterile DNA pool were used for RAPD analysis which were respectively consisted of 10 fertile plant individuals and 10 sterile plants from F₂ generations of 1S×Argus. PCR amplification was carried out with 240 10bp primers. After many experiments, The primer S1113(CACGGCACAA) was founded that produced polymorphism DNA fragment between two bulked DNA pools. The polymorphism amplification fragment (450bp) appeared in bulked male-sterile DNA pool and possibly linked to male-fertility gene for the thermo-sensitivity male-sterile line of Flax.

Key word: Flax(*Linum usitatissimum* L.); Thermo-sensitivity; male-sterility; Heredity; Heterosis; RAPD

目 录

1	1.1 文摘
2	1.2 英文文摘
3	2.1 一、引言
4	2.2 二、文献综述
5	2.3 三、材料与方法
6	2.4 四、结果与分析
7	2.5 五、结论与讨论
8	3.1 致 谢
9	3.2 参考文献
10	4.1 附 录：主要试剂及溶液(缓冲液)配制
11	4.2 作者简介
12	4.3 导师简介
13	4.4 独创性声明

一、引言

植物雄性不育是一种十分普遍而具有重要意义的生物学现象，广泛存在于植物界，是研究花粉败育，细胞质遗传和核质互作，植物起源和进化等问题的重要材料。特别在作物遗传改良中，雄性不育是杂种优势利用的一种十分有效的遗传工具。迄今为止，已经在水稻、小麦、玉米、油菜、棉花等重要农作物上发现了不同类型的雄性不育现象(刘忠松，2001)，国内外对其进行了广泛而深入的研究和报道，并已经应用于作物遗传改良中，取得了巨大的经济效益和社会效益。因此，对于植物雄性不育的研究具有十分重要的理论意义和应用价值。

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)是重要的油料和纤维作物，具有很高的营养、保健和经济价值，提高亚麻产量和品质意义重大。国内外研究表明，亚麻杂交种有25%-40%的杂种优势率(Kumar,1970; 陈炳东，1998)。因此，杂种优势利用是提高亚麻产量和品质的一条有效途径；而亚麻属于自花授粉作物，雄性不育是杂种优势利用的关键。

温敏型雄性不育是一种非常重要的不育类型，目前在多种作物上都已发现了这种不育类型并已经应用于作物杂种优势的利用，如水稻温敏显性核不育（李仕贵，1999）、温光型雄性不育小麦（何觉民，1992；谭昌华，1992）、高粱低温敏不育（李光林，1994）、谷子长日低温敏不育（赵志海，1996）等。亚麻温敏型雄性不育系是由甘肃农科院党占海研究员等（2002）利用抗生素诱导产生的新型亚麻雄性不育系，在亚麻上属首次发现。研究表明，该不育系的雄性不育性受外界温度变化的影响，在一定温度范围内，低温不育，高温育性恢复。这一新型亚麻雄性不育系的发现，将为亚麻杂种优势利用开辟新的途径，使亚麻“两系法”杂种优势利用成为可能，对亚麻育种和生产带来深远的影响。因此，对其进行广泛而深入的研究，十分必要。

本研究以具有重要研究和利用价值的亚麻温敏型雄性不育系为材料，结合常规育种和分子生物学的研究和分析方法，重点开展了雄性不育的遗传、杂种优势和育性基因的 RAPD 分子标记初步研究，旨在为其杂种优势利用、分子标记辅助选择育种、以及不育基因定位和克隆等工作奠定理论基础。

二、文献综述

1 植物雄性不育

1.1 雄性不育的概念

被子植物雄蕊原基分化形成之后到产生有功能的成熟花粉粒之前这一段时间，要经历一系列生理、生化、形态等方面的变化，如果这些变化中的任一过程受阻，雄性器官就不能正常发育，表现为雄蕊萎缩、畸形、消失或雄性器官雌性化，不能形成正常的小孢子或花粉，小孢子发生异常，花粉不能成熟或无萌发能力以及花药不开裂等多种形式，导致不能形成有生活力的花粉，这种现象叫做雄性不育。

植物雄性不育既是农作物利用杂种优势进行轮回选择和群体改良的重要工具，又是研究花粉发育、细胞质遗传和核质互作的重要材料。

1.2 雄性不育的研究简史

植物雄性不育及其机理的研究是随着生命科学的发展而发展的，这些发展历史大致可分为四个阶段。

第一个阶段：雄性不育现象的观察研究（1763-1908）

Camerarius（1694）发现高等植物具有雌雄性别后，Kolreuter（1763）观察到花药败育，他把这种花药败育叫做雄蕊萎缩（Contabescens）。这种萎缩的花药后来（Gartner, 1844; Herbert, 1847; Darwin, 1890）发现在石竹科(*Caryophyllaceae*)、杜鹃花科(*Ericaceae*)和百合科(*Liliaceae*)的一些植物中是经常出现的。但这个时期仅限于不同植物中雄性不育的观察，缺乏深入研究。

第二个阶段：雄性不育的遗传研究和分类（1908-1956）

1900年孟德尔遗传定律重新发现，1908年Bateson和Shull分别提出“遗传学（Genetic）”和“杂种优势（Heterosis）”两个概念。同年，Bateson等人对香豌豆雄性不育的研究表明，雄性不育不只是偶然的个别现象，而是一个遗传的性状，在香豌豆中雄性不育是由核中一个隐性基因控制的。Bateson等人的研究开创了雄性不育遗传研究的新时代。后来又相继发现细胞质雄性不育和核质互作雄性不育类型。至1947年，Sears将植物雄性不育分为核不育、质不育、核质互作不育三种类型，俗称“三型学说”。Edwardson（1956）提出纯粹的质不育在客观上是不

存在的，植物雄性不育只有核不育和核质互作不育二种类型，俗称“二型学说”。在这一时期，雄性不育研究方法是遗传学研究中常用的杂交、测交后代分析。Stephens (1937)、Jones 和 Emswedler (1937) 提出利用雄性不育配制杂种促进了雄性不育的研究。Kiharaca (1951) 通过异种核质置换开创了一条培养植物雄性不育的新途径。

第三个阶段：雄性不育机理的比较研究 (1954-1976)

这个时期各种生理生化方法和显微技术广泛应用于雄性败育过程和原因的研究，采用的策略是比较雄性不育株（系）之间的差别。Fulcasawa (1954) 对雄性不育小麦和玉米花药中游离氨基酸含量分析，Hosokawa (1954) 对甜菜雄性不育的细胞学研究是这方面的开创性研究。限制性内切酶发现之后，Levings 和 Pring (1976) 应用限制性内切酶分析了玉米 T 型细胞质雄性不育胞质和正常雄性可育胞质线粒体 DNA，发现不育胞质和可育胞质在酶切片段上的差异，开创了细胞学遗传组成的比较研究。比较研究能找到一些雄性不育机理的线索，但因为雄性不育和雄性可育间的差别并不一定与雄性育性有关，因而比较研究难以作出确切的结论。

第四个阶段：雄性不育机理的实验研究 (1977—)

这个阶段是在比较研究的基础上运用实验方法阐明不同基因生理生化过程、细胞和组织对雄性育性表达调控的作用。Belliard 等 (1977, 1978, 1979)、Carle 等 (1985) 对胞质杂种的细胞器遗传组成分析证明线粒体 DNA 是细胞质雄性不育因子载体的研究，Mariani 等 (1990, 1992) 创建的工程雄性不育——恢复系统，Arts 等 (1993) 雄性不育基因的分离、克隆和转化是这个阶段的开创性工作。

1.3 雄性不育的来源

1) 天然雄性不育

据 Kockett 和 Eslick (1969) 估算，在 Betze 大麦地里，709 株植物中有 1 株是部分不育的，3995 株中有 1 株是高度不育，大约 40 000 株中可以找到 1 株核雄性不育植株。因此，只要有足够的耐心，在每一种植物中都可能找到天然的雄性不育植株。许多有重要应用价值的雄性不育类型，如玉米 T-CMS (李竞雄等, 1998)、水稻 WA-CMS (袁隆平, 1977) 和光敏核不育 (石松明, 1985)、小麦太谷核不育 (高忠丽, 1998) 等都是天然雄性不育。

2) 自交

在异花授粉、常异花授粉植物的自交后代中，由于自交纯合容易分离产生不育类型，尤其是隐性核不育类型。

3) 品种间杂交

在自花授粉植物中由于杂交导致基因重组，在后代中可能出现雄性不育类型。由品种间杂交产生的雄性不育类型，已被广泛研究的有水稻 BT-CMS（新城长有，1975）、油菜 nap-CMS（Thompson, 1972; Shiga, 1976）、高粱 A₁CMS（Stephans and Hollands, 1954）等。

4) 种属间杂交

Kihara(1951)创造的种属间核质置换是培育 CMS 的重要途径，已在小麦、水稻、烟草、茄属、油菜和向日葵等作物的 CMS 系的培育上广泛应用，最有名的例子有小麦 T-CMS（Wilson, 1968）、K-CMS（Tsuenwaki, 1978）、V-CMS（杨天章等, 1980）和 D₂-CMS（Tsuenwaki, 1980; Mukai, 1993）、水稻 HL-CMS（朱英国, 1977）等。

5) 体细胞无性系变异

植物组织、细胞在培养条件下产生变异进而培育雄性不育类型已在水稻、小麦、玉米、高粱、向日葵等植物中有报道。如凌定侯（1990）从水稻幼穗、幼胚中培养再生植株中获得了 48 个雄性不育突变体。

6) 理化诱变

离子辐射、中子照射、烷化剂、链霉素等理化因素处理都能诱导植物雄性不育突变，这种突变可以是核基因突变，也可能是细胞质基因突变，但主要是隐性核基因突变。如 Sander 等（1999）从 EMS 处理拟南芥种子产生的 180 000 株 M₂ 植株中筛选鉴定出 855 个与育性有关的突变体，Grini 等（1999）用 EMS 处理也获得了类似的结果。

7) 转座子和 T-DNA 插入诱变

转座子或 T-DNA 插入到植物雄性育性基因后可引起基因功能丧失从而导致雄性不育。转座子主要在玉米中发现，因而其应用受到限制。T-DNA 插入突变应用较多，如 Sanders 等(1999)从 7 000T-DNA 插入突变系中筛选鉴定出 51 个与育性有关的突变体。

8) 基因工程

利用基因工程技术，用某一特定目的基因与花药或花粉特异表达的启动子或终止子构建嵌合基因导入到受体植物，由于目的基因的特异表达阻断花粉发育，而导致雄性不育。

1.4 雄性不育的类型

雄性不育是发育过程中环境调控一定基因表达的结果，即基因型与生境互作的结果。因此，雄性不育既有遗传因素占主要的遗传不育类型，又有生理因素占主要的生理不育类型，还有特定基因型在特定条件下才能表达的生境敏感型雄性不育类型。

1.4.1 可遗传的雄性不育

可遗传的雄性不育可能是纯粹的核基因突变所致，也可能是由雄性育性基因处在不利的细胞质条件下不能正常表达引起的，因此往往把可遗传的雄性不育类型又分为核不育（NMS）和细胞质-核互作不育（CMS）。

1.4.2 生理雄性不育

生理雄性不育是正常可育基因型植株雄性发育过程中遇到不利条件，如极端温度、光照不足、干旱、化学药物处理等引起的，这种雄性不育性随着不利条件的消失雄性育性恢复，不育性是不遗传的。

1.4.3 生境敏感型雄性不育

生境敏感型雄性不育是具有不育基因的植株在一定条件下雄性不育，而在适当的条件下恢复可育的不育类型，其不育性是可遗传的，是由特定的基因型决定的。生境敏感型雄性不育和雄性可育是相对的，在一定条件下两者可以发生转换。引起育性转换的因子包括自然环境如温度、光照及人工环境（如化学药剂）等，可通过这些因子对育性的影响改变植株生长发育的环境，调控雄性育性的表达，使得同一不育系在一种环境下雄性可育，进行不育系的繁殖；而在另一环境下雄性不育，进行杂交制种，实现一系两用。通常把这种雄性不育系叫做生境敏感雄性不育系。这种生境敏感雄性不育系，都对生境条件敏感，表现出部分可育或完全可育。如果育性恢复后能达到较高的自交结实率，这种不育系就能一系两用。

根据育性转换对光、温条件的要求，可将现有的光温敏雄性不育系分为：① 光

敏雄性不育系,光照长度是决定育性转换的主要因子,如水稻农垦 58s、粳稻光敏核不育系 93-926s、籼型核不育系 HN5S、D²型细胞质普通小麦代换系等为光敏核不育材料;② 温敏雄性不育系,其育性转换主要受温度的影响,如玉米琼 6Qms、核不育小麦 C49S 和 A3314、水稻衡农 S-2 和滇农 S-1、玻里马胞质大白菜雄性不育系 CMS341127;③ 光温互作雄性不育系,其育性的表达受温度和光周期互作影响,在一定的光温互作条件下表现育性转换。这类雄性不育系对环境反映比较复杂,如小麦 ES-3 和硬粒温光敏核不育小麦 DT94-1、籼型核不育系泸光 2 号。

1.5 雄性不育的遗传研究

1.5.1 孢子体不育与配子体不育

孢子体不育与配子体不育说明育性基因的表达时期,前者育性只与母体植株(孢子体)的基因型有关,而与花粉本身的基因型无关,后者相反,只与花粉(配子体)的基因型有关,而与母体植株的基因型无关。因此,两者的遗传效果不同。

1.5.2 显性不育与隐性不育

显性不育与隐性不育说明育性基因的作用状态。对于孢子体不育,显性不育在单基因控制情况下总是以杂合子形式存在,隐性不育总是以纯合状态存在。对于配子体不育类型,由于花粉育性取决于花粉本身的基因型,其育性基因显隐性不容易测定,须采用一些特殊的技术。

显性雄性不育基因表达具备以下特点(邓景杨等,1982):(1)正常条件下,不育株自交不结实;(2)与可育株杂交后代育性分离,不育株与可育株的比率为 1:1;(3)可育株自交后代育性不分离;(4)育性没有中间类型;(5)回交多代不能改变上述情况;(6)水稻不育株在幼穗分化期(颜龙安等,1989),经高温(>30℃)处理,自交可部分结实,F₁代育性分离比率为:不育株:可育株=3:1。

隐性雄性核不育基因表达具备以下特点(陈宏光等,1988;汤泽生等,1981):(1)可育株杂交后代育性不分离,全部可育;(2)杂合体自交,育性分离为:可育株:不育株=3:1;(3)不育株自交不结实。

1.5.2 育性基因数目

就一种植物而言,控制雄性育性的基因数目可能有几十个甚至上百个,但对于一种特定的雄性不育类型来说,控制雄性不育的基因数目一般可能是一二个。

估算某一雄性不育类型的核基因数目，可根据 F2 群体中的可育株和不育株的分离，按自花授粉作物纯合基因频率公式 $k = \frac{\log n - \log m}{\log \frac{1}{4}}$ （m 为 F2 群体总株数）进

行计算。但在实际工作中确定涉及的核育性基因数目并不这样简单，很多雄性不育类型如水稻 WA-CMS（博爱军，1998）、水稻光周期敏感核不育农垦 58S（孙宗秀，1993；凌定厚，1993；张能义，1996；张金水，1997）、玉米 C-CMS、高粱 A₁-CMS，不同的研究者，甚至同一研究者用不同的组合进行研究得到的结果并不相同，其原因可能有三方面：① 雄性不育受生境条件影响的发育性状，其遗传研究的各个世代材料除要种植在相同的环境下，还须注意环境条件对育性表达的适合性，生长环境不适合可能模糊可育与不育之间的界限（孙宗修等，1993；张鲁刚、柯桂兰，1994；Ikeguchi 等，1999；Tracy 等，1991），产生部分可育、部分不育的植株，使遗传分类困难；② 育性指标和不育与可育的划分标准问题（博爱军，1998；王学德、潘家驹，1997）。目前在各个作物上应用的育性指标有花药（雄蕊）形态、花粉可育率、田间自然结实率、套袋自交结实率等。需要指出的是，形态恢复不等于育性恢复，结实率受到授粉、受精以及受精后一系列因素的影响，育性指标以花粉可染率较为直接、可靠。不育与可育的划分存在一个“度”的问题，“度”不同结实可能完全不同；③ 核遗传背景问题（曹墨菊，1993；王波、刘正，1995；Tracy 等，1991）。对于 CMS 以定型“三系”材料为宜，对于 NMS 以同一起来源的材料为宜。因为核遗传背景差异可能造成育性恢复修饰基因如温度敏感基因、育性增强基因（王学德、潘家驹，1997）和微效恢复基因的差异。

2 分子标记技术及在作物遗传育种中的应用

2.1 遗传标记及发展

在动植物遗传育种中，遗传标记是与目标性状紧密连锁的可遗传的、易于识别的标识，是目的基因间接或直接的标记形式，是遗传育种中对目标基因进行鉴定、定位和选择的重要工具。人们可借助于遗传标记研究目标性状的遗传规律，进行动植物品种的改良和培育，以获得高产、优质、抗逆性强的优良品种。

人们应用遗传标记的历史悠久，如孟德尔遗传规律就是利用对豌豆的花色、子叶色泽、子粒色泽、子粒形状等性状的遗传研究而提出的。从遗传标记的发展历史来看，可分为形态标记(Morphological marker)、细胞学标记(Cytological

marker)、生化标记(Biochemical marker)和分子标记(Molecular marker) 4 种类型。

2.1.1 形态标记

形态标记(Morphological marker)即植物的外部形态特征,如芒长、穗长、粒色、穗形、株高、千粒重、雄性不育等特征,是一种特定的、肉眼可见的外部特征。从广义上讲,形态标记还包括色素、生理特性、生殖特性、抗病虫性等有关的标记。

形态标记简单、直观,长期以来作物种质资源鉴定及育种材料的选择通常都是根据形态标记来进行的。形态标记不但在遗传研究上具有重要应用价值,更重要的是它是一种目标性状的指示者,是指导育种选择工作的依据。因此,对形态标记材料收集、创造、保存、研究利用一直受到学者的重视。一般通过自然突变或物理、化学诱变方法来获得具有特定形态特征的遗传标记材料,并且可以通过不同标记基因材料间的相互杂交选择具有多个标记基因的材料。据不完全统计,豌豆、水稻、番茄中已鉴定出几百个形态学标记。例如在番茄上,已经发现形态标记材料 300 余种,其中苗期无花色素标记与抗烟草花叶病毒的 Tm-2 基因连锁,叶状腺的大小与抗桃霉病基因连锁。

由于形态标记是一种表型性状,不仅受控于遗传物质,还受环境影响,甚至环境的影响超过基因的作用。形态标记的数量在大多数作物中是有限的,而人为地通过诱变等途径培育形态标记材料不仅所需周期长,且一些形态标记多态性差,易受环境影响。还有一些形态标记对植株的表型影响太大,并与不良性状连锁,不利于在育种中的应用。因而,这些都限制了其在遗传和育种研究中的应用。

2.1.2 细胞学标记

细胞学标记(Cytological marker)指能明确显示遗传多态性的细胞学特征,如染色体结构特征、数量特征。W. S. Sutton 和 Boveri 总结前人的实验,把遗传学现象与染色体行为结合起来,创立了细胞遗传学。细胞遗传学研究发现,染色体数目的变化,如缺体、单体、三体,及结构的变化,如缺失、易位、倒位、重复等,常常引起某个(些)表型性状的变化。因此,染色体的变化可作为一种遗传标记。

细胞学标记虽可克服形态学标记的某些不足,但这类标记材料的产生需要大量人力和时间培育和选择,有些物种对染色体数目和结构变异反应敏感,或适应此种变异的能力较差,难以获得标记材料。

2.1.3 生化标记

生化标记(Biochemical marker)主要包括同工酶、种子贮藏蛋白标记。

70 年代初, 人们发现同工酶广泛存在, 它是一种结构和理化性质不同, 但催化功能一样的酶类。与其它蛋白质一样, 同工酶也是基因表达的产物, 所以酶谱的差异主要由决定酶本身的等位基因或非等位基因的差异造成的。同工酶呈共显性遗传, 杂合和纯合位点易于区别, 在分离群体能区分所有可能的基因型。作为中性变异, 同工酶不受人工和自然选择的淘汰, 因而可用于品种指纹分析。和大多数基因一样, 编码酶的基因可以通过适当的方式定位于染色体上, 并可以确定它们之间的连锁关系。对同工酶标记主效质量性状, Weeden 等发现豌豆的乙醇脱氢酶(Adh21)与抗 Enation Mosaic Virus 的 En 基因连锁, 重组值为 4%, 因此 Adh21 是 En 的理想标记。对同工酶标记 QTL, Stuber 证实了玉米中同工酶与产量连锁; Tanksley 发现番茄种子产量等与同工酶有连锁关系, 并确定了这些 QTL 所在的染色体。Keris 等发现小麦族内不同种的种子贮藏蛋白基因间存在大量的同源序列, 据此, Sabelli 等(1991)用来自小麦醇溶蛋白和低分子量谷蛋白基因的同源探针检测到经限制酶消化的小麦 DNA 杂交片段。尽管如此, 同工酶也仍因位点数量不够和基因表达具明显的组织特异性等而不能成为理想的遗传标记。

2.1.4 分子标记

分子标记(Molecular marker)是指生物基因组 DNA 经限制性内切酶酶切、聚合酶链式反应扩增(PCR)或两者结合等措施处理后电泳, 检测反映基因组某种变异特征的特异性 DNA 片断。

分子标记所揭示的多态性是直接反映基因组 DNA 间的差异, 与其它标记方法相比, 分子标记具有无比的优越性: ①它直接以 DNA 形式表现, 在植物体的各个组织、器官以及植物的各个发育时期均可检测到, 不受季节、环境的限制, 不存在表达与否的问题; ②数量极多, 遍及整个基因组; ③多态性高, 自然存在许多等位变异, 不需专门创造特殊的遗传材料; ④不影响目标性状的表达, 表现为中性, 与不良性状无必然的连锁; ⑤大部分表现为共显性(codominance), 能够鉴别出纯合基因型与杂合基因型, 能够提供完整的遗传信息。因此, 随着分子生物学的发展, 分子标记技术得到了越来越广泛的应用。

2.2 常见分子标记技术及原理

2.2.1 RFLP

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), 即限制性片段长度多态性, 是出现最早、目前应用最为广泛的一种 DNA 分子标记技术。其基本原理是将特定生物类型的基因组 DNA 经限制性内切酶消化后, 产生数百万条 DNA 片段, 通过琼脂糖电泳将这些片段按大小顺序分离开来, 然后将它们按原来的顺序和位置转移至易于操作的尼龙膜或硝酸纤维素膜上, 用放射性同位素 (如 p^{32}) 或非放射性物质 (如生物素、地高辛等) 标记的 DNA 作为探针, 与膜上的 DNA 进行杂交 (Southern 杂交), 若某一位置上的 DNA 酶切片段与探针序列相似, 或者说同源程度较高, 则标记好的探针就结合于这个位置上, 后经放射自显影或酶学检测, 即可显示出不同材料对该探针的限制性酶切片断多态性的情况。

RFLP 的产生主要是由于植物基因组 DNA 序列上的变化, 如碱基替换造成某种限制性内切酶 (restriction enzymes, RE) 酶切位点的增加或丧失, 以及内切酶酶切位点间 DNA 片段的插入、缺失或重复等。对每一个 DNA/RE 组合而言, 所产生的片段是特异性的, 它可作为某一 DNA 所特有的“指纹”。其优点是: 1) 无表型效应, 检测不受发育时期和环境条件的影响; 2) 共显性, 可以区别纯合基因型和杂合基因型, 提供的遗传信息完整; 3) 可利用的探针多, 可检测到很多遗传位点等。缺点是对 DNA 的质量要求高、需要量大, 操作复杂, 通常使用放射性同位素等。

2.2.2 RAPD

RAPD (Random Amplification Polymorphism DNA), 即随机扩增多态性 DNA, 该技术是 1990 年由 William 等人以 DNA 聚合酶链式反应为基础而发明的一种较为简便的检测 DNA 多态性的技术。RAPD 分析以一系列随机排列的寡聚核苷酸为引物 (通常为 10 个碱基), 以所研究基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离, 经 EB 染色或银染来检测扩增产物 DNA 片段的多态性。这些扩增产物的多态性反应了基因组相应区域的 DNA 多态性。

RAPD 的特点是: 1) 标记数量多, 可以覆盖基因组中所有位点; 2) 对 DNA 的质量要求不高、需求量少; 3) 所用引物没有物种特异性限制, 一套引物可以用

于不同生物基因组分析；4) 分析方便、快速，无需放射性同位素标记、Southern 转移等复杂的操作。其缺点是 RAPD 标记是显性的，不能区别生物个体是纯合型还是杂合型，提供的信息不完全；同时 RAPD 分析也保留了 PCR 反应的缺点，易产生非特异性带，重复性、稳定性差。

与 RAPD 技术原理相似的分了标记还有 DAF (DNA amplification fingerprinting, 即 DNA 扩增指纹技术) 与 AP-PCR (Arbitrarily Primer PCR, 即任意引物 PCR)。其不同点是 DAF 采用的引物比 RAPD 引物短，一般为 5-8 个核苷酸，因此在基因组 DNA 中存在更多的靶位点，可以扩增更多的谱带，检测多态性的能力更强。但由于 DAF 使用的引物更短，对反应条件更敏感，其稳定性更差。AP-PCR 采用的引物较长，一般为 18-24 个碱基对，与常规 PCR 反应条件一样，稳定性要比 RAPD 好，但多态性较 RAPD 更低。

2.2.3 SCAR

SCAR (Sequence Characterized Amplification Region) 标记是在 RAPD 技术的基础上发展起来的，由 Paran 和 Micheltore(1993)提出并应用。它是通过对多态性 RAPD 产物克隆测序，在此基础上推测出末端 14 个核苷酸，然后合成一个 24bp 的寡核苷酸引物，它包括原来 RAPD 分析所用 10bp 和 RAPD 标记末端的 14bp，然后利用此引物进行基因组扩增。该方法与 RAPD 相比，其优点是由于使用较长的引物和较高的退火温度，因此具有较高的稳定性；为共显性遗传，它比 RAPD 和其它利用随机引物的标记方法在基因定位和遗传作图中有更好的应用前景。

2.2.4 SSR

SSR (Simple Sequence Repeat)，即简单序列重复，是以 2-6 个核苷酸为基本单元简单串联重复而成的 DNA 序列，每个基本单元的重复次数一般 10-50 个，广泛分布于基因组的不同位置。由于基本单元重复次数的不同，从而形成 SSR 座位的多态性。SSR DNA 两端的序列多是相对保守的单拷贝序列，根据微卫星 DNA 两端的单拷贝序列设计一对特异引物，利用 PCR 技术，扩增每个位点的微卫星 DNA 序列，通过电泳分析核心序列的长度多态性。SSR 的特点是数量几乎无限，检测出多态性的频率极高；为共显性标记，可鉴别出杂合子和纯合子。但由于 SSR 技术需要对所研究物种的一系列微卫星位点进行克隆和测序分析，以便设计相应的引物，费时、费力、代价昂贵，没有足够的人力、物力和时间，是不可能实现的。

的，因而给它的利用带来了一定困难。

与 SSR 技术原理相似的标记还有 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat,), 亦称 ASSR (Anchored Simple Sequence Repeats), 与 SSR 相比, ISSR (ASSR) 所用引物不需要预先测序就能设计, 它通常由 1-4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成 (16-18 个碱基), 因此能够与基因组 DNA 中 SSR 的 5' 或 3' 端结合, 通过 PCR 反应扩增 SSR 之间的 DNA 片段。

2.2.5 AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms, 即扩增片段长度多态性), 它是由荷兰科学家 Zabeau 等 1993 年发明的一种 DNA 分子标记技术。AFLP 实际上是 RFLP 与 PCR 相结合的产物, 其基本原理是将基因组 DNA 进行限制性内切酶酶切, 然后选择特定的片段进行 PCR 扩增, 使用双链人工接头与基因组 DNA 的酶切片段相连接作为扩增反应的模板, 接头与接头相邻的酶切片段的几个碱基序列作为引物的结合位点, 引物由 3 部分组成: 1) 与人工接头互补的核心碱基序列; 2) 限制性内切酶识别序列; 3) 引物 3' 端的选择碱基序列 (1~10bp), 这样就只有那些两端序列能与选择碱基配对的限制性酶切片段被扩增, 再在高分辨力的测序凝胶上分开这些扩增产物。该技术的独特之处在于人工设计合成了限制性内切酶的通用接头, 以及可与接头序列配对的专用引物, 因此在不需事先知道 DNA 信息的前提下就可对酶切片段进行 PCR 扩增。AFLP 兼具 RFLP 和 RAPD 两种技术的优点, 既有 RFLP 的可靠性, 也有 RAPD 的灵敏性。它的最大优点是多态性高、重复性好, 是一种十分理想和有效的遗传标记。主要缺点是该技术是受专利保护, 实验成本高, 通常使用放射性同位素。

2.2.6 CAPS

CAPS (Cleaved Amplification Polymorphism Sequence, 即酶切扩增多态性序列), 又称为 PCR-RFLP, 实际上是 PCR 技术与 RFLP 技术结合的一种方法。CAPS 的基本原理是现利用已知位点的 DNA 序列资源 (基因数据库、基因组、cDNA 克隆、克隆的 RAPD 条带等) 设计一套特异性的 PCR 引物 (19~27bp), 然后用这些引物扩增该位点上的某一 DNA 片段, 接着用一种专一性的限制性内切酶切割扩增产物, 然后凝胶电泳分离酶切片段, 染色并进行 RFLP 分析。CAPS 标记揭示的是特异 PCR 片段的限制性长度多态性, 属共显性标记, 其优点是既避免了 RFLP 分析

中转膜这一步骤，又保持了 RFLP 分析的精确度。另外，由于很多限制性内切酶均可对扩增 DNA 进行酶切，所以检测到多态性的机会较大。

2.2.7 STS

STS (Sequence Tagged Sites, 即序列标签位点或简称序标位), 该技术是基于 RFLP 发展起来的一类 PCR 标记技术。Olson 等(1989)首先在人类基因组的物理图谱研究中使用 STS 技术。STS 技术的基本原理是通过对 RFLP 标记使用的 cDNA 克隆进行测序, 然后根据其序列设计一对引物, 利用这对引物对基因组 DNA 进行特异扩增。由于在 cDNA 中内部存在着插入、缺失等非表达区域, 从而使得与两引物配对的区域形成多个不同扩增子, 并表现出扩增片段的多态性。

2.2.8 SNP

研究 DNA 水平上多态性的方法较多, 其中最彻底、最精确的方法就是直接测定特定区域的核苷酸序列, 并将其与相关基因组中对应区域的核苷酸序列进行比较, 由此可以检测出单个核苷酸的差异。这种具有单核苷酸差异引起的遗传多态性特征的 DNA 区域可以作为一种 DNA 分子标记, 即单核苷酸多态性 (Single Nucleotide polymorphism, SNP), 被称为第三代 DNA 分子标记技术。SNP 在大多数基因组中存在的频率较高, 在人类基因组中, 平均每 1.3Kb 就有一个 SNP 存在。SNP 的数量丰富, 可以进行自动化检测, 因此具有广泛应用前景。

SNP 的检测要借助 DNA 芯片技术。DNA 芯片技术是分子生物学和微细加工技术相结合的产物, 这项技术实现了 DNA 的高通量、微型化和自动化。一块小小的芯片可固定几万、甚至几十万个不同的 DNA 探针, 通过完全自动化的设备对其进行分析, 可以快速、灵敏和平行地对大量的基因组进行同步检测。利用芯片技术进行 SNP 标记的筛选、鉴定已有成功的例子, 如人类基因组研究, 目前已有 2000 多个标记定位于人类染色体上, 在拟南芥上也已发展出 236 个 SNPs 标记。

2.3 分子标记在作物遗传育种中的应用

2.3.1 分子遗传图谱的构建

遗传图谱是将基因或标记绘制到具体的连锁群上, 并提供有关这些基因或标记的位点说明。遗传图谱是遗传研究的重要内容, 又是种质资源、遗传育种及基因克隆等许多应用研究的理论依据和基础。因此, 分子遗传图谱已成为当今生命

科学的重要研究领域。传统的形态标记、生化标记由于数目少，特殊遗传材料的培育及细胞学鉴定工作量大，因而除极少数作物(如玉米)外，大多数作物还没有一个较为完整的遗传连锁图，这极大地限制了作物遗传作图的理论研究和实际应用。随着各种分子标记技术的出现和发展，为构建作物高密度遗传图谱提供了重要手段。一些作物如玉米、水稻、马铃薯等的 RFLP 基因连锁图已经产生(Helentjaris,1987; Bonierbaleetal,1988; McCoughetal,1988)。

2.3.2 基因定位和克隆

基因定位就是寻找与目的基因紧密连锁的遗传标记并确定其在染色体上的位置。随着高密度遗传连锁图的建立，使目的基因的定位更为方便。迄今已将玉米、水稻和小麦等农作物的许多重要性状的基因定位在连锁图上，其中不仅包括作物的抗虫性、抗病性和雄性不育性等质量性状基因，还包括株高、生育期和产量等数量性状基因座(Quantitative Traitloci, QTL)。

利用高密度遗传图谱和物理图谱进行基因克隆的方法称为“图位克隆”，其过程为首先鉴定与目的基因紧密连锁的分子标记，然后用这些标记去筛选大片段 DNA 文库(YACs 或 BACs)，鉴定出与标记有关的克隆，继之以亚克隆和染色体步移或登陆获得含目的基因的克隆片段，最后通过转化和功能互补测验加以验证。近年来，运用基于图谱的克隆技术已分离到了大量的植物基因，Arondel 和 Giraudat (1992)较早报道利用图位克隆技术分离了拟南芥菜的 Omega23 脂肪酸脱氢酶基因 fad23 和脱落酸不敏感基因 ABI3；1993 年 Martin 等利用分子标记连锁图为导向克隆了第一个经典的基因对基因抗病基因——番茄抗青枯病基因 PTO。

2.3.3 遗传多样性分析

基因型不同的品种或不同亲缘关系的物种，基因组内核苷酸序列存在差异，利用分子标记可以检测出不同品种间的多态性，这些多态性反映了被检测材料的遗传多样性。江树业等以光敏核不育水稻农垦 58S 及其原始株农垦 58 核 DNA 为模板，进行 RAPD 和 ISSR 多态性分析，结果表明，在可扩增的 78 个 ISSR 引物中 7 个 ISSR 引物的扩增产物表现出 DNA 多态性。近年来，已有大量的研究报道应用分子标记技术检测作物(如水稻、玉米、小麦、大豆等)的多态性。利用分子标记通过相关性、聚类等数量遗传学分析手段，还可以对不同亲缘种间遗传距离，系统发育、亲缘关系等进行研究，从而确定亲本之间的遗传距离，并进而划分杂

交优势群，提高杂种优势潜力。

2.3.4 品种 DNA 指纹库的建立

同一物种的各个品种间存在着大量的多态性标记，如果某一品种具有区别于其他品种的独特标记，即一些特异性 DNA 片段的组合，就称为该品种的指纹。各品种独特的指纹片段构成该物种的 DNA 指纹库，它具有类似于人的指纹那样的高度个体特异性和稳定性。DNA 指纹在作物育种中具有广泛应用，通过检测品种是否具有该品种特有的指纹片段，可以有效地鉴定品种纯度与真伪，确定品种的亲缘关系，以及新品种登记和品种知识产权保护等。

2.3.5 杂种优势分析和预测

分子标记可以分析不同品种(系)之间的杂合性，可以根据分子标记位点的杂合性，预测各组合之间的杂种优势。前人对杂种优势提出了多种理论解释，其中显性假说和超显性假说被广大遗传育种工作者所接受。两种假说都认为双亲的遗传差异和 F_1 的高度杂合性是杂种优势产生的基础。因而能够检测作物基因组遗传差异的分子标记技术，为杂种优势的预测提供了强有力的工具。玉米研究中，Lee 等和 Smith 等发现，亲本间 RFLP 的遗传距离和杂种优势有着强烈的正相关性；Godshalk 等和 Dudley 等则观测到亲本间 RFLP 的遗传距离和 F_1 杂种产量的相关性很低。在作物杂种优势机理研究方面，程宁辉等以玉米亲本自交系与杂种一代为材料，应用 mRNA 差异显示法研究基因在亲本和杂种一代中表达水平的差别，发现在幼苗期相当一部分基因表达水平在亲本与 F_1 中保持不变，但许多基因表达方式在 F_1 中发生了改变。

2.3.6 分子标记辅助选择育种

长期以来植物育种都是依植株的表型性状进行选择，DNA 标记的出现使植物育种从表型选择过渡到分子育种的新阶段。分子标记辅助选择育种（Molecular Marker-assisted Selection, MAS）是通过分析与目标基因紧密连锁的分子标记的基因型来判断目标基因是否存在。这种间接的选择方法不受其它基因效应和环境因素的影响，因而结果较为可靠，同时可在早期进行选择，从而大大缩短育种周期。利用分子标记技术可以直接操纵植物的基因型，只要能找到与目标基因紧密连锁的分子标记，那么在杂交后代群体里就可以通过分子标记找到含有目标基因的个

体，把它选出来，就可以培育成一个新的品种。分子标记辅助选择主要适合于表型难以鉴定的性状，如植物的抗病性或根部性状。利用分子标记辅助选择能加速品种遗传改良的进程，极大提高育种效率。

2.4 目标基因分子标记的主要途径

2.4.1 近等基因系法(NIL)

近等基因系 (Nearly isogenic line, NIL)是由提供目标基因的供体亲本同轮回亲本杂交，后经多次回交，对目标性状基因多代选择而获得(Young 等，1998)。该系与轮回亲本之间除了目标基因及其附近基因组区域有差异外，它们的遗传背景基本相同，该系与轮回亲本就构成了一对近等基因系 (NILs)。因此，在 NIL 与轮回亲本之间存在多态性的分子标记就可能位于目标基因附近，与目标基因连锁 (Meuhlbauer 等，1988)。NIL 的培育需要很长时间，至少要回交 6 代以上，而且会导致一些重要基因的丢失，从而限制了其应用。

2.4.2 分离群体分组分析法(BAS)

分离群体分组分析法 (Bulked segregant analysis, BSA) (Michelmore 等，1991)是从近等基因系演化而来的，它克服了许多作物没有或难以创建 NIL 的限制，因而在分子标记研究中得到广泛的应用。该法是根据目标性状的表现型或基因型将分离群体 (F_2 、 BC_1F_1) 中的植株分成两组，在每组中选取一定数量的植株提取 DNA，然后将其 DNA 分别等量混合，形成两个 DNA 池 (bulks)，如雄性可育池和雄性不育池，这样构成的 DNA 池之间除在目标基因附近区域 DNA 组成上存在差异外，其它区域 DNA 组成相同。因此，在两池间表现出多态性的 DNA 片断，可能就与目标基因连锁。

3 亚麻雄性不育及杂种优势利用研究

3.1 亚麻概述

普通亚麻 (*L. usitatissimum* L) 是种植历史最悠久的栽培植物之一，按用途不同可分为油用亚麻、纤维用亚麻和油纤兼用型，其茎秆可以剥取高档纤维用于纺织，籽粒可以榨制富含高不饱和脂肪酸的营养保健植物油。关于栽培亚麻的起源尚无定论，大多数人认为亚麻起源于靠近印度的地中海东部地区，因为在这个地区曾发现过大量的亚麻变异种 (Harlan, 1975; Simmonds 1976; Zeven 和

Zhukovsky,1975), 亚麻显然是从那里开始向北部和西部传播的。中国亚麻栽培开始于西汉的汉武帝时期, 传说是张骞出使西域时由中亚带入的, 并以后在中国的西北、华北等地区大面积种植, 这些地区栽培的亚麻以油用为主。纤维用亚麻的栽培始于 1906 年, 由清政府奉天农业试验场从日本北海道引种, 东北三省试种得到成功, 并大面积推广种植。目前, 种植亚麻的国家主要有中国、俄罗斯、法国、阿根廷、加拿大、印度、美国等, 西欧的法国、荷兰、比利时等国的亚麻生产及科研水平处于国际领先地位。

3.2 亚麻的研究利用价值

近几年, 有关亚麻的研究日益增多, 特别是亚麻油的营养保健功能和工业用途受到人们的关注。亚麻油是一种优质食用油, 富含 α -亚麻酸, 具有促进人体智能、防止心脑血管硬化、抑制疾病的重要作用。亚麻籽中富含木酚素 (Ligans), 木酚素是一种植物激素, 能被消化肠道的细菌分解, 转化为潜在的激素物质, 具有抗癌作用; 研究表明, 食用富含木酚素的亚麻籽, 能够降低乳腺癌、结肠癌等的发病率。亚麻籽含有丰富的可溶性纤维素和不溶性纤维素, 尤其是可溶性纤维素具有降低胆固醇的疗效, 经常食用亚麻籽可降低便秘, 肥胖、心脏病等的发病率。此外对人的皮肤、头发等具有明显的保护作用, 对皮肤病的治疗也有一定的功效。亚麻油也是重要的工业原料, 广泛用于制造油漆、石墨、染料等工业产品。亚麻籽表皮含有 10% 的胶质, 其主要成分是多糖类物质 (80%) 和蛋白 (9%), 具有良好的保水、乳化、稳定和增稠功能, 可有效吸收紫外线, 对农药、重金属盐类具解毒作用, 是目前世界上少数几种天然植物胶之一。亚麻纤维的强度、韧性、耐水性能均优于绵、毛纤维, 因此被用来制造手套、鞋类、体育用品和编网等。因此, 亚麻在农业、医药、纺织、化工等领域都具有巨大的研究和市场开发潜力。

3.3 亚麻雄性不育及杂种优势利用研究

利用杂种优势是大幅度提高作物产量和品质的一条有效途径, 雄性不育是利用杂种优势主要方式之一, 尤其对于自花授粉作物, 雄性不育是利用杂种优势的关键。据 Kumar (1970) 报道亚麻杂交种有 25%-40% 的杂种优势率, 杂种优势非常明显。陈炳东等 (1998) 报道, 不同杂交组合的 F_1 超亲优势为 26.5%-109.4%, 平均优势 36.1%-129.4%, 表明亚麻产量具有很强的杂种优势, 并且产量杂种优势近似等于各产量因素杂种优势之和, 表现为单株果数显著增多、分枝较多、千粒

重提高。因此，利用雄性不育系配制杂交种，将是大幅度提高亚麻产量水平，改善农艺性状，改进品质，促进亚麻生产发展的重要途径。

对于亚麻杂种优势的利用和雄性不育研究已持续多年，自 1921 年 Bateson 和 Gardyner 就首次鉴定出亚麻细胞质雄性不育系，但是这个不育系的花瓣不能充分展开，异花受粉受到障碍，难以用于杂交种，因而未能用于杂交种的生产。此后，还有花瓣充分展开的亚麻细胞质雄性不育系的报道（Kumar 和 Singn, 1970; Thomsom, 1977），但在杂交种利用上，也未能取得成功。1975 年，陈鸿山等发现了具有明显的标记性状（种皮颜色和花色）的显性核不育亚麻，并开展了进一步研究，但未见有效利用杂种优势的报道。

三、材料与方法

1 植物材料及种植

亚麻温敏雄性不育系 1S，是由抗生素诱导产生的系列雄性不育突变株经定向选育而成，研究表明该不育系农艺性状良好，一定临界低温下雄性不育性的表现比较稳定。

本研究配制了 6 个杂交组合，杂交父本分别为陇亚 9 号、黑亚 15 号、Argus、低亚麻酸、坝亚 9 号、95005。其中，陇亚 9 号是 1S 的原始亲本，与 95009 均为甘肃农科院经作所选育的亚麻新品系；黑亚 15 号、Argus 为纤维用亚麻，Argus 与低亚麻酸均为国外引进品种，坝亚 9 号为河北省常规品种，这 6 个父本材料都有一定的代表性，以上材料均由甘肃农科院经作所胡麻课题组提供。

2004 年夏在兰州人工去雄杂交，获得 F_1 种子；部分 F_1 种子 2004 年冬在云南南繁加代，获得 F_2 种子；2005 年 3 月在甘肃农科院兰州试验基地同时播种父本、不育系 1S、 F_1 及 F_2 代。各材料均为 5 行区播种，行长 2m，每行 300 粒，田间管理按常规方式进行。

2 雄性不育的遗传分析

亚麻温敏雄性不育系雄性不育具有明显的形态标记，主要表现为花药形态、颜色的变异：不育株花药瘦小、淡黄色，花粉量很少；可育株花药饱满、蓝色，有大量花粉散出。

根据雄性不育和雄性可育的形态特征，于初花期开始逐天、逐株田间观察、鉴定亲本、 F_1 及 F_2 群体单株的育性，并对不育单株和可育单株分别标记，直到调查群体所有单株的育性全部标记为止；最后统计调查群体的不育株数和可育株数，对 F_2 育性分离数据进行 χ^2 测验和分析。

3 杂种优势测定

F_1 优势测定：成熟后，各杂交组合父本、 F_1 代材料每行分别随机选取 10 株（5 行区，即 5 次重复，总共 50 株，以下相同）考种，考察项目主要有株高(cm)、工艺长度(cm)、有效分枝数、结实果数、不实果数、每果粒数、千粒重(g)、单株产量(g)。

F₂ 优势测定：F₂ 群体由于育性分离，出现部分不育株，在开花之前即每行预先随机标记 10 株，成熟后考种，为分析其群体优势表现，考察项目同前。

杂种优势以超父本优势值（%）表示，计算公式如下：

$$\text{超父本优势 (\%)} = \frac{\text{F1值} - \text{父本品种值}}{\text{父本品种值}} \times 100$$

4 育性基因的 RAPD 标记

4.1 亚麻基因组 DNA 的提取、纯化及浓度检测

4.1.1 取样

在田间育性鉴定和统计分析的基础上，以 1S×Argus 组合 F₂ 分离群体作为亚麻温敏雄性不育系育性基因 RAPD 标记的建池材料，分别选取 F₂ 育性彻底的不育单株和可育单株各 20 株，取植株上部新鲜幼嫩叶片约 1g，装入保鲜袋，液氮冷冻，带回实验室-70℃冷冻保存，DNA 提取前一天转入-20℃冰箱。

4.1.2 提取方法

采用高盐、低 pH 值法提取亚麻基因组 DNA，步骤如下：

- 1) 取亚麻冷冻材料放入研钵，于液氮中迅速研磨成粉末状；
- 2) 将研磨好的材料转至 1.5ml 离心管中，加入预热（65℃）的提取缓冲液 1000μl，充分混匀，于 65℃水浴 30min，期间摇动数次；
- 3) 4℃、12000rpm 离心 10min，取上清液，加入 1/3 倍体积 5M KAc(pH 4.8)，充分混匀，冰浴 30min；
- 4) 4℃、12000rpm 离心 10min，取上清液，加入等体积氯仿/异戊醇（1：24），轻轻颠倒离心管数次混匀，静置片刻，4℃、12000rpm 离心 10min；
- 5) 取上清液，重复 4) 1-2 次，直到界面无白色沉淀为止；
- 6) 取上清液，加入 0.6 倍体积预冷的异丙醇，轻轻混匀，-20℃放置 20 min，4℃、10000rpm 离心 10min；
- 7) 弃上清液，将离心管倒置于吸水纸上，控干；用 70%乙醇洗沉淀 2 次，最后用无水乙醇脱水，于超净工作台上风干；
- 8) 每管加入 500 μl 灭菌的 TE（超纯水）溶解沉淀。

4.1.3 纯化

- 1) 在 DNA 溶液中，加入 2 μ l RNase，于 37℃ 水浴保温 1h；
- 2) 加入 等体积的氯仿/异戊醇(24: 1)，轻轻混匀，4℃、10000rpm 离心 10min；
- 3) 取上清液，重复步骤 2) 1-2 次；
- 4) 取上清液，加入 1/5 倍体积的 3mol/L NaAc，轻轻混匀，使 DNA 析出；4℃、10000rpm 离心 10min；
- 5) 弃上清液，将离心管倒置于吸水纸上，控干；用 70%乙醇洗沉淀 2 次，最后用无水乙醇脱水，于超净工作台上风干；
- 6) 用 70%乙醇洗涤沉淀数次，最后用无水乙醇脱水，吹干；
- 7) 每管加入 50 μ l 灭菌的 TE（超纯水）溶解 DNA，-4℃ 保存备用。

4.1.4 纯度及浓度测定

4.1.4.1 琼脂糖凝胶电泳检测

取 2 μ l DNA 样液，在 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。植物总 DNA 样品若呈现一条迁移率很小的整齐条带，表明所提样品较纯。如果在溴酚蓝前有弥散的荧光区出现，则表明样品中存有 RNA 杂质，若所提总 DNA 在琼脂糖凝胶上不能形成清晰的条带，而只是弥散一片，则表明 DNA 已严重降解。

4.1.4.2 紫外吸收法测定

1) 测定方法：

取 5 μ l DNA 样液，加超纯水至 1ml，混匀，置于石英比色杯中，以超纯水为空白对照，在紫外分光光度计下分别测量 260 nm、280nm 、230nm 的 OD 值，计算 OD_{260}/OD_{280} ， OD_{260}/OD_{230} 。

2) 纯度判定：

纯的 DNA 溶液其 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8， OD_{260}/OD_{230} 大于 2.0。 OD_{260}/OD_{280} 大于 1.9 时，表明有 RNA 污染，小于 1.6 时表明有蛋白质或酚污染； OD_{260}/OD_{230} 应小于 2.0 时，表明溶液中有残存的盐或小分子杂质，如核苷酸、氨基酸、酚等。

3) 浓度计算：

$$\text{DNA 样品浓度 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = OD_{260} \times N \times 50/1000$$

注：双链 DNA $OD_{260}=1.0$ 时溶液浓度为 50 μ g/ml，N 为稀释倍数。

4.2 PCR 试剂及引物配制

RAPD 反应试剂 Tag DNA 聚合酶 (2U/ μ l)、10 $\times$ buffer (200mM Tris-HCl、100mM(NH₄)₂SO₄、100mM KCl、1%Triton X-100、pH 8.8)、dNTPs (10mM) 均购自北京鼎国生物技术有限责任公司。10 碱基随机引物(0.2OD)购自上海生工生物工程技术有限公司, 共 240 条。

引物配制前先离心几分钟, 再轻轻打开管盖, 每管加 400 μ l ddH₂O, 盖上管盖, 上下充分震荡 5-10 分钟, 然后分装, -20℃保存备用。引物浓度计算如下:

$$\text{分子量} = 10 \times 324.5 (\text{每个脱氧核苷酸碱基近似分子量}) = 3245$$

$$\text{质量数} = 0.2\text{OD} \times 33\mu\text{g}/\text{OD} = 6.6\mu\text{g}$$

$$\text{摩尔数} = 6.6 / 3245 = 0.002\mu\text{mol}$$

$$\text{浓度} = 0.002\mu\text{mol}/400\mu\text{l} = 5\mu\text{M}$$

4.3 RAPD 反应体系及程序优化

25 μ l RAPD 反应体系组成包括: 模板 DNA、dNTPs、引物、Tag 酶, 10 $\times$ buffer、ddH₂O。对影响 RAPD 反应稳定性的主要因素模板 DNA、Tag 酶、dNTPs、引物, 进行浓度梯度实验逐一优化, 每次实验只改变其中一个因素, 其它条件保持不变, 确定最佳的反应体系。

RAPD 反应在韩国 Bioneer 公司生产的 Mycycler™32 Thermal cycler PCR 扩增仪上进行。RAPD 反应程序在 Williams(1990)的基础上, 并参照已有的文献报道, 根据扩增结果做一定的调整和改进。

4.4 育性基因的 RAPD 标记筛选

选取提取质量好的 1S $\times$ Argus 组合 F₂ 分离群体 10 个可育单株和 10 个不育单株的 DNA 分别等量混合, 构成可育基因池 (rf-bulk, BF) 和不育基因池 (ms-bulk, BS); 利用 240 条 10bp 随机引物, 对两基因池 DNA 进行育性基因的 RAPD 分子标记筛选。经多轮以上的引物淘汰筛选, 选择在两池间能稳定地扩增出差异性片段的引物作为育性基因的标记引物。

4.5 PCR 扩增产物的电泳检测

扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 电压为 3—4 伏/厘米, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE, 以 DL2000 作为 DNA 分子质量标准; 电泳结束后在凝胶扫描成像系统 (韩国产、型号为 STX-20.M) 照相记录。

四、结果与分析

1 雄性不育的遗传分析

1.1 F_1 、 F_2 群体的育性表现

根据亚麻温敏雄性不育系的育性特征，在开花初期较低的田间自然温度条件下观察鉴定不同组合 F_1 、 F_2 代群体的育性表现，结果不同组合 F_1 群体全部可育，而 F_2 群体育性发生分离，出现了雄性可育单株和雄性不育单株。这表明该雄性不育系的不育性受隐性核基因控制，是其原始亲本陇亚 9 号的隐性突变体。

表 1 F_2 育性分离的 χ^2 测验

Table. 1 The chi-square tests of F_2 segregation populations

组 合		观察株数	可育株数	不育株数	实际比	期望比	χ^2_c
1S×陇亚 9 号	1	153	117	36	3.25:1	3:1	0.1068*
	2	182	139	43	3.23:1	3:1	0.1172*
	3	204	152	52	2.92:1	3:1	0.0065*
1S×黑亚 15 号	1	177	142	35	4.06:1	3:1	2.3070*
	2	200	157	43	3.65:1	3:1	1.1267*
	3	158	129	29	4.45:1	3:1	3.3755*
1S×Argus	1	200	154	46	3.35:1	3:1	0.3267*
	2	156	126	30	4.20:1	3:1	2.4701*
	3	160	121	39	3.10:1	3:1	0.0083*
1S×低亚麻酸	1	161	129	32	4.03:1	3:1	1.9896*
	2	123	95	28	3.39:1	3:1	0.2195*
	3	126	104	22	4.73:1	3:1	3.4286*
1S×坝亚 9 号	1	221	177	44	4.02:1	3:1	2.7888*
	2	215	163	52	3.13:1	3:1	0.0388*
	3	213	163	50	3.26:1	3:1	0.1894*
1S×95005	1	223	176	47	3.74:1	3:1	1.6278*
	2	197	153	44	3.48:1	3:1	0.6108*
	3	238	189	49	3.86:1	3:1	2.2409*

注: $\chi^2_{0.05,1}=3.84$, * 表示 5% 的显著水平; Note: * shows significance at 5% level.

1.2 F₂群体的育性分离规律

对某一特定的雄性不育类型来说，控制雄性不育的基因数目一般为 1-2 个，上述研究表明该不育系的不育性受隐性核基因控制，其育性基因数目也应该为 1-2 个。从 F₂ 分离群体可育株和不育株的实际比例来看（见表 1），其不育性可能受隐性单基因控制，F₂ 育性分离应该符合单基因遗传 3：1 的分离规律。通过对 F₂ 群体分离数据的 χ^2 测验，所有调查群体育性分离即可育株和不育株的分离均符合隐性单基因遗传 3：1 的分离比（ χ^2 值均小于 $\chi^2_{0.05,1}=3.84$ ，见表 1），结果表明该亚麻温敏雄性不育受隐性单基因控制。

同时由表 1 F₂ 分离群体可育株：不育株的实际比例可以发现，多数调查群体可育株数均偏大于理论数，其原因可能主要为初花期部分单株育性已经恢复，造成单株育性鉴定和统计的误差。

2 杂种优势分析

2.1 F₁ 优势分析

表 2 F₁ 群体超父本优势值 (%)

Table.2 Over male-patent heterosis of F ₁ generations								
组 合	株高	工艺 长度	有效分 枝数	结实 果数	不实 果数	每果 粒数	千粒重	单株 产量
1S×陇亚 9 号	4.96	9.63	-20.41	8.56	-34.38	2.54	8.47	16.30
1S×黑亚 15 号	-3.01	-21.97	62.50	154.36	-96.55	58.83	29.55	408.33
1S×Argus	-11.70	-24.74	-7.50	36.21	-44.44	-21.31	20.00	17.39
1S×低亚麻酸	12.76	3.04	12.90	-14.29	-35.71	-19.09	20.45	-18.09
1S×坝亚 9 号	-1.77	-8.17	46.15	47.88	24.14	11.73	-1.56	61.86
1S×95005	3.19	-17.65	57.58	83.15	8.77	-11.65	-12.82	48.21
平 均	0.74	-9.97	25.20	52.65	-29.70	3.51	10.68	89.00

如表 2，F₁ 主要农艺性状和产量性状的杂种优势表现有所不同。从各组合的超父本平均优势来看，主要农艺性状株高基本没有优势，工艺长度表现为负优势，有效分枝数存在较大的正优势，这与单株果数的增加密切相关；而各产量性状则都表现了较大的正向超父本优势，其中单株产量的平均超父本优势值最大为 89%，

可见 F₁ 杂种优势主要表现为单株产量的增加；每果粒数的超父本优势值最小，基本没有杂种优势。产量构成因素的平均优势大小顺序为：单株产量>结实果数>千粒重>每果粒数。此外，杂种一代也表现为不实果数明显减少，平均降幅 29.70%，单株结实果数大幅增加。

不同杂交组合 F₁ 代在主要农艺性状株高和工艺长度上多表现为负向超父本优势，有效分枝数多表现为正向超父本优势，而在各产量性状的杂种优势表现上存在较大的差异。其中 1S×黑亚 15 号组合 F₁ 各产量性状构成因素的超父本优势值均显著高于其它组合，表现了很强的超父本杂种优势，其单株产量和结实果数的超父本优势值分别达 408%、154%。其它杂交组合之间在各产量性状构成因素的超父本杂种优势表现上互有优劣，1S×坝亚 9 号、1S×95005 两个组合 F₁ 在结实果数和单株产量方面的杂种优势较大，而千粒重则为负优势；1S×低亚麻酸组合 F₁ 除千粒重有较大的正向超父本优势外，其它产量性状均表现为负优势。

2.2 F₂ 优势分析

表 3 F₂ 群体超父本优势值 (%)

Table.3 Over male-patent heterosis of F₂ populations

组 合	株 高	工艺 长度	有效分 枝数	结实 果数	不实 果数	每果 粒数	千粒重	单株 产量
1S×陇亚 9 号	4.49	2.02	21.43	51.95	5.73	8.60	18.64	85.69
1S×黑亚 15 号	-6.19	-15.66	72.40	48.55	-27.01	36.88	28.98	152.78
1S×Argus	-12.81	-20.70	22.08	20.88	153.70	-21.14	31.11	22.71
1S×低亚麻酸	13.64	-8.53	88.17	39.01	190.48	-17.23	23.86	31.38
1S×坝亚 9 号	-8.81	-11.66	35.04	-5.08	60.34	13.67	2.73	7.22
1S×95005	5.14	23.15	25.25	-20.92	-35.09	-18.94	-8.01	-40.33
平 均	-0.76	-5.23	44.06	22.40	58.03	0.31	16.22	43.24

如表 3，F₂ 分离群体的杂种优势测定结果表明，F₂ 分离群体在主要农艺性状株高和工艺长度上与 F₁ 优势表现一样，基本表现为负优势，有效分枝数与 F₁ 相比具有更大的正向超父本优势；而在各产量性状方面仍表现了较高的正向超父本优势，但较 F₁ 在结实果数、每果粒数和单株产量上的平均优势明显下降，但千粒重的平均优势较 F₁ 有所提高（见图 1）。产量构成因素的平均优势大小顺序为：单株

产量>结实果数>千粒重>每果粒数，与F₁顺序一致。特别指出的是，F₂代在不实果数方面较F₁代明显增多（见图1），与父本材料相比，平均增幅达58%，其原因主要是随F₂代育性发生分离，出现部分不育株（约25%），结实率下降，不实果数大幅增加，这对F₂群体的整体优势表现存在负影响。

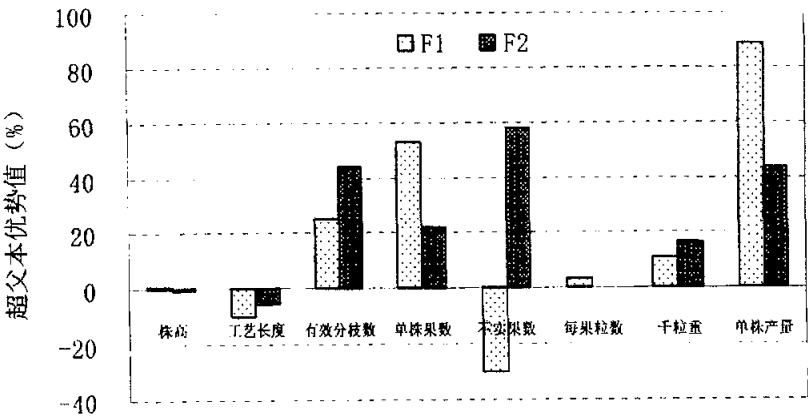


图1 F₁、F₂平均优势表现的比较

Fig.1 Average heterosis comparison between F₁ and F₂ populations

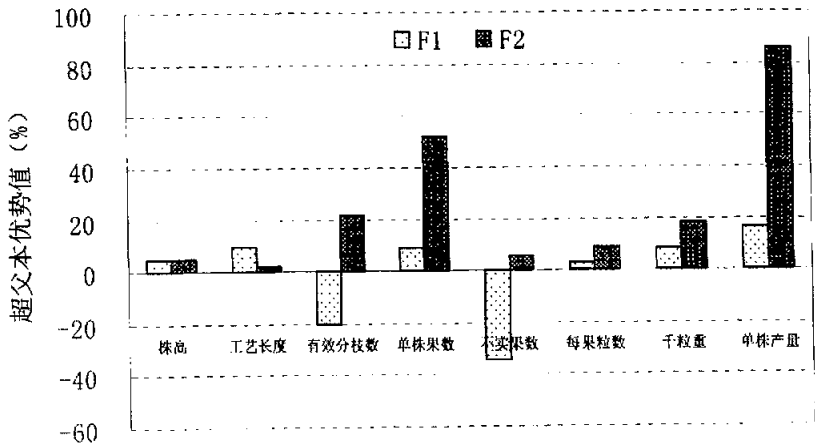


图2 1S×陇亚9号F₁、F₂优势表现的比较

Fig.2 Heterosis comparison of F₁ and F₂ populations of 1S×Longya NO.9

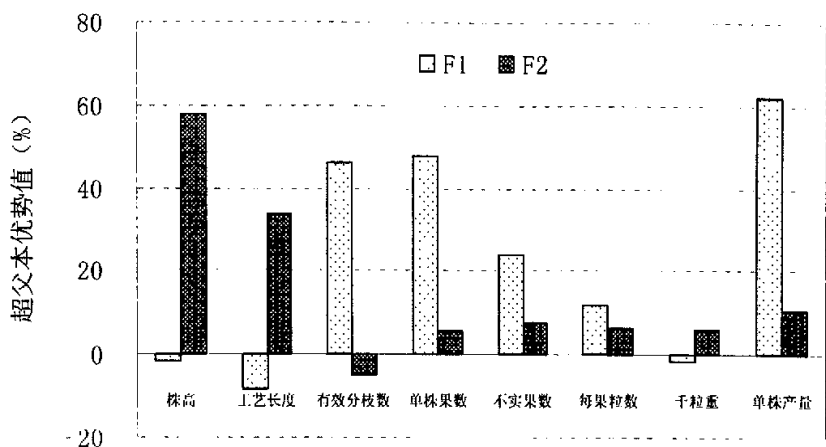


图3 1S×坝亚9号F₁、F₂优势表现的比较

Fig.3 Heterosis comparison of F₁ and F₂ populations of 1S×Baya NO.9

不同杂交组合 F₂ 代在杂种优势表现上也存在较大的差异，其中 1S×黑亚 15 号组合 F₂ 群体各产量性状的平均超父本优势在所有组合中仍很高，与 F₁ 强优势表现一致，但与 F₁ 优势表现相比，结实果数、每果粒数、单株产量的优势值明显下降，而千粒重的优势值变化不大；1S×陇亚 9 号组合 F₂ 代在有效分枝数和各产量性状的优势表现上均高于 F₁ 的优势值，其中单株产量的变化最为明显(见图 2)；1S×坝亚 9 号组合 F₁ 代在结实果数和单株产量上具有较高的正向超父本优势，而 F₂ 代在这两个性状上则表现为负优势（见图 3）。

上述结果表明：不同杂交组合 F₁、F₂ 代之间在主要农艺性状和产量性状的杂种优势表现上存在差异，部分组合 F₂ 代杂种优势较 F₁ 明显下降，如 1S×黑亚 15 号、1S×坝亚 9 号、1S×95005，部分组合 F₂ 代杂种优势较 F₁ 有所加强，如 1S×陇亚 9 号、1S×低亚麻酸。

3 育性基因的 RAPD 标记

3.1 亚麻基因组 DNA 的提取

本实验采用高盐、低 pH 值法提取亚麻基因组 DNA，经琼脂糖电泳检测（如图 4），其质量较好，蛋白质和 RNA 去除干净，纯度较高；经紫外分光光度计检测，单株 DNA 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 大多数都在 1.6—1.9 之间，OD₂₆₀/OD₂₃₀ 均大于 2，表明该方法提取的亚麻基因组 DNA 纯度高、质量好，可以用于 RAPD 分析。

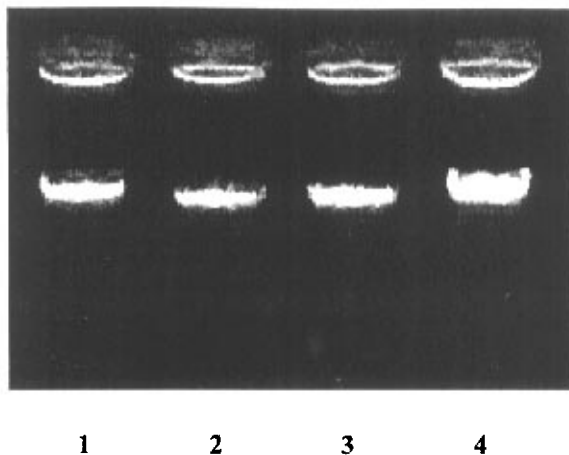


图 4 亚麻基因组 DNA 的电泳检测

1、2: 不育单株; 3、4: 可育单株

Fig. 4 Electrophoresis test for DNA of Flax

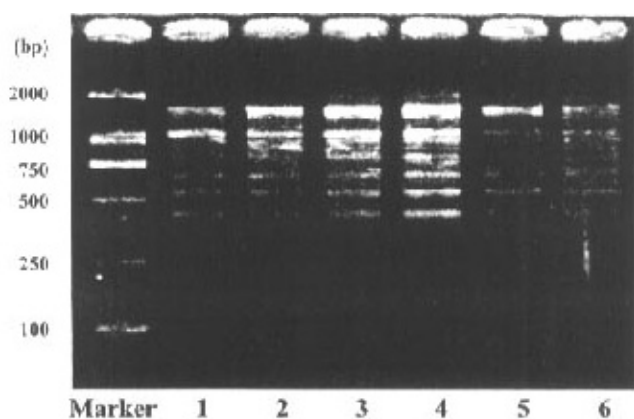
1、2: sterile individual plant; 3、4: fertile individual plant

3.2 RAPD 反应体系优化

RAPD 扩增对反应条件比较敏感, 其稳定性的影响因素很多, 前人对其稳定性进行了大量的研究和探讨。针对不同的实验材料和实验条件必需进行反应体系的优化组合, 以获得最佳的扩增结果。本研究对 RAPD 反应体系的每种成分设立浓度梯度实验, 确立适合本实验的最佳 RAPD 反应体系。

3.2.1 DNA 浓度对 RAPD 扩增结果的影响

模板 DNA 的质量和浓度是获得满意的 RAPD 扩增结果的前提。本研究将所提取的亚麻基因组 DNA 分别稀释 $\times 1$ 、 $\times 2$ 、 $\times 5$ 、 $\times 10$ 、 $\times 50$ 、 $\times 100$ 不等的稀释液, $25\mu\text{l}$ 反应体系中各浓度稀释液均加入 $1\mu\text{l}$, 设立 6 个模板 DNA 浓度梯度进行实验。结果表明, $\times 10$ 的 DNA 浓度 (约 30ng) 获得了较好的扩增结果, 浓度过大或过小均造成条带的缺失 (见图 5)。用不同的单株 DNA 进行 RAPD 扩增, 相同引物 $\times 10$ 的 DNA 稀释液扩增效果没有明显的差异, 而不同单株 DNA 浓度间存在差异, 说明 RAPD 反应对模板 DNA 的浓度要求范围较宽。实验时为节省操作步骤, 可不用准确测定 DNA 的浓度, 直接稀释不同的倍数进行浓度梯度实验, 寻求最佳的模板用量。

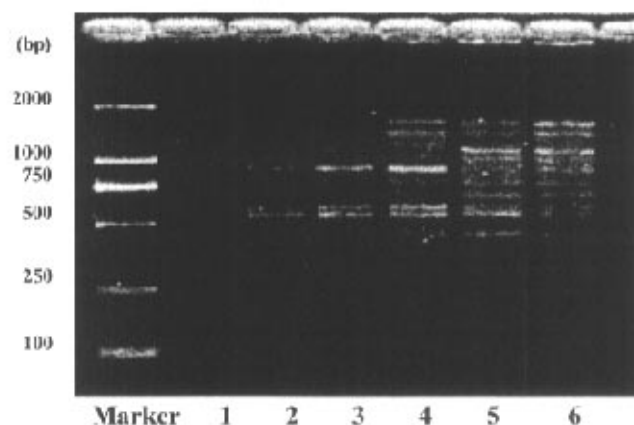


1: $\times 1$; 2: $\times 2$; 3: $\times 5$; 4: $\times 10$; 5: $\times 50$; 6: $\times 100$

图 5 模板浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 5 The effect of DNA concentration on RAPD amplification

3.2.2 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 扩增结果的影响



1: 0.0mM; 2: 0.5mM; 3: 1.0mM;

4: 1.5mM; 5: 2.0mM; 6: 2.5mM

图 6 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 6 The effect of Mg^{2+} concentration on RAPD amplification

Mg^{2+} 是 Tag 聚合酶的激活剂, Mg^{2+} 浓度过低, 酶活性较低, 不能进行有效的扩增; Mg^{2+} 浓度过高, 易产生大量的非特异性扩增, 因此 Mg^{2+} 浓度的高低对 RAPD 扩增的影响较大。本研究设立了 6 个 Mg^{2+} 浓度梯度, 其中 Mg^{2+} 浓度为 1.5mM 和

2 mM 的扩增效果较好, 低于 1.0Mm 不能获得完整的扩增条带; 而 2.5 mM Mg^{2+} 浓度条带出现模糊现象 (见图 6)。本文采用目前大多数研究文献所报道的 2 mM 的 Mg^{2+} 浓度。

3.2.3 Tag 酶浓度对 RAPD 扩增结果的影响

Tag 酶的质量对 RAPD 扩增的影响十分重要, 不同厂家生产的 Tag 酶在相同条件下的扩增结果都有差异。对比了几家公司的 Tag 酶对亚麻基因组 DNA 的 RAPD 扩增效果, 北京鼎国生物有限公司生产的 Tag 酶扩增结果较好。酶浓度梯度实验表明 (见图 7), RAPD 扩增对酶浓度的要求不严格。在实验的几个浓度梯度中, 每 25 μ l 反应体系加入酶量 1—2.5U 的扩增结果基本一样, 按照节省的原则, 本文采用 1U/25 μ l 的 Tag 酶用量进行 PCR 扩增。

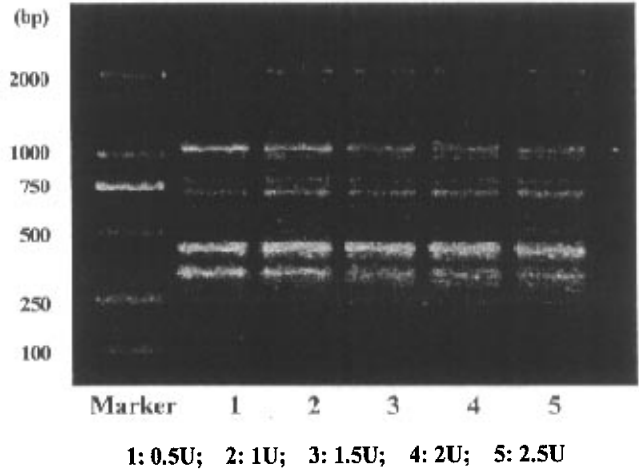


图 7 Tag 酶浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 7 The effect of Tag polymerase concentration on RAPD amplification

3.2.4 dNTP 浓度对 RAPD 扩增结果的影响

从已有的研究报道来看, dNTP 的 RAPD 反应浓度大都在 100—200 μ M 范围内, 本文主要设立了 50 μ M、100 μ M、150 μ M、200 μ M、250 μ M 共 5 个 dNTP 浓度梯度, 如图 8, 其中 100 μ M、150 μ M、200 μ M 获得了较好的扩增结果。如果 dNTP 浓度过低, 不能进行有效的扩增; 浓度过高 dNTP 易与 Mg^{2+} 结合, 使 Tag 酶的催化活性受到抑制, 影响 PCR 扩增反应, 条带减弱、减少。经重复实验, 本

文采用 150 μM 的 dNTP 反应浓度可获得稳定、理想的扩增结果。

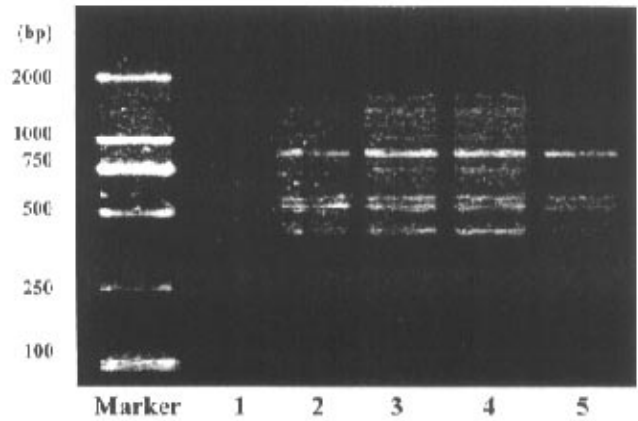
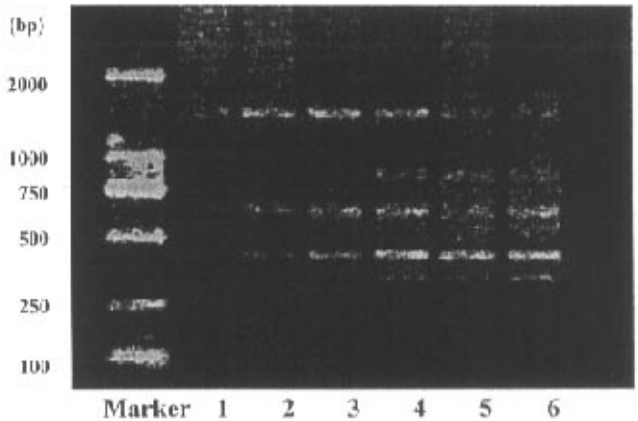


图 8 dNTP 浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 8 The effect of dNTP concentration on RAPD amplification

3.2.5 引物浓度对 RAPD 扩增结果的影响



1: 0.1 μM ; 2: 0.2 μM ; 3: 0.3 μM ;
4: 0.4 μM ; 5: 0.5 μM ; 6: 0.6 μM

图 9 引物浓度对 RAPD 扩增反应的影响

Fig. 9 The effect of primer concentration on RAPD amplification

与常规 PCR 扩增相比，RAPD 反应由于采用了较短的引物，PCR 扩增比较敏

感,对引物浓度的要求也相对严格。引物浓度过低,与模板 DNA 的结合几率减少,不能进行有效的扩增;引物浓度过高,容易造成碱基错配,产生非特异性扩增,同时容易形成引物二聚体而影响扩增。从浓度梯度实验结果看(见图 9),引物浓度从 0.1 μ M 到 0.4 μ M 递增,扩增条带逐渐增多、变强,0.4 μ M 到 0.6 μ M 扩增结果基本没有变化,而 0.4 μ M 效果最佳。

综上所述,对影响 RAPD 扩增结果的反应体系各因素进行浓度梯度实验逐一优化后,建立了适合本实验的亚麻基因组 DNA RAPD 反应最佳体系(25 μ l),组成包括:1U Tag 酶、10 $\times$ buffer (200mM Tris-HCl、100mM (NH₄)₂SO₄、100mM KCl、1%Triton X-100、pH 8.8)2.5 μ l、2mM Mg²⁺、150 μ M dNTPs、0.4 μ M random primer、30ng 模板 DNA。

3.3 RAPD 反应程序优化

大多数研究报道的 RAPD 反应程序都在 Williams (1990) 的程序基础上有所调整和改进,以寻求最佳的扩增结果和扩增效率。

首先,变性温度是 PCR 反应的关键,温度过低不能使模板 DNA 充分变性,温度过高、变性时间过长,会降低酶的活性,这都不能进行有效的扩增。目前,公认的变性温度都是 94 $^{\circ}$ C,变性时间在 30—60s,本文采用 94 $^{\circ}$ C、45s 的变性温度及时间,获得了理想的扩增结果。

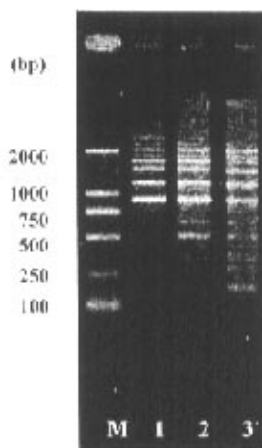


图 10 退火温度对 RAPD 扩增反应的影响

1: 39 $^{\circ}$ C; 2: 37 $^{\circ}$ C; 3: 35 $^{\circ}$ C

Fig. 10 The effect of annealing tempreature on RAPD amplification

退火温度和时间对 RAPD 扩增的影响较大，这主要由于 RAPD 所用的引物较短，退火温度比常规的 PCR 反应低，所以反应灵敏。退火温度过低，导致大量非特异性的扩增条带出现；退火温度过高，引物与模板结合的特异性又会增加，多态性降低。所以，适宜的退火温度是 RAPD 反应特异性的保证。大多数报道的 RAPD 反应复性温度都在 37℃ 左右，复性时间一般在 30—60s，多为 60s。作者主要设置了 35℃、37℃、39℃ 三个退火温度进行实验，扩增结果如图 10 所示：35℃ 退火温度扩增条带增多，电泳条带背景模糊；而 39℃ 特异性大大增强，条带清晰，但条带数明显减少；37℃ 扩增效果最好，因此本文采用了 37℃ 的退火温度。

延伸温度和时间一般为 72℃、1—2min，循环次数都在 35—45 个循环之间。本研究对 35、40、45 三个不同的循环次数进行了对比实验，其结果没有差异，为了节省时间，提高工作效率，采用 35 个 PCR 循环反应。

最后采用的 RAPD 优化反应程序为：94℃ 预变性 5min；94℃ 变性 45s、37℃ 复性 60s、72℃ 延伸 90s，共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 10min。

3.4 育性基因的 RAPD 标记筛选

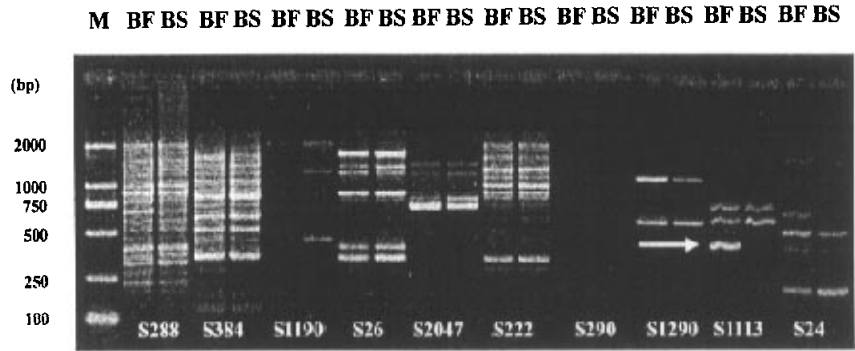


图 11 部分引物在两基因池间的扩增结果

BF: bulked fertile DNA; BS: bulked sterile DNA

Fig. 11 RAPD amplification with some of arbitrary primers between bulked fertile DNA and bulked sterile DNA

本研究采用分离群体分组分析法 (BSA)，对由 1S×Argus 杂交组合 F₂ 分离群体可育株和不育株基因组 DNA 组成的可育基因池和不育基因池进行育性基因的 RAPD 标记筛选。每个引物经过两次以上重复的初步 PCR 扩增筛选，在所选用的 240 条 10bp 随机引物中有 211 条引物能够在两基因池中扩增出 RAPD 条带，占所用引物的 88.7%，说明亚麻基因组 DNA 上存在这些引物的结合位点。每条引物的扩增条带数少则 1 条，多则 14 条，平均每条引物扩增出 5.2 条带。在两基因池中有扩增产物的 211 条随机引物中，大部分引物在不育基因池和可育基因池之间的扩增条带完全相同，或差异只是条带强弱的不同，如图 11，由于 RAPD 标记为显性标记，在同一电泳迁移位置的差异性只表现为条带的有无，因此条带的强弱一般并不作为一种多态性标记。

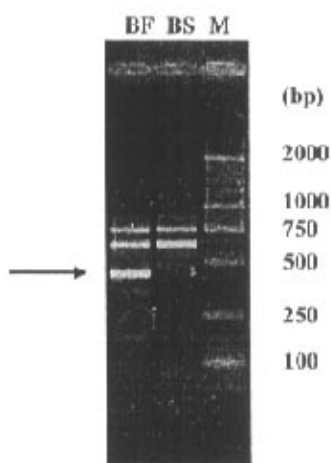


图 12 随机引物 S1113 在两基因池间的特异性扩增

BF: bulked fertile DNA; BS: bulked sterile DNA

Fig. 12 RAPD differential amplification with the arbitrary primer S1113 between bulked fertile DNA and bulked sterile DNA

经过三轮以上的引物淘汰筛选，最终筛选到一条多态性引物 S1113，引物序列为：CACGGCACAA。该随机引物在可育基因池和不育基因池之间能够稳定的扩增出多态性 DNA 片段，如图 11、12 箭头所示，扩增出的多态性 DNA 片段位于

可育基因池中，其片断大小约为 450bp，暂命名为 S1113₄₅₀，该多态性 DNA 片断可能与亚麻温敏雄性不育系可育基因连锁，可能作为亚麻温敏雄性不育系育性基因的 RAPD 分子标记，但与育性基因的连锁程度还需做进一步的分析。

五、结论与讨论

1 雄性不育的遗传

通过对亚麻温敏雄性不育系 1S 的 6 个杂交组合后代 F_1 、 F_2 群体的田间育性鉴定表明，该不育系的雄性不育性受隐性核基因控制， F_1 代全部可育， F_2 代育性分离，出现雄性可育株和雄性不育株。对 F_2 群体育性分离数据的统计和 χ^2 测验分析表明，所有组合调查群体 F_2 代育性分离均符合 3:1 的分离比例，表明该亚麻温敏雄性不育系的不育性受隐性单基因控制。

需要指出的是，对育性分离数据的统计发现， F_2 代分离群体可育株的实际比例多偏高于理论值，其原因作者认为可能为材料育性鉴定和统计的误差所致。

首先，亚麻温敏型雄性不育系由于其育性受外界环境温度变化的影响，低温不育而高温可育，属生境敏感型不育类型；但在自然条件下田间温度变化很大，不育系花期育性波动也较大。对于 F_2 代分离群体来说，其育性分离也必需在一定的临界低温条件以下才得以表现。本试验在兰州自然条件下进行，初花期在 5 月底到六月初，部分发育较晚的不育单株在初花期可能已过较高温度的条件下育性就已经恢复，因此，单株育性鉴定可能不准确，使统计的可育株数高于理论株数，而不育株数少于理论株数，3:1 的分离比有一定的偏离。对于温度敏感型不育类型来说，其育性鉴定宜在人工控温条件下进行，如人工气候箱，更加科学。其次，在育性划分的标准上可能也存在问题。本研究作者以形态标记（花药形态、颜色）为区分可育株和不育株的标准，在育性的判断上会有一些中间类型不易区分，也可能造成育性统计的误差。因此，应该进行花粉育性鉴定，以花粉可育率为单株育性划分的标准，更为准确，但由于工作量大，实际操作上具有一定的难度。

2 杂种优势表现

通过对亚麻温敏雄性不育系 1S 杂交后代 F_1 、 F_2 代主要农艺性状和产量性状超父本杂种优势的测定和分析，结果表明：不同杂交组合的 F_1 、 F_2 代在主要农艺性状株高和工艺长度上的平均优势均为负向超父本优势，而在有效分枝数和各产量性状上的平均优势均表现出很强的正向超父本优势。与 F_1 相比， F_2 代平均优势表现明显下降。 F_1 、 F_2 代产量性状构成因素平均优势大小顺序均为：单株产量 > 结实果数 > 千粒重 > 每果粒数。不同组合间 F_1 、 F_2 代主要农艺性状和产量性状的杂

种优势表现差异较大，其中 1S×黑亚 15 号组合产量性状的超父本优势在 6 个组合中最大，F₁、F₂ 代都表现出很强的杂种优势。

亚麻雄性不育的研究较早，早在 1921 年 Bateson 和 Gardyner 就首次鉴定出亚麻细胞质雄性不育系，但多年来亚麻杂种优势的利用都没有突破性的进展。本研究对于新型亚麻温敏雄性不育系杂种优势的分析表明，该不育系在亚麻杂种优势利用上具有巨大的生产利用潜力和价值，通过配置不同的杂交组合，可以筛选出一些强优势组合，有可能使亚麻产量得到大幅的提高。如本研究中 1S×黑亚 15 号组合，其 F₁、F₂ 单株产量的超父本优势分别达 408%、153%，而且其 F₁、F₂ 都有可能进行有效的利用，这将大大推进亚麻育种和生产的发展。因此，温敏雄性不育系在亚麻杂种优势利用上具有广阔的应用前景。

3 育性基因的 RAPD 标记

3.1 亚麻基因组 DNA 的提取

获得高质量、高纯度的 DNA 是所有分子生物学研究，如基因克隆、转基因、分子标记等成败的关键。针对不同的植物材料，可能需要选择不同的提取方法并做一定的改进，以获得满意的提取效果。

本研究采用高盐、低 pH 值法（邹喻苹，1994；王玉富，1997）提取亚麻基因组 DNA，提取结果较为理想。由于亚麻叶片含有较多的果胶、色素等物质，提取过程中液体较为粘稠，杂质和色素不易除去。采用高盐、低 pH 提取缓冲液有利于果胶的溶解，有效降低液体粘度，易于杂质的去除；同时加大了 PVP 的用量，有利于色素的去除。

在 DNA 提取过程中发现，不育系较可育材料 DNA 提取液更为粘稠，色素较多，不易得到纯白色的 DNA 沉淀，这可能为该不育系所具有的一种生理特点，有待于进一步研究。同时发现，DNA 的质量对于 RAPD 反应的影响较小，用未经纯化的 DNA 进行 RAPD 扩增，其结果与纯化后的 DNA 完全一样，考虑到纯化过程中对 DNA 的损失较大，因此在 DNA 提取中可以省去纯化的步骤，简化操作。

3.2 RAPD 反应体系及程序

本实验通过 RAPD 反应体系和程序优化，建立了适合本实验的亚麻基因组 DNA 最佳 RAPD 反应体系和反应程序（见结果与分析），然而实验过程中反映出

的主要问题仍然是 RAPD 技术的稳定性、重复性较差，可能会经常得不到满意的扩增结果，甚至根本没有扩增产物。

RAPD 技术虽然操作简单、易行，但由于其稳定性、重复性差，特别随着许多新型分子标记技术的出现，很大程度上限制了其在遗传和育种中的应用。许多研究报道都对 RAPD 技术的稳定性做了大量的分析和探讨，建立了不同植物材料及实验的 RAPD 最佳反应体系，其影响因素很多，从反应体系、反应程序到实验条件和操作等各个环节，都会影响 RAPD 反应的结果。

首先，高质量、高纯度的 DNA 是 RAPD 稳定性的前提，最适宜的反应体系浓度组合和反应程序是核心，此外，实验条件的一致性和细心的实验操作是根本保证。特别是不同的实验条件，如 PCR 仪、移液枪、药品试剂等仪器设备之间的差异，对 RAPD 反应结果都有很大的影响。本研究作者发现，不同产地和型号的 PCR 仪升降温之间的时间差异很大，其扩增结果差异也很大，实验时应尽量在一台 PCR 仪上进行体系优化和引物筛选。配制 PCR 反应混合液都是微量操作，不同的移液枪在加样时会产生很大的误差，特别是分开加样时误差更大，所以在反应混合物制备时应使用准确性高的移液器，平行实验之间相同的反应成分要先混合再分装，以提高加样的准确性，降低误差。对实验操作者来说，更应该认真、细心、规范操作。所以，只要掌握科学、规范的实验方法，优化组合，RAPD 技术的稳定性就能够保证，RAPD 技术将不会被科学家所遗弃，仍会得到广泛的应用和发展。

3.3 育性基因的 RAPD 标记

本研究利用分离群体分组分析法 (BSA)，在 240 条 10bp 随机引物中筛选到一个多态性引物，引物序列为：CACGGCACAA，在由 1S×Argus 杂交组合 F₂ 分离群体所构建的可育、不育基因池间扩增出一个多态性片断，片断大小约为 450bp，可能作为与亚麻温敏雄性不育系育性基因连锁的 RAPD 分子标记，暂命名为 S1113₄₅₀。

分离群体分组分析法 (BSA) 是根据分离群体的表现型 (如本研究中的雄性可育和雄性不育) 将所研究的性状分为两组，分别将一定数量 (一般为 10 株) 的单株 DNA 等量混合，即构成一对近等基因池 (如雄性可育基因池和雄性不育基因池)。理论上讲，两基因池间除目标性状区域的 DNA 组成存在差异外，其它遗传

背景完全相同。因此，在两基因池间能够扩增出的多态性 DNA 片断，就可能与目标基因相连锁。

4 进一步研究的设想

本研究结果表明，该温敏雄性不育系在亚麻杂种优势利用上具有巨大的应用潜力，但由于材料有限，只选取了几个有代表性的父本材料，其研究结果存在一定的局限性。因此，下一步应通过配制更多的杂交组合，进行更为广泛和深入的研究，以期从中选育出一些强优势组合，应用于亚麻育种和生产。

目前对亚麻温敏型雄性不育系的育性基因还知之甚少，为进一步在分子水平上对其遗传机理进行分析，有必要开展育性基因的分子标记研究，为该亚麻新型不育系育性基因的分子水平研究做一些有意的探索，也为一些后续工作，如分子标记辅助选择、甚至育性基因的定位、克隆等奠定理论基础。

本研究获得的亚麻温敏雄性不育系育性基因的 RAPD 分子标记可能与育性基因连锁，但其与育性基因的连锁程度如何，其应用价值如何，还需通过 F_2 分离群体进一步进行连锁性分析。因为作为目的基因紧密连锁的分子标记，与目的基因的遗传距离必须小于 5 厘摩尔才具有应用价值，可以用于目标基因的选择和定位、克隆等工作。此外，由于 RAPD 为显性标记，不能区分杂合基因型和纯合基因型，以及其不稳定性，多数研究者将其转化为更为稳定的 SCAR 标记。因此，在获得与育性基因紧密连锁的 RAPD 标记以后，可以考虑将其转化为 SCAR 或其它标记，同时可以开展不育基因的遗传定位等工作。

致 谢

值此论文完成之际，思绪万千！多年求学，实属不易，然而幸福的是曾受到许多老师、同学、亲戚、朋友和家人的关心、支持和帮助，片片真情，一生难忘！

首先向我的导师党占海研究员致以崇高的敬意和衷心的感谢！党老师治学严谨，思维开阔，敬业求实；在研究生的指导中，态度严肃而温和，尽量给学生提供学习、交流和实践锻炼的机会，使我受益匪浅；同时衷心感谢导师及师母在生活上给予我无微不至的关怀和帮助！

特别感谢甘肃农科院张建平副研究员，以及胡麻课题组余老师、任老师和龚老师在学习、实验和生活上的指导和帮助；感谢师姐吴行芬，师妹关天霞、田彩萍的支持和帮助！

感谢甘肃农业大学测试中心张金文教授、康老师、徐老师、孟老师、方老师，及李继红、王芳、冯玉兰、成娟、阎秋洁、姜寒玉等硕士在实验过程中的热心支持和帮助！

感谢我的室友，2003 级硕士吴步科、杨荣、孙利军、孙多鑫、李彤、史玮、王瑞斌、刘学周、于爱忠、王保成、张永久，三年来在学习和生活上的理解和帮助！我们一起度过了三年美好的时光，其中滋味，将长留心底，细细回味。

感谢国家自然科学基金项目（30370897）、甘肃省自然科学基金项目（ZS021-A25-034-N）对本研究的资助。

最后要特别感谢我的父亲、姐姐及众多亲戚、好友多年来在物质上和精神上给予我无私的支持、关心和帮助！一次次的感动，是我不断前进的力量源泉，此情此恩，必将铭记于心。

王 利 民

2006. 5. 26

参考文献

- [1] Ali-A.J, Siddiq2E.A. Isolation and characterization of areverse temperature sensitive genic male sterile mutant in rice[J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1999, 59(4):423~428.
- [2] Ali-I. etc. Identification and characterization of temperature sensitive genic male sterile sources in rice(*Oryzasativa*L.)(J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1995,55(3):243~259.
- [3] Barrett B A. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest [J]. Crop Sci.1998,38:1261-1271.
- [4] Batesib W, Caridner A E. Male sterility in flax[J]. J Genet,1921,11:269-275.
- [5] Bielawski J P, Noack K, Pumo D E. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrat eDNA[J]. BioTechniques,1995,18:860-865.
- [6] Bonierbale et al. RFLP maps based on common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato[J]. Genetics. 1988,120:1095~1103
- [7] Bostein D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism[J]. Am.J.Hum.Genet, 1980,32:314-331.
- [8] Burton G W, Hanna W W. Stable cytoplasmic male-sterile mutants induced in tift 23Db1 pearl millet with mi-comycin and streptomycin[J]. Crop Sci, 1982,22:651~652.
- [9] Cargill M K,Altshuler D,Ireland J, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding region of human genes[J]. Nat Genet,1999,21: 231- 239.
- [10] Devos K M, Gale M D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat [J]. TheorApplGenet,1992,84:567~672.
- [11] Dong N V, Subudhi P K, Luong P N. Molecular mapping of a rice thermo sensitive genic male sterile(TGMS) gene by AFLP, RFLP and SSR techniques[J]. Thero Appl Genet, 2000,100:727~734.
- [12] Dudley J W, Saghai Maroof M A, Rufener G K. Molecular markers and grouping of parents in maize breeding programs[J]. Crop Sci. 1991,31:718~723
- [13] Ellsworth D L, Rittenhause K D, Honeycutt R L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns[J]. BioFeedBack, 1993,14:214-216.
- [14] Godshal E B, Lee M, Lamkey K R. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize[J]. Theor. Appl. Genet.1990,80:273~280
- [15] Hadrys H, Balik M, Schierwater B. Application of random amplified polymorphic DNA(RAPD) in molecular ecology[J]. Molecular Ecology, 1992,1:55-63.
- [16] Hausner G, Rashid K Y, Kenaschack E O, Procunier J D. The development of codominant PCR/RFLP based markers for the flax rust resistance cilleles of the

- Locus[J].Genome,1999,42:1-8.
- [17] Hausner G, Rashid K Y, Kenaschack E O, Procunier K D, The identification of a deared amplified polymorphic sequence(CAPS) marker for the flax rust resistance gene M3[J]. Can.J,Plant Pathol,1999,21:187-192.
- [18] Helentjaris A. Genetic linkage map for maize based on RFLPs Trends in Genetics[J]. 1987,3:217~221
- [19] Kumar S, Singh S P. Inheritance of male sterility in some introduced varieties of linseed(*Linum.usitassimum* L) [J]. Indian.J.Agric.Sci,1970,40:184-191.
- [20] Landry B S, Dextraze L, Boivin G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of miniteparasitic wasp species(Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects[J].Genome, 1993, 36: 580-587.
- [21] Lang P. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science,1992,257:967-971.
- [22] Lee M, Godshalk E B, Lamkey K R, et al. Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of the ircrosses[J]. Crop Sci. 1989,29:1067~1071
- [23] Lopez M.T, Virmani S.S. Development of TGMS lines for developing two-line rice hybrids for the tropics[J]. Eu phytica,2000,114(3):211~215.
- [24] Ma Z Q,Roeder M,Sorrells M E. Frequencies and sequence characteristic sof di-,tri-,and tetri-nucleocidem microsatellites in wheat[J]. Genome, 1996, 39: 123-130.
- [25] McCouch S R, et al. Molecular mapping of rice chromosomes[J]. Theor Appl Genet, 1988, 76:815-829
- [26] McCough et al. Molecular mapping of rice chromosomes[J]. Theor.Appl.Genet. 1988,79:235~240
- [27] Micheli M R, Bova R, Rascale E, etal. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA(RAPD) method[J]. Nucleic Acids Research, 1994,22:1921-1922.
- [28] Morganten M,Oliveri A M. PCR amplified mirosatellite as markers in plant genetics[J].TheplantJournal,1993,3:175-182.
- [29] Neto E D, Souza C P, Rollinson D, et al. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome[J]. Molecular and Biochemical Parasitology,1993,57:83-88.
- [30] Olson M, et al. A common language for physical mapping of the human genome[J]. Science.1989,24:1434-1435
- [31] Paran I, et al. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce[J]. Theor Apple Genet,1993,85:985-993.

- [32] Petrov D F, Fokina, Zhelangnova H B. Method of producing cytoplasmic male sterility in maize[J]. US Patemt, 1971(3):594.
- [33] Procunier J D, Fernando M A, Barta J R. Species and strain differentiation of *Eimeria spp.* of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers[J]. Parasitology Research, 1993, 79:98-102.
- [34] Sabelli P A, et al. Characterization and organization of gene families at Gli-1 loci of bread and durum wheats by restriction fragment analysis[J]. Theor Appl Genet, 1991, 83:209-216
- [35] Saito A, et al. Linkage map of restriction fragment polymorphism loci in rice[J]. Jpn J Breed. 1991, 41:665-670
- [36] Smith O S, Smith J S C, Bowen S L et al. Similarities among a group of elite inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, grain yield heterosis and RFLPs[J]. Theor. Appl. Genet. 1990, 80:833~840
- [37] Subudhi P K, Bortatati R P, Virmani S S. Molecular mapping of a thermo sensitive genic male sterility in rice using bulked segregant analysis[J]. Genome, 1997, 40:188~194.
- [38] Thompson T, E. Cytoplasmic male-sterility flax with open corollas[J]. J Hered, 1977, 68:185-187.
- [39] Vos P. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21):4407-4414.
- [40] Williams J G K, et al. Genetic analysis using RAPD markers[J]. Methods Enzymol, 1993, 218:704-740.
- [41] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl. Acids Res, 1990, 18: 6531~6535.
- [42] Wu K S, Tanksley S D. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsatellite in rice[J]. Mol Gen Genet, 1993, 241:225-235.
- [43] Yamaguchi Y, Ikeda R, Hirasawa H. Linkage analysis of thermosensitive genic male sterility gene tms2 in rice[J]. Breeding Science, 1997, 47:371~373.
- [44] Yanagihara K, Mizuuchi K. Mismatch targeted transposition of Mu: a new strategy to map genetic polymorphism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(17): 11317-11321.
- [45] 安德荣, 程继红, 成卓敏. 影响小麦 RAPD 稳定性的试验技术研究[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(1):14~17.
- [46] 博天岳, 等. 亚麻抗枯萎病基因 Fij(t) 的分子标记[J]. 中国农业科学, 2003, 36(3):287-291
- [47] 博天岳, 等. 亚麻抗锈病基因 M4 的特异分子标记[J]. 遗传学报, 2002, 29(10):922-927.
- [48] 博天岳. 亚麻抗锈病、抗枯萎病基因的分子标记及品种资源对枯萎病的抗性评价[D]. 四川农业大学, 2002.
- [49] 曹双河, 张相岐, 张爱民. 光(温)敏雄性不育的调控机理分子遗传学研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 22(1):19-26.

- [50] 陈宏,孙维斌,雷初朝,等. RAPD 标记稳定性的影响因素探析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(5):139-142.
- [51] 陈炳东,张建平,余新城,等. 胡麻产量及主要经济性状的杂种优势[J]. 甘肃农业科技,1998,12:15.
- [52] 陈鸿山,等. 显性核不育亚麻的雄性不育性研究[J]. 北京农业大学学报,1993,19(曾刊):144-146.
- [53] 程宁辉,杨金水,高燕萍,等. 玉米杂种一代与亲本基因表达差异的初步研究[J]. 科学通报,1996,41(5):451~454
- [54] 党占海,等. 温敏型雄性不育亚麻的研究[J]. 作物学报,2002,28(6):861-864.
- [55] 党占海,张建平,余新成. 抗生素诱导油用亚麻雄性不育的研究[J]. 中国油料作物学报,2000,22(1):46-48.
- [56] 方宣钧,吴为人,唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [57] 冯瑞光,孟令启,宁文书. 粳型光敏核不育系主要农艺性状的配合力及杂种优势[J]. 华北农学报,1997,12(4):7~12.
- [58] 盖树鹏,孟祥栋. 利用 RAPD 技术进行植物性状标记及辅助选择[J]. 生物技术通报,1999,6:33-38.
- [59] 干滢,曾凡亚,赵云,等. 甘蓝型油菜“79.7”细胞核雄性不育基因 RAPD 分子标记初步研究[J]. 西南农业学报,1999,12:111-115.
- [60] 顾红雅,瞿礼嘉,明小天,等. 植物基因与分子操作[M]. 北京:北京大学出版社,1997.
- [61] 郭安平,等. 几种麻类作物及其近缘种植物总 DNA 的提取与鉴定. 中国麻作,1997,19(4):4~10.
- [62] 何觉民,戴君惕,邹应斌,等. 两系杂交小麦研究(I):生态雄性不育小麦的发现、培育及其利用价值[J]. 湖南农业科学,1992(5):1~3
- [63] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996,29(4):1-10.
- [64] 江树业,陈启锋,方宣钧. 利用 cDNA-RAPD 技术分析籼稻光敏核不育基因的差异表达[J]. 科学通报,43:2521-2525.
- [65] 江树业,陈启锋,方宣钧. 与水稻光敏核不育相关的 cDNA 片段的鉴定和染色体定位[J]. 科学通报, 44:2084-2088.
- [66] 江树业,陈启锋. 水稻农垦 58 与农垦 58S 的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 农业生物技术学报, 2000,1(1):63-66
- [67] 姜自锋,林乃铨,徐梅. RAPD 技术及其应用中的—些问题[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(3):356-360.
- [68] 蒋梁材,蒲晓斌,王瑞,等. 甘蓝型油菜核不育基因的 RAPD 标记[J]. 中国油料作物学报,2000,22(2):1-4.
- [69] 黎裕,贾继增,王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. 生物技术通报, 1999,(4):19~22.
- [70] 李光林,等. 糯高粱两用系“湘糯梁 S-1”育性转换的光温条件与分子机理研究[J]. 湖北农业

- 科学,1994,(2).
- [71] 李仕贵,周开达,朱立煌. 水稻温敏显性核不育基因的遗传分析和分子标记定位[J]. 科学通报, 44:955-957.
- [72] 李仕贵,周开达,朱立煌. 水稻温敏显性核不育基因的遗传分析和分子标记定位[J]. 科学通报,1999,44(9):955-958
- [73] 林伯年,贾春蕾. RAPD 技术在杨梅属植物分类研究中的应用[J]. 园艺学报,1999,76(4):221-226.
- [74] 刘春林,官春云. 植物 RAPD 标记的可靠性研究[J]. 生物技术通报,1999,(2):31~34.
- [75] 刘万勃,刘富中. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种遗传多样性的研究[J]. 农业生物技术学报,2002,10(3):231-236.
- [76] 刘忠松,官春云,陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [77] 刘尊文,彭芝兰,周小平,等. 甘蓝型油菜光温敏雄性不育两用系 50128S 的选育[J]. 中国油料作物学报,1998,20(1):13~16.
- [78] 卢江. 随机放大多态性 DNA(RAPD)—一种新的分子遗传标记技术[J]. 植物学报,1993,35(增刊):119~127.
- [79] 卢兴桂. 湖北光敏感核不育水稻[J].植物杂志,1991,18(5):26~28.
- [80] 路颖. 亚麻优异种质创新利用及发展[J]. 中国麻作,2000.22(3):21-24.
- [81] 吕洪飞,余象煜. 被子植物雄性不育的遗传学研究进展[J]. 植物学通报 1997,14(2):17~22.
- [82] 马翎健,何蓓如,宋喜悦. 小麦光敏雄性不育基因的遗传分析及 RAPD 标记[J]. 作物学报,2004,30(9):912-915.
- [83] 南京农业大学.田间试验和统计方法(第二版)[M].北京:农业出版社,1998.
- [84] 钱惠荣,郑康乐. DNA 标记和分子育种[J]. 生物工程进展,1998,18(3):12-18.
- [85] 任瑞文,卢强,徐晓立. 提高 RAPD 稳定性的几点经验与探讨[J]. 生物技术,2001,11(2):40-41.
- [86] 孙其信,黄铁城. 链霉素诱导的小麦细胞质雄性不育[J]. 北京农业大学学报,1994,20(1):52.
- [87] 孙万仓,党占海,安贤惠,等(译).世界油料作物[M]. 兰州:兰州大学出版社,1991.
- [88] 谭昌华,余国东,杨沛丰,等. 重庆温光型核不育小麦的不育性研究初报[J].西南农业学报,1992(4):1~6
- [89] 汪小全,邹喻苹,张大明,等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报,1996,38(12):954~962.
- [90] 汪永庆,徐来祥,张知彬. RAPD 技术的标准化问题[J]. 动物学杂志,2000,35(4):57-59.
- [91] 王冰冰,孙宝启. RAPD 技术进展及其在小麦育种中的应用(综述)[J]. 农业生物技术学报,1997,5(3):227~232.
- [92] 王关林.植物基因工程[M].北京:科学出版社,1998.
- [93] 王玉富,等.亚麻总 DNA 快速提取方法研究[J]. 中国麻作,1997,19(1):19~21.

- [94] 王岳光,王琳清,施巾帼. 小麦辐射雄性不育系 85EA 和 89AR 的育性及杂种优势[J]. 麦类作物学报,2002,22(1):23~26.
- [95] 危文亮. 分子标记在作物育种中的应用[J]. 生物技术通报,2000,16(2):12-16.
- [96] 吴敏生,王守才,戴景瑞,等. 指纹图谱技术在品种鉴定和纯度分析上的应用[J]. 农业生物技术学报,1998,6(1):51~56.
- [97] 颜家峰. 亚麻辐射育种效果[J]. 中国麻作,1989,4.
- [98] 杨光圣,傅延栋,马朝之,等. 甘蓝型油菜生态雄性不育两用品系的研究[J]. 华中农业大学学报,1997,16(5):330~334.
- [99] 易小麦,朱祯,周开达. 水稻抗性基因定位及相关分子标记研究进展[J]. 生物工程学报,1998,18(5):40-44.
- [100] 张爱明,等. 中国杂交小麦研究. 全国首届青年农学学术年会论文集[M]. 中国科学技术出版社,1992,137.
- [101] 张彩霞,柴守诚,郑炜君. 六倍体小黑麦 T 型细胞质雄性不育体系杂种优势与配合力的研究[J]. 西北植物学报,2005,25(5):898-902.
- [102] 张德水,陈受宜. DNA 分子标记、基因作图及其在植物遗传育种上的应用[J]. 生物技术通报,1998,(5):15-22.
- [103] 张辉,王宜林,张慧敏,等. 亚麻雄性不育系后代遗传规律探讨(I):侧交. 兄妹交. 回交后代育性表现[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1997, 18 (3) :38-42.
- [104] 张辉,张慧敏,丁维,等. 亚麻雄性不育系后代遗传规律探讨(II):可育株自交后代育性表现[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1998, 19 (2) :38-42.
- [105] 张建平,党占海. 新型雄性不育亚麻的杂种优势及温敏效应初探[J]. 西北农业学报,2002,11 (4) :22-24, 27
- [106] 张晓国,刘军,朱英国. 湖北光敏感核不育水稻不育性的遗传规律[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1990(4):98~101.
- [107] 张忠廷,李松涛,王 斌. RAPD 在水稻温敏核不育研究的应用[J]. 遗传学报,1994,21(5):373~378.
- [108] 赵治海,等. 谷子光(温)敏不育系 821 选育及其不育性与光、温关系的研究[J]. 中国农业科学,1996,29(5):23-31.
- [109] 周洪生,田志国,吴景锋,等. 玉米光敏雄性不育的发现及初步研究[J]. 玉米科学,1997,5(3):1~3.
- [110] 朱 军. 遗传模型分析方法[M]. 北京:中国农业出版社,1996:66-75.
- [111] 邹喻苹,汪小全,雷一丁,等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J]. 植物学报,1994(7):529.

附录：主要试剂及溶液(缓冲液)配制

● DNA 提取缓冲液组成及配制(1000ml, pH 5.5)

组 成	母 液	母液体积
100 mM NaAc	3 M NaAc	33.3 ml
50 mM EDTA	0.5 M EDTA	100 ml
500 mM NaCl	5 M NaCl	100 ml
2 % SDS	20% SDS	100 ml
2.5% PVP	20% PVP	125 ml
0.1%β-巯基乙醇	β-巯基乙醇原液	1 ml
ddH ₂ O		补足 1000 ml

● 3mol/L NaAc

称取无水乙酸钠 (MW: 82.03) 49.2g, 先加 140ml 重蒸水, 加热溶解, 再用冰乙酸调 pH (pH4.8 约 40ml, 5.6 约 30ml), 加重蒸水定溶至 200ml, 灭菌, 4℃保存备用。

● 5mol/L EDTA (pH8.0)

称取 186.1g EDTA-Na₂·2H₂O (MW: 372.24), 加入 800ml 重蒸水, 在磁力搅拌器上搅拌, 加入 NaOH 调至 pH 8.0, 重蒸水定容至 1L。只有在 pH 接近 8.0 时 EDTA-Na₂·2H₂O 才能完全溶解。调整 pH 值时可以用固体 NaOH, 大约使用 20g 左右, 也可使用 10ml/L 的 NaOH 溶液, 大约使用 70ml。待 EDTA-Na₂·2H₂O 完全溶解后, 再用稀 NaOH 准确调 pH 至 8.0。

● 10 mol/L NaOH

称取 40gNaOH (MW: 40)溶于适量蒸馏水后定容至 100ml。

● 5mol/L NaCl

称取 292.2g NaCl(MW: 58.5), 溶解于 800 ml 蒸馏水中, 此时已接近饱和, 所以溶解较慢, 完全溶解后用蒸馏水定容至 1L, 分装, 高压灭菌。

● 20% SDS

称取固体 SDS(MW: 288.44) 20g, 加入 80ml 重蒸水于 42-68℃溶解, 然后定溶至 100ml。

- 20% PVP

称取 100g PVP 溶于 400ml 重蒸水中，磁力搅拌或加热溶解，冷却后定容至 500ml。

- 5mol/L KAc(pH4.8)

称取 29.4g 乙酸钾(MW: 98.14)，溶于 60ml 重蒸水中，溶解后再加入 11.5ml 冰乙酸，重蒸水定容至 100ml，溶液中含有 3mol/L 的钾及 5mol/L 的乙酸根。本试剂还可以先配制 5mol/L 乙酸钾溶液，然后取 60ml 与冰乙酸 11.5ml、dH₂O 28.5ml 混合。

- 70%乙醇

将 375ml 无水乙醇加超纯水定容至 500ml。

- 1mol/L Tris-HCl pH8.0/7.5

称取 121.1g Tris (MW: 121.1)，溶于 800 ml 水中，搅拌条件下加入浓盐酸 (pH8.0 约 42ml，pH7.5 约 65ml)，待接近所需 pH 值时用稀盐酸准确调 pH 使至所需值，加入重蒸水至总体积 1L，分装，高压灭菌。Tris-HCl 溶液的 pH 值随温度变化而变化，温度每升高 1℃，pH 大约降低 0.03 个单位,配制及使用时需注意。

- TE pH8.0 (10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA)

1ml 1mol/L Tris-HCl (pH8.0) 与 0.2ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 混合后，用重蒸水定容至 100ml。

- 10mg/ml RNase

称取 100mg RNase 溶于 10ml 10mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、15mmol/LNaCl 中，于 100℃加热 15 分钟，缓慢却至冷室温，分装后于-20℃保存。

- 电泳缓冲液：50×TAE

称取 242g Tris 溶于适量的蒸馏水中，先用 300ml 重蒸水加热溶解，加入 57.1ml 冰乙酸，100ml 0.5mol/L EDTA pH8.0,用冰乙酸调 pH8.0, 蒸馏水定容至 1L，电泳时使用 1×TAE。

- 6×加样缓冲液：0.25%溴酚蓝、40%蔗糖

称取溴酚蓝 (MW:670.20) 0.25g, 加重蒸水 10ml, 在室温下过夜，待溶解后再称取蔗糖 40g，加重蒸水溶解后移入溴酚蓝溶液中，摇匀后加重蒸水定溶至 100ml，加 NaOH1-2 滴，调至蓝色。

- 10mg/ml EB

称取 1g 溴化乙锭 (MW: 394.22)，溶于 100ml 蒸馏水中，磁力搅拌器上搅拌数小时；或称取 10mg EB，置于 Eppendorf 管中，加入 1ml 蒸馏水，涡旋混合，4℃保存，注意 EB 必须充分溶解。

作者简介

➤ 基本资料:

姓 名	王利民	性 别	男
民 族	汉 族	籍 贯	甘肃庆阳
出生年月	1979 年 5 月	政治面貌	中共党员

➤ 教育经历:

1993.6 ---1999.6 甘肃省庆阳市西峰二中;

1999.9 ---2003.6 甘肃农业大学农学院生物技术本科专业;

2003.9 ---2006.6 甘肃农业大学农学院作物遗传育种硕士专业

➤ 在读期间参与项目:

国家自然科学基金项目“温敏型雄性不育亚麻的温光敏特性及遗传机理研究”;

甘肃省自然科学基金项目“温敏型雄性不育亚麻的分子标记研究”等

➤ 在读期间发表论文:

魏小红,王利民,龙瑞军,等.一氧化氮、水杨酸和过氧化氢对烟草氨基酸和可溶性蛋白的影响.植物生理与分子生物学学报,2005;

王利民,党占海,张建平,等.温敏雄性不育亚麻在云南的育性表现及温敏特性研究.西北农业学报,2006

导师简介

党占海，男，汉族，生于 1955 年 07 月，中共党员，现为甘肃省农业科学院粮食作物研究所所长、研究员，硕士生导师、国家百千万人才工程第一二层次入选者。1982 年毕业于甘肃农业大学农学系，并被分配到省农科院工作。1987 年晋升为助理研究员，1992 年破格晋升为副研究员，1997 年晋升为研究员。

多年来党占海研究员工作勤勤恳恳，长期从事胡麻等经济作物的新品种选育、繁殖、推广、栽培技术研究及品种资源研究工作，现在主要研究方向为亚麻新型雄性不育系的创建及研究，在科学研究中积累了丰富的经验，取得了丰硕的成果，先后发表论文 20 余篇，主持或参与完成科研项目 10 余项，6 项达国内同类研究的领先水平，5 项获国家、省（部）及地（厅）级以上奖励，其中国家科技进步三等奖 1 项（1993 年），农业部科技进步三等奖 1 项（1994 年），甘肃省农业技术改进奖 2 项，（1994 年、1996 年），甘肃省科技进步一等奖 1 项（2004 年）。在亚麻雄性不育方面的研究，经中科院官春云院士和西北农林科技大学何蓓如教授等专家鉴定认为此研究已达到国际领先水平。

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得甘肃农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：王利民

签字日期：2006年6月6日