

芸芥自交亲和性的遗传及自交亲和基因 mRNA 差异显示分析

范惠玲¹, 白生文¹, 张芬琴¹, 肖占文¹, 陈修斌¹, 孙万仓^{2*}

(1. 河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以8份芸芥自交亲和系与4份芸芥自交不亲和系为试验材料,通过正交和反交方式共组配了18个不同的杂交组合,调查了F₁群体的自交亲和性,及1424株F₂群体和626株BC₁群体的性状分离情况。同时,还采用mRNA差异显示技术研究了芸芥自交亲和基因的表达器官,分离、筛选了与自交亲和性相关的特异基因片段。结果表明:芸芥自交亲和性与细胞质遗传无关,而是由一对核基因控制的简单隐性遗传性状;芸芥自交亲和基因的表达不属于组成性表达,而属于组织特异性表达;在芸芥自交亲和系的柱头cDNA扩增中共得到3条差异cDNA片段,其与芸芥自交亲和基因有密切关系。

关键词:芸芥;自交亲和性的遗传;自交亲和基因;mRNA差异显示技术

中图分类号:S565.4;S332.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-7601(2012)06-0023-09

芸芥(*E. sativa* Mill)属十字花科芝麻菜属植物,与芸薹属植物具有亲缘关系,是芸薹属植物的重要育种资源。芸芥虽品质差、产量低,但仍然在生产上沿用,根本原因就在于芸芥对于干旱具有优异的抵御能力,同时兼有耐瘠薄、抗白粉病、耐盐碱、耐冻害等优良特性^[1,2]。芸芥还是干旱地区重要的油料作物和节水作物,是十字花科植物的重要育种基因资源,因此愈来愈引起人们的广泛关注。这些研究主要涉及芸芥种质资源研究^[3]、细胞学研究、自交不亲和性研究^[4]、自交亲和性研究^[5]、远缘杂交研究、分子生物学研究^[6]以及芸芥不同亚种植物学形态特征及经济性状研究等领域。

自交亲和性与自交不亲和性是一对相互对应的性状,是植物生殖生物学和分子生物学研究的重要内容。自交不亲和植物自交亲和性的研究早已引起人们的关注。但迄今为止,关于自交不亲和植物自交亲和性的研究主要集中在:自交亲和基因(资源)、自交亲和性的遗传、自交亲和性产生的分子机理^[7-9]、自交亲和性与蛋白质表达之间的关系^[10,11]四个方面,而关于自交不亲和种中有关自交亲和基因的表达、分离、克隆、功能分析,自交亲和基因、自交不亲和基因与其它十字花科植物自交亲和基因的比较分析的研究尚未见报道。总之,已有研究工作还未能真正揭示自交不亲和植物自交亲和现象的实质。芸芥属孢子体自交不亲和植物,此类植物由于

长期异花授粉的结果,使其群体成为一个由不同基因型个体组成的杂合群体,产量潜力有限;除此之外,异花授粉还使自交不亲和植物内部的隐性有利基因被相对的显性基因所掩盖;该类植物若强制进行自交,又面临自交不亲和与自交衰退两大难题,对种质的保纯及产量的进一步提高造成了较大影响。要从根本上解决这些问题,培育自交亲和的品种(品系)是关键,而要得到自交亲和材料,就要积极发掘芸芥属及其近缘植物的自交亲和基因资源,了解自交亲和性的遗传规律,分离并克隆控制自交亲和性的特异基因并研究其功能,进而通过其它途径获得自交亲和性较强的植物材料,旨在分子水平提高育种效率。

植物的自交不亲和性与自交亲和性是由多个基因的差异表达引起的。鉴于此,本文首次采用mRNA差异显示技术,对不同生长期芸芥自交亲和系与自交不亲和系的叶片、根、茎、花瓣和柱头中的mRNA进行DDRT-PCR扩增,旨在分析芸芥自交亲和基因的表达器官,进一步分离、筛选与自交亲和性相关的特异基因片段,为以后利用RACE技术获得芸芥自交亲和性全长基因,并进行同源性分析和功能比较分析作铺垫,这些基础工作在探索自交不亲和植物自交亲和性发生的分子基础、植物自交不亲和性与自交亲和性的进化关系、植物遗传育种中均具有重要的科学意义和重大的应用价值。

收稿日期:2012-06-08

基金项目:国家863计划资助项目(2009AA101105);河西学院青年教师科研基金项目(QN2011-17)

作者简介:范惠玲(1980—),女,甘肃陇西人,讲师,硕士研究生,研究方向为油料作物遗传和分子育种。E-mail:qianjing05@163.com。

*通信作者:孙万仓,博士,教授,主要从事十字花科油料作物的遗传和育种研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

研究芸芥自交亲和性遗传所用材料:自交不亲和系,包括 Boshert 原-1、Boshert 原-2、Boshert 原-3 和 Boshert 原-4,共 4 份,它们来源相同,是姊妹系,自交不亲和和基因相同,自交不亲和性稳定;自交亲和系,包括武芸 7-4-2、武芸 7-5-1、武芸 7-6-1、武芸 7-6-3、武芸 4-5-1、武芸 7-5-1-1、武芸 7-5-1-2 和武芸 7-5-3-13,共 8 份,它们来源相同,也是姊妹系,自交亲和和基因相同,自交亲和性稳定,所有材料均由甘肃农业大学农学院作物遗传育种系育成,经多年大田观察和室内考种发现它们的农艺性状表现良好。

研究芸芥自交亲和和基因表达器官所用材料:芸芥自交不亲和系 SI 及其自交亲和突变体 SC,均由甘肃农业大学农学院作物遗传育种系育成,它们属于高代纯系;SI 为对照,其自交不亲和性稳定,经过连续 7~8 代的自交,自交亲和指数均小于 1,属高度自交不亲和系;SC 是十字花科中芸薹属以外的新自交亲和和突变体,该突变体经连续自交 8 代,自交亲和指数稳定在 14 左右,相对自交亲和指数稳定在 95% 左右,荧光染色法分析花粉-柱头互作反映,均表现自交亲和,属高度自交亲和突变体。

1.2 引物序列

根据 DDRT-PCR 扩增所用引物的特点,参考黄聪丽^[12]等的研究报告,共设计合成 3 条 3' 端锚定引物 H-T₁₁M 和 10 条 10-nt 随机引物(详见表 1)。

表 1 锚定引物和随机引物的序列

Table 1 Sequence of anchoring primers and random primers

锚定引物 Anchor primer	引物序列 Primer sequence	随机引物 Random primer	引物序列 Primer sequence	随机引物 Random primer	引物序列 Primer sequence
H-T ₁₁ A	5'AAGCTTTTTTTTTTA3'	①	5'GGAAGTCGCC3'	⑥	5'GCTGACTGTG3'
H-T ₁₁ G	5'AAGCTTTTTTTTTTG3'	②	5'ACCAGGTTCG3'	⑦	5'TGTTCCACGG3'
H-T ₁₁ C	5'AAGCTTTTTTTTTTC3'	③	5'GGGAATTCGG3'	⑧	5'TGACGGCGGT3'
		④	5'AACCCGGGAA3'	⑨	5'CAGAGGTCCC3'
		⑤	5'TCACCACGGT3'	⑩	5'GTCGTCCTG3'

1.3 实验方法

1.3.1 芸芥自交亲和性遗传研究 2004 年春季在甘肃农业大学农学院育种试验基地播种亲本,花期组配正交和反交组合,进行人工去雄杂交,获得 F₁ 群体。2005 年种植 F₁ 代和相应亲本,花期对每一株 F₁ 套袋自交,获得 F₂ 群体,并与自交亲和亲本回交,获得 BC₁ 群体。收获期对每一株套袋自交的 F₁ 进行考种,并计算自交亲和指数,判断自交亲和性与否。2006 年种植 F₂、BC₁ 代,各材料种 3 行,行长 1.5 m,花期每一单株套袋自交,收获期每一单株考种,判断自交亲和性与否,并根据性状分离分类统计。自交亲和指数 = 结籽数/处理花朵数。若自交亲和指数 ≥ 1,则属于自交亲和类型;若自交亲和指数 < 1,则属于自交不亲和类型。

1.3.2 取样 芸芥 SI 和 SC 的种子在培养皿中发芽,嫩芽移入蛭石中,将带有 4~5 片真叶的幼苗移栽到大田,开花前去雄并套袋自交,分别于苗期、开花前、开花当天和开花后四个时期剪取叶片,约 3 g。同时,于开花前 3 d、2 d、1 d、开花当天、开花后第 1 d、第 2 d、第 3 d 不同时期,分别取若干克花柱,在无 RNase 的环境下于冰上切取柱头组织,液氮速冻后

-77℃ 保存,用于提取 RNA。

1.3.3 RNA 提取及检测 材料置研钵中,在液氮中研磨,转移至离心管中,加入异硫氰酸胍溶液,冰上静置 3 min,加入 2M NaAc 溶液、水饱和酚、氯仿/异戊醇,混匀后冰浴 15 min;4℃,12 000 g 离心 20 min;取上清,加异丙醇,混匀后 -20℃ 静置 30 min;4℃,10 000 g 离心 15 min,弃上清,用异硫氰酸胍溶液溶解沉淀,加水饱和酚/氯仿,混匀后置冰上;4℃,9 000 g 离心 7 min。取上清,加等体积氯仿,冰上静置 3 min;4℃,10 000 g 离心 7 min,取上清,加 1/20 体积 3M NaAc 溶液、异丙醇混匀后 -20℃ 静置 30 min;4℃,9 000 g 离心 5 min。弃上清,加入 75% 乙醇,将 RNA 沉淀悬浮;离心 10 min 以沉淀 RNA,风干沉淀 2 min,加入适量 RNase-free ddH₂O,充分溶解后于 -77℃ 保存。用 1.2% 变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.3.4 cDNA 第一链合成 PCR 管中依次加入 2.27 μL H-T₁₁M,2 μL RNA,9.13 μL DEPC-H₂O;70℃ 保温 5 min,冰上冷却 2 min;离心数秒后加入 5 μL 5× Reaction Buffer,5 μL dNTPs,0.6 μL Ribonuclease Inhibitor,1 μL M-MLV;42℃ 保温 60 min 后于 95℃ 灭活残余 M-MLV。

1.3.5 DDRT-PCR 扩增及电泳检测 分别以 SC 和 SI 中的根、茎、叶、花瓣和柱头为材料,进行 DDRT-PCR 扩增。PCR 反应体系:17 μ L DEPC-ddH₂O, 1.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer, 2 μ L dNTPs, 1 μ L 锚定引物, 1 μ L 随机引物; 1.5 L cDNA, 1 μ L Taq DNA Polymerase。PCR 反应程序:(1) 94 $^{\circ}$ C 4 min;(2) 30 $^{\circ}$ C 1 min;(3) 72 $^{\circ}$ C 1 min;(4) 94 $^{\circ}$ C 30 s;(5) 42 $^{\circ}$ C 1 min 30 s;(6) 72 $^{\circ}$ C 1 min, 从(4)到(6)共 35 个循环;(7) 72 $^{\circ}$ C 10 min。最后将 1 μ L 溴酚蓝和 5 μ L DDRT-PCR 扩增产物混匀,用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果与分析

2.1 芸芥自交亲和性的遗传特性

2.1.1 芸芥 F₁ 群体自交亲和性表现 由表 2 可知,在所调查的 18 个不同 F₁ 杂交组合中,不论正交(自交不亲和系 $\times$ 自交亲和系)还是反交(自交亲和系 $\times$ 自交不亲和系),杂交所得 F₁ 代的自交亲和指数均小于 1,全部表现自交不亲和。可见, F₁ 所有植株的性状表现都是一致的,都只表现一个亲本的性状。这表明芸芥自交亲和性与细胞质遗传无关,而是由核基因控制的,由于在 F₁ 代表现的是自交不亲和,因此芸芥自交亲和性为隐性性状。

2.1.2 芸芥 F₂ 群体自交亲和性表现 由表 3 可知,芸芥 F₂ 群体在性状表现上不同,出现了性状分离现象,在所调查的 1424 株 F₂ 群体中,361 株表现自交亲和,1063 株表现自交不亲和。通过适合性测验,发现不同杂交组合的 χ^2 值均小于 $\chi^2_{0.05}$ 值($\chi^2_{0.05} = 3.841$, $df = 1$),自交不亲和株与自交亲和株的分离比例大约等于 3:1。这说明,芸芥自交亲和性可能是由一对核基因控制的。

2.1.3 芸芥 BC₁ 群体自交亲和性表现 从表 4 可知,芸芥 BC₁ 群体出现了性状分离现象,在所调查的 626 株 BC₁ 群体中,302 株表现自交亲和,324 株表现自交不亲和。通过适合性测验,发现不同杂交组合的 χ^2 值均小于 $\chi^2_{0.05}$ 值($\chi^2_{0.05} = 3.841$, $df = 1$),自交亲和株与自交不亲和株的比例大约等于 1:1。按照孟德尔 1 对基因的遗传规律, F₁ 与隐性亲本回交,后代群体中表现显性性状的植株数与隐性性状的植株数之比应该等于 1:1。以上结果进一步证明,芸芥自交亲和性是由一对基因控制的简单遗传性状。

2.2 芸芥柱头总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

取 3 μ L RNA 提取液,与 1 μ L 上样缓冲液混合, 200 V 电泳 5 min,检测 RNA 的完整性。如图 1 所示,28S RNA 和 18S RNA 条带的亮度之比约为 2:1,

表 2 芸芥 F₁ 群体自交亲和性表现

Table 2 Self-compatibility in F₁ population in *E. sativa* Mill

杂交方式 Hybridized ways	编号 Code	杂交组合 Combinations	自交亲和指数 Index of self-compatibility
正交 (♀自交不亲和系 $\times$ ♂自交亲和系) Orthogonality (♀ self-incompatible lines $\times$ ♂ self-compatible lines)	1	Bosherl 原-1 $\times$ 武芸 7-6-3 Original Bosherl-1 $\times$ wuyun7-6-3	0.00
	2	Bosherl 原-1 $\times$ 武芸 4-5-1 Original Bosherl-1 $\times$ wuyun4-5-1	0.00
	3	Bosherl 原-2 $\times$ 武芸 7-5-1-1 Original Bosherl-2 $\times$ wuyun7-5-1-1	0.44
	4	Bosherl 原-1 $\times$ 武芸 7-5-1 Original Bosherl-1 $\times$ wuyun7-5-1	0.53
	5	Bosherl 原-3 $\times$ 武芸 7-5-1-1 Original Bosherl-3 $\times$ wuyun7-5-1-1	0.60
	6	Bosherl 原-4 $\times$ 武芸 7-5-3-13 Original Bosherl-4 $\times$ wuyun7-5-3-13	0.65
	7	Bosherl 原-1 $\times$ 武芸 7-6-1 Original Bosherl-1 $\times$ wuyun7-6-1	0.80
	8	Bosherl 原-1 $\times$ 武芸 7-5-1-2 Original Bosherl-1 $\times$ wuyun7-5-1-2	0.82
	9	Bosherl 原-1 $\times$ 武芸 7-4-2 Original Bosherl-1 $\times$ wuyun7-4-2	0.88
反交 (♀自交亲和系 $\times$ ♂自交不亲和系) Reciprocal cross (♀ self-compatible lines $\times$ ♂ self-incompatible lines)	10	武芸 7-6-1 $\times$ Bosherl 原-1 Wuyun7-6-1 $\times$ Original Bosherl-1	0.00
	11	武芸 7-5-1-2 $\times$ Bosherl 原-1 Wuyun7-5-1-2 $\times$ Original Bosherl-1	0.00
	12	武芸 7-4-2 $\times$ Bosherl 原-1 Wuyun7-4-2 $\times$ Original Bosherl-1	0.00
	13	武芸 4-5-1 $\times$ Bosherl 原-1 Wuyun4-5-1 $\times$ Original Bosherl-1	0.00
	14	武芸 7-5-1 $\times$ Bosherl 原-1 Wuyun7-5-1 $\times$ Original Bosherl-1	0.19
	15	武芸 7-5-1-1 $\times$ Bosherl 原-2 Wuyun7-5-1-1 $\times$ Original Bosherl-2	0.44
	16	武芸 7-6-3 $\times$ Bosherl 原-1 Wuyun7-6-3 $\times$ Original Bosherl-1	0.27
	17	武芸 7-5-3-13 $\times$ Bosherl 原-4 Wuyun7-5-3-13 $\times$ Original Bosherl-4	0.65
	18	武芸 7-5-1-1 $\times$ Bosherl 原-3 Wuyun7-5-1-1 $\times$ Original Bosherl-3	0.16

表 3 芸芥 F₂ 群体自交亲和性分离表现Table 3 Segregation of self-compatibility in F₂ population

编号 Code	杂交组合 Hybridized combinations	总株数 Total plants	分离比 Ratio of separation				χ^2 测验 Test χ^2_c
			实际比值 Observed		理论比值 Theoretical		
			SC	SI	SC	SI	
1	Bosherl 原-1×武芸 7-5-1 Original Bosherl-1×wuyun 7-5-1	85	22	63	21.3	63.7	0.00
2	Bosherl 原-1×武芸 7-6-1 Original Bosherl-1×wuyun 7-6-1	67	18	49	16.8	50.3	0.05
3	Bosherl 原-1×武芸 7-5-1-2 Original Bosherl-1×wuyun 7-5-1-2	197	47	150	49.3	147.8	0.08
4	Bosherl 原-1×武芸 7-4-2 Original Bosherl-1×wuyun 7-4-2	154	35	119	38.5	115.5	0.31
5	Bosherl 原-1×武芸 4-5-1 Original Bosherl-1×wuyun 4-5-1	46	15	31	11.5	34.5	1.04
6	Bosherl 原-1×武芸 7-6-3 Original Bosherl-1×wuyun 7-6-3	84	26	58	21	63	1.28
7	Bosherl 原-2×武芸 7-5-1-1 Original Bosherl-2×wuyun 7-5-1-1	126	31	95	31.5	94.5	0.00
8	Bosherl 原-4×武芸 7-5-3-13 Original Bosherl-4×wuyun 7-5-3-13	145	37	108	36.25	108.8	0.00
9	Bosherl 原-3×武芸 7-5-1-1 Original Bosherl-3×wuyun 7-5-1-1	38	5	33	9.5	28.5	2.24
10	武芸 7-6-1×Bosherl 原-1 Wuyun 7-6-1×Original Bosherl-1	10	3	7	2.5	7.5	0.00
11	武芸 7-4-2×Bosherl 原-1 Wuyun 7-4-2×Original Bosherl-1	10	2	8	2.5	7.5	0.00
12	武芸 7-5-1×Bosherl 原-1 Wuyun 7-5-1×Original Bosherl-1	10	3	7	2.5	7.5	0.00
13	武芸 7-5-3-13×Bosherl 原-4 Wuyun 7-5-3-13×Original Bosherl-4	107	30	77	26.75	80.3	0.87
14	武芸 7-5-1-2×Bosherl 原-1 Wuyun 7-5-1-2×Original Bosherl-1	41	10	31	10.25	30.8	0.01
15	武芸 4-5-1×Bosherl 原-1 Wuyun 4-5-1×Original Bosherl-1	62	15	47	15.5	46.5	0.00
16	武芸 7-6-3×Bosherl 原-1 Wuyun 7-6-3×Original Bosherl-1	95	26	69	23.75	71.3	0.17
17	武芸 7-5-1-1×Bosherl 原-2 Wuyun 7-5-1-1×Original Bosherl-2	126	31	95	31.5	94.5	0.00
18	武芸 7-5-1-1×Bosherl 原-3 Wuyun 7-5-1-1×Original Bosherl-3	21	5	16	5.25	15.8	0.02
F ₂	总和 Total	1424	361	1063			

表明获得的 28S RNA 和 18S RNA 的完整性较好,无降解现象。

2.3 反转录 cDNA 质量检测结果

芸芥自交亲和系开花前、开花当天和开花后的柱头 RNA 分别经反转录后,用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测发现:在 100~2 000 bp 的范围内出现连续的 cDNA 条带,且在开花前样品中出现的 cDNA 条带数明显少于开花当天和开花后样品中的。结果表明提取的 RNA 符合要求,完整性好、无蛋白质、苯酚、DNA 等的污染,反转录 cDNA 的合成完全正常。

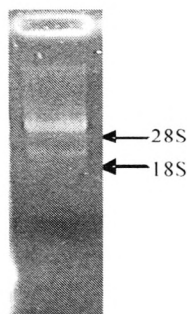
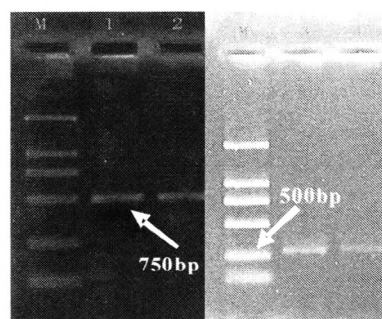


图 1 芸芥柱头 RNA

Fig.1 RNA from stigmas of Yunjie

2.4 芸芥自交亲和基因表达器官研究

2.4.1 芸芥不同生育期根和茎中 mRNA 差异显示结果 采用 H-T₁₁G 与⑥引物组合, H-T₁₁G 与⑩引物组合,分别对芸芥苗期根和花期根中 RNA 进行 DDRT-PCR 扩增。如图 2 所示,处于同一发育时期的芸芥根,在 SC 与 SI 中未出现差异带,说明芸芥自交亲和基因不在根中表达。



1.SC(苗期 Seedling, H-T₁₁G 与⑥) 2.SI(苗期 Seedling, H-T₁₁G 与⑥)

3.SC(花期 Flowering, H-T₁₁G 与⑩) 4.SI(花期 Flowering, H-T₁₁G 与⑩)

图 2 芸芥不同生育期根中 mRNA 差异显示结果

Fig.2 Differential display of mRNA from root of SC and SI

用 H-T₁₁A 和⑥引物组合, H-T₁₁A 和⑨引物组合,分别对芸芥开花前茎和开花期茎中 RNA 进行

DDRT-PCR 扩增。如图 3 所示,处于同一发育时期 交亲和基因不在茎中表达。
的芸芥茎,在 SC 与 SI 中未出现差异带,说明芸芥自

表 4 芸芥 BC₁ 群体自交亲和性分离表现Table 4 Segregation of self-compatibility in BC₁ population

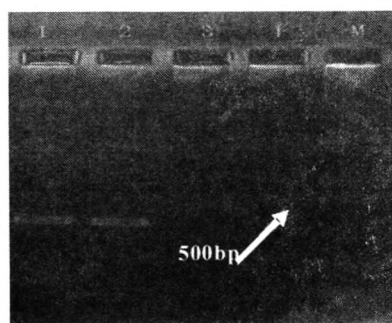
编号 Code	回交组合 Back-cross combinations	总数 Total plant	分离比 Ratio of separation				χ^2 测验 Test
			实测值 Observed		理论值 Theoretical		
			SC	SI	SC	SI	
1	(Bosherl 原-4×武芸 7-5-3-13)×武芸 7-5-3-13 (Original Bosherl-4×wuyun 7-5-3-13)×wuyun 7-5-3-13	48	23	25	24	24	0.09
2	(Bosherl 原-1×武芸 7-6-3)×武芸 7-6-3 (Original Bosherl-1×wuyun 7-6-3)×wuyun 7-6-3	19	8	11	9.5	9.5	0.00
3	(Bosherl 原-1×武芸 4-5-1)×武芸 4-5-1 (Original Bosherl-1×wuyun 4-5-1)×wuyun 4-5-1	40	17	23	20	20	0.63
4	(Bosherl 原-1×武芸 7-6-1)×武芸 7-6-1 (Original Bosherl-1×wuyun 7-6-1)×wuyun 7-6-1	82	39	43	41	41	0.21
5	(Bosherl 原-1×武芸 7-5-1)×武芸 7-5-1 (Original Bosherl-1×wuyun 7-5-1)×wuyun 7-5-1	10	5	5	5	5	0.00
6	(Bosherl 原-1×武芸 7-4-2)×武芸 7-4-2 (Original Bosherl-1×wuyun 7-4-2)×wuyun 7-4-2	21	10	11	10.5	10.5	0.00
7	(Bosherl 原-1×武芸 7-5-1-2)×武芸 7-5-1-2 (Original Bosherl-1×wuyun 7-5-1-2)×wuyun 7-5-1-2	10	5	5	5	5	0.50
8	(Bosherl 原-2×武芸 7-5-1-1)×武芸 7-5-1-1 (Original Bosherl-2×wuyun 7-5-1-1)×wuyun 7-5-1-1	31	14	17	15.5	15.5	0.13
9	(Bosherl 原-3×武芸 7-5-1-1)×武芸 7-5-1-1 (Original Bosherl-3×wuyun 7-5-1-1)×wuyun 7-5-1-1	26	10	16	13	13	0.96
10	(武芸 7-5-1-1×Bosherl 原-2)×武芸 7-5-1-1 (wuyun 7-5-1-1×Original Bosherl-2)×wuyun 7-5-1-1	20	11	9	10	10	0.05
11	(武芸 7-6-1×Bosherl 原-1)×武芸 7-6-1 (wuyun 7-6-1×Original Bosherl-1)×wuyun 7-6-1	17	8	9	8.5	8.5	0.00
12	(武芸 7-5-1×Bosherl 原-1)×武芸 7-5-1 (wuyun 7-5-1×Original Bosherl-1)×wuyun 7-5-1	20	10	10	10	10	0.05
13	(武芸 7-5-3-13×Bosherl 原-4)×武芸 7-5-3-13 (wuyun 7-5-3-13×Original Bosherl-4)×wuyun 7-5-3-13	50	25	25	25	25	0.02
14	(武芸 7-4-2×Bosherl 原-1)×武芸 7-4-2 (wuyun 7-4-2×Original Bosherl-1)×wuyun 7-4-2	62	32	30	31	31	0.02
15	(武芸 4-5-1×Bosherl 原-1)×武芸 4-5-1 (wuyun 4-5-1×Original Bosherl-1)×wuyun 4-5-1	54	29	25	27	27	0.09
16	(武芸 7-6-3×Bosherl 原-1)×武芸 7-6-3 (wuyun 7-6-3×Original Bosherl-1)×wuyun 7-6-3	22	11	11	11	11	0.05
17	(武芸 7-5-1-1×Bosherl 原-3)×武芸 7-5-1-1 (wuyun 7-5-1-1×Original Bosherl-3)×wuyun 7-5-1-1	84	40	44	42	42	0.06
18	(武芸 7-5-1-2×Bosherl 原-1)×武芸 7-5-1-2 (wuyun 7-5-1-2×Original Bosherl-1)×wuyun 7-5-1-2	10	5	5	5	5	0.10
BC ₁	总和 Total	626	302	324			

2.4.2 芸芥不同生育期叶片和初花期花瓣中 mRNA 差异显示结果 用 H-T₁₁A 和②引物组合,分别对芸芥苗期叶片、开花前叶片和花期叶片中 RNA 进行 DDRT-PCR 扩增。如图 4 所示,处于同一发育时期的芸芥叶片,在 SC 与 SI 中未出现差异带,说明芸芥自交亲和基因不在叶片中表达。

用 H-T₁₁C 和③引物组合,分别对芸芥初花期花瓣中 RNA 进行 DDRT-PCR 扩增。如图 5 所示,处于同一发育时期的芸芥花瓣,在 SC 与 SI 中未出现差异带,说明芸芥自交亲和基因不在花瓣中表达。

2.4.3 芸芥柱头 mRNA 差异显示结果 用 H-T₁₁A 与①、H-T₁₁G 与②、H-T₁₁C 与③引物组合,分别

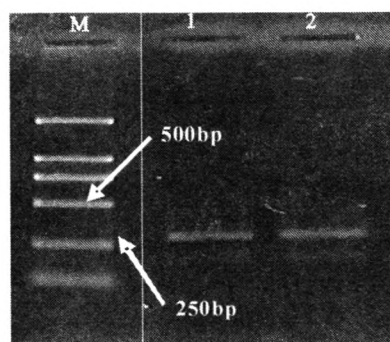
对芸芥开花前柱头、开花当天柱头和开花后(花瓣开始凋谢)柱头中 RNA 进行 DDRT-PCR 扩增。如图 6 所示,处于同一发育时期的芸芥柱头,在 SC 与 SI



1.SC(开花前 Before flowering, H-T₁₁A 和 ⑥) 2.SI(开花前 Before flowering, H-T₁₁A 和 ⑥) 3.SC(花期 Flowering H-T₁₁A 和 ⑥) 4.SI(花期 Flowering, H-T₁₁A 和 ⑥)

图 3 芸芥不同生育期茎中 mRNA 差异显示结果

Fig.3 Differential display of mRNA from root of SC and SI

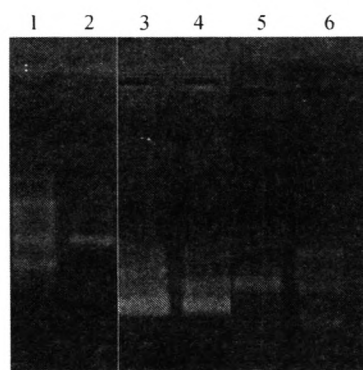


1.SC(初花期 Initial stage of bloom)

2.SI(初花期 Initial stage of bloom)

图 5 芸芥初花期花瓣 H-T₁₁C 和 ③引物组合 mRNA 差异显示结果

Fig.5 Differential display of mRNA from petal of SC and SI

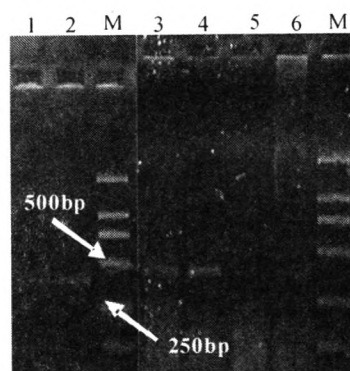


1.SC(开花前 Before flowering, H-T₁₁A 与 ①) 2.SI(开花前 Before flowering, H-T₁₁A 与 ①) 3.SI(开花当天 Blossom on the day, H-T₁₁G 与 ②) 4.SC(开花当天 Blossom on the day, H-T₁₁G 与 ②) 5.SI(开花后 After flowering, H-T₁₁C 与 ③) 6.SC(开花后 After flowering, H-T₁₁C 与 ③)

图 6 芸芥不同生育时期柱头 mRNA 差异显示结果

Fig.6 Differential display of mRNA from stigma of SC and SI

中扩增出差异 cDNA 片段,初步证明芸芥自交亲和基因可能在柱头组织中表达。



1.SC(苗期 Seedling) 2.SI(苗期 Seedling) 3.SC(开花前 Before flowering) 4.SI(开花前 Before flowering) 5.SC(花期 Flowering) 6.SI(花期 Flowering)

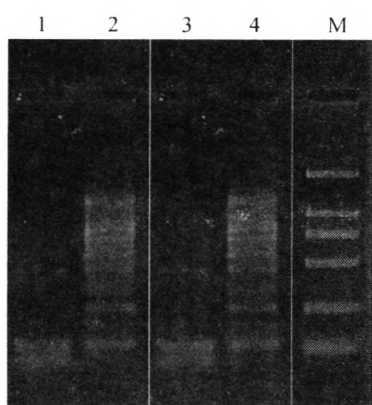
图 4 芸芥叶片 H-T₁₁A 和 ②引物组合 mRNA 差异显示结果

Fig.4 Differential display of mRNA from leaves of SC and SI

2.5 芸芥自交亲和性相关基因的特异 cDNA 片段研究

2.5.1 芸芥 SC 与 SI 开花前柱头 mRNA 差异显示结果 采用 30 个引物组合对芸芥 SC 与 SI 开花前柱头 mRNA 进行差异显示分析,共筛选出 18 个有效引物组合。对电泳图谱进行统计,结果发现:(1) 18 个引物组合共能扩增出 142 个条带,其中 SI 中共显现出 52 个条带,在 SC 中共显现出 90 个条带,条带大小分布于 100~2 000 bp 之间,主要集中在 200~1 500 bp 范围之内;(2) 以 H-T₁₁C 为锚定引物进行 DDRT-PCR 扩增所得到的条带数目比用 H-T₁₁A 和 H-T₁₁G 为锚定引物时的多;(3) SC 样与 SI 样间存在差异条带,共得到 10 条差异 cDNA 片段,能稳定出现的有 2 条,一条小于 100 bp(如图 7 所示),另一条介于 750~1 000 bp 之间(如图 8 所示)。(4) SI 样较 SC 样也有差异带存在,共发现 6 条差异带,能稳定出现的仅有 1 条,大小约等于 750 bp(如图 9 所示)。

2.5.2 芸芥 SC 与 SI 开花当天和开花后柱头 mRNA 差异显示结果 采用 2.5.1 中所筛选出的 18 个引物组合对芸芥 SC 与 SI 开花当天柱头 mRNA 进行 DDRT-PCR 扩增。结果发现:(1) 18 个引物组合共扩增出 133 个条带,其中在 SC 中有 87 个条带显现,SI 中有 46 个条带显现,条带大小主要集中于 200~1 500 bp 之间;(2) SC 样较 SI 样出现差异条带,能稳定出现的仅有 1 条,大小为 300 bp(如图 10 所示)。SI 样较 SC 样也出现 3 条差异带,但能稳定重复出现的只有 1 条,大小介于 500~600 bp 之间(如图 11 所示)。

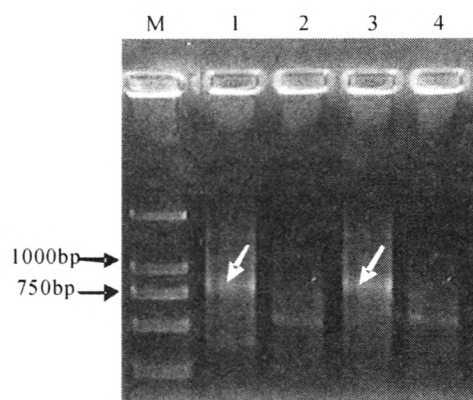


1.SC(开花前 Before flowering, H-T₁₁C 与③) 2.SI(开花前 Before flowering, H-T₁₁C 与③) 3.SC(开花前 Before flowering, H-T₁₁C 与④) 4.SI(开花前 Before flowering, H-T₁₁C 与④)

图7 锚定引物 H-T₁₁C 与随机引物③和④

柱头 mRNA 差异显示结果

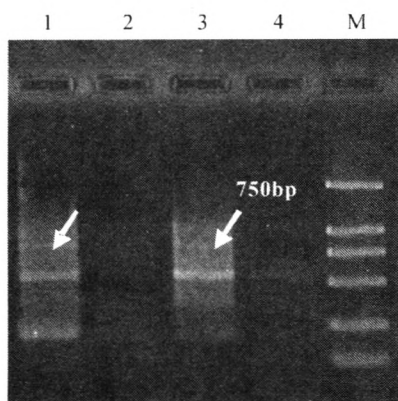
Fig.7 Differential display of mRNA from stigma of SC and SI



1.SC(H-T₁₁G 和②) 2.SI(H-T₁₁G 和②)
3.SC(H-T₁₁G 和⑤) 4.SI(H-T₁₁G 和⑤)

图8 H-T₁₁G 和②引物组合于开花前柱头 mRNA 差异显示结果

Fig.8 Differential display of mRNA from stigma before flowering

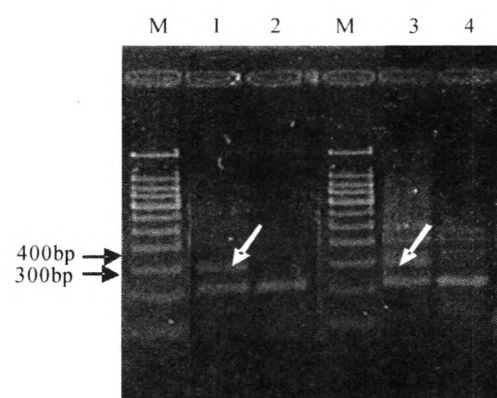


1.SI(H-T₁₁A 和⑤) 2.SC(H-T₁₁A 和⑤)
3.SI(H-T₁₁A 和⑩) 4.SC(H-T₁₁A 和⑩)

图9 H-T₁₁A 与⑤和⑩引物组合于开花前

柱头 mRNA 差异显示结果

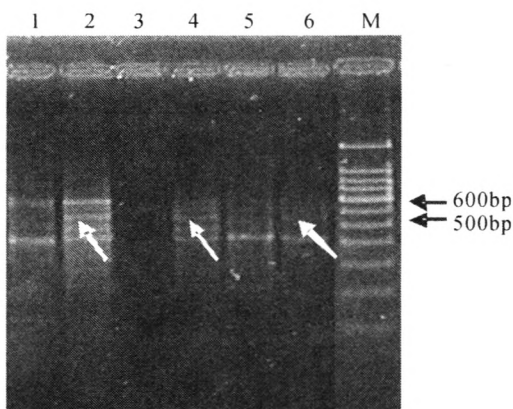
Fig.9 Differential display of mRNA from stigma before flowering



1.SC(H-T₁₁C 和①) 2.SI(H-T₁₁C 和①)
3.SC(H-T₁₁C 和②) 4.SI(H-T₁₁C 和②)

图10 芸芥开花当天柱头 mRNA 差异显示结果

Fig.10 Differential display of mRNA from flowering stigma



1.SC(H-T₁₁C 和③) 2.SI(H-T₁₁C 和③) 3.SC(H-T₁₁C 和⑨)
4.SI(H-T₁₁C 和⑨) 5.SC(H-T₁₁C 和⑩) 6.SI(H-T₁₁C 和⑩)

图11 芸芥开花当天柱头 mRNA 差异显示结果

Fig.11 Differential display of mRNA from flowering stigma

采用2.5.1中所筛选出的18个引物组合对芸芥SC与SI开花后柱头mRNA进行DDRT-PCR扩增,结果同2.2.2中所述。同时,本实验中也发现差异条带多出现在以H-T₁₁C为锚定引物的扩增图谱中。

3 讨论与小结

3.1 芸芥自交亲和性与自交不亲和性是由一对核基因控制的简单遗传性状

本研究所试验的18个不同F₁杂交组合中,所有F₁植株都表现自交不亲和性,说明芸芥自交亲和性是由细胞核基因控制的遗传性状。关于自交不亲和和植物自交亲和性的遗传,Hiranata等人^[12]对白菜型油菜托里亚杂交后代的研究指出,自交亲和性也表现为隐性遗传性状。芸芥和白菜型油菜都属于十字花科油料作物,其自交亲和性与自交不亲和性的显隐性关系表现出相似性,即自交亲和性对自交不

亲和性为隐性遗传性状。

通过对芸芥不同杂交组合后代 F_2 和 BC_1 群体的自交亲和性情况研究,表明 F_2 群体和 BC_1 群体的自交亲和性都发生了性状分离现象,出现自交亲和株与自交不亲和株两种类型。 F_2 群体中性状分离比例为 3:1,而 BC_1 群体中性状分离比为 1:1,表明芸芥自交亲和性是由一对基因控制的简单遗传性状。魏文慧等人^[13]以自交亲和与自交不亲和的白菜型油菜为材料进行研究,发现自交亲和性是由一对基因控制的简单遗传性状。Hiranata 对白菜型油菜托里亚杂交后代的研究指出,自交亲和性也表现为一种简单的遗传性状。

3.2 芸芥自交亲和基因的表达属于组织特异性表达

本研究中,笔者采用 DDRT-PCR 技术,分析了处于不同发育时期的同一种器官(营养器官或生殖器官)中 mRNA 的差异条带。结果发现,处于不同发育时期的根、茎、叶和花瓣,在芸芥 SC 和 SI 的 mRNA 差异显示谱带中都未出现差异条带;而处于不同发育时期的柱头,在芸芥 SC 和 SI 的 mRNA 差异显示谱带中检测到差异条带。可见,芸芥自交亲和基因并不在根、茎、叶和花等营养器官中表达,而在柱头组织中表达,这说明芸芥自交亲和基因的表达不属于组成性表达,而属于组织特异性表达。

有研究者经过免疫化学和原位杂交表明,SLG 既不存在于芸苔属植物的叶、根和苗等营养组织中,也不存在于子房和花柱中,而是在成熟柱头乳突细胞的细胞壁上大量积累^[14]。SLG 的表达时间和植物自交不亲和性的表达时间相关,当表现自交不亲和性时,柱头中 SLG 的含量可高达柱头总蛋白量的 5%。由于本研究中采用的芸芥 SC 是从自交不亲和群体中选育出来的,该 SC 与 SI 是近等基因系,而且芸芥自交亲和性与自交不亲和性是一对相互对应的性状,这些研究事实都证明,芸芥自交亲和基因的表达仅限于柱头组织中,体现出了组织特异性表达的特性。

3.3 与芸芥自交亲和性相关的 cDNA 片段

在不同生长期 SI 柱头的 mRNA 扩增中共得到 2 条稳定性较好的 cDNA 片段,其中一条介于 500 ~ 600 bp 之间,另一条约等于 750 bp。同时,在芸芥 SC 柱头 mRNA 扩增中共得到 3 条能稳定出现的 cDNA 片段,第一条小于 100 bp,第二条分子量为 300 bp,第三条介于 750 ~ 1 000 bp 之间,这 3 条差异 cDNA 片段与芸芥自交亲和基因的表达有密切关系。究其原因可能有:首先在选材上,芸芥 SC 自交亲和性稳定,自交亲和程度高,突变体经连续自交 8 代,自交

亲和指数稳定在 14 左右,相对自交亲和指数稳定在 95% 左右,荧光染色法分析花粉-柱头互作反映,均表现自交亲和,属高度自交亲和突变体;其次在进行 DDRT-PCR 分析时,采用芸芥自交不亲和系 SI 作对照,对照的自交不亲和性稳定,自交不亲和程度高,经过连续 7~8 代的自交,自交亲和指数均小于 1,属高度自交不亲和系,本研究所采用的自交亲和材料和自交不亲和材料可以认为是一对只在亲和位点存在遗传差异的近等基因系,这样可排除与自交亲和性无关的基因表达差异带所造成的干扰。另外,采用尽可能多的不同引物组合对同一生长期的 mRNA 样品进行扩增,同时还作了重复,这样就保证实验结果的可靠性。

参考文献:

- [1] 官春云,李方球,李 桐,等.芸芥对菌核病的抗性研究[J].中国农业科学,2004,37(8):1138-1143.
- [2] 孙万仓,官春云,张金文,等.中国芸芥遗传多样性 RAPD 标记分析[J].中国农业科学,2003,36(11):1248-1253.
- [3] 钟 军,戴林健,李 桐,等.芸芥种质资源的遗传多样性研究[J].中国油料作物学报,2004,26(2):1-5.
- [4] Sun Wancang, Pan Qiyuan, Liu Zigang, et al. Overing self-incompatibility in *Eruca sativa* by chemical treatment[J]. Plant Genetic Resources, 2005,3(1):13-18.
- [5] Wang Xuefang, Fan Huiling, Sun Wancang. Ananalysis of self-compatibility in *Eruca sativa* Mill[C]//Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress. Wuhan, China: Science Press USA Inc. 2007, 1:374-376.
- [6] Sun Wancang, Guan Chunyun, Zhang Jinwen. RAPD assessment of genetic diversity of yunjie(*Eruca sativa* Mill.) in China[J]. Agricultural Sciences in China, 2003,2(11):1198-1204.
- [7] 何余堂,马朝芝. PCR 步行法克隆油菜自交不亲和基因[J].中国油料作物学报,2004,26(4):1-5.
- [8] Tsukada H, Kakeda Y K, Kowayama. A self-compatible mutant S allele conferring a dominant negative effect on the functional S allele in *ipomoea trifida*[J]. Sex Plant Reprod, 2000,13:119-125.
- [9] Nathanael R, Hauck, Hisayo Yamane, et al. Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry(*Prunus cerasus* L.)[J]. Sex Plant Reprod, 2002,15:39-46.
- [10] Fujimoto R, Sugimura T, Nishio T. Gene conversion from SLN to SRK resulting in self-compatibility in *Brassicarapa*[J]. Febs Letters, 2006,580(2):425-430.
- [11] 王保成,孙万仓,范惠玲.芸芥自交亲和系与自交不亲和系 SOD、POD 和 CAT 酶活性研究[J].中国油料作物学报,2006,28(2):107-109.
- [12] Hiranata K, Nishio T. S-allele specificity of stigma proteins in *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*[J]. Heredity, 1978,41:93-100.
- [13] 魏文慧.白菜型油菜自交亲和性的遗传及 SSR 标记[D].兰州:甘肃农业大学,2009:26-29.
- [14] 朱利泉,王晓佳.自交不亲和植物 S-位点特异糖蛋白[J].生命的化学,1998,18(3):13-15.

Analysis of self-compatibility genes by mRNA differential display technique and inheritance of self-compatibility in *E. sativa* Mill

FAN Hui-ling¹, BAI Sheng-wen¹, ZHANG Fen-qin¹, XIAO Zhan-wen¹,

CHEN Xiu-bin¹, SUN Wan-cang^{2*}

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China;

2. Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: 18 hybridized combinations were made between 8 self-compatible lines and 4 self-incompatible lines, and inheritance of self-compatibility in *E. sativa* Mill was analysed. Furthermore, expression tissue of self-compatible genes was preliminary analysed, and specific cDNA fragments related to self-compatibility were isolated and screened by using mRNA differential display technique. The results showed that all the F₁ plants were self-incompatible, and the F₂ and BC₁ population segregated in ratio. Through chi square test, the segregation ratios of self-incompatibility to self-compatibility in F₂ and BC₁ population were coincided with the ratio of 1:3 and 1:1, respectively. Therefore, it was inferred that the hereditary of self-compatibility in Yunjie was controlled by one pair recessive nucleus gene. Self-compatible genes of Yunjie was not constitutive expression, but that belonged to specific tissue expression. Self-compatible lines had 3 differentially expressed bands which exhibited stably with different primers, these cDNA bands were closely related to self-compatibility of Yunjie.

Keywords: *E. sativa* Mill; inheritance of self-compatibility; self-compatible genes; mRNA differential display

(上接第22页)

Analysis of adaptility of *Brassica rapa* winter rape cultivars in cold and dry regions of North China

CHEN Jiao-rong¹, SUN Wan-cang^{1*}, FANG Yan², ZENG Xiu-cun¹, WU Jun-yan¹,

LI Xue-cai¹, HE Li¹, ZHAO Cai-xia¹, SHI Peng-hui¹

(1. Gansu Provincial Key Laboratory of Arid Land Crop Sciences, Lanzhou 730070, China;

2. Research and Testing Center of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The regional trials were conducted to compare the winter survival rate, the growth period and yield of *Brassica rapa* winter rape cultivars in order to analyse their adaptility. The results showed that Longyou 6 and Longyou 7 had the highest winter survival rates, being 86.40% and 85.53% respectively, which were significantly higher than CK (Tianyou 2), while the winter survival rates of Tianyou 5, Tianyou 7 and Tianyou 8 were all lower than CK. The growth period of the same winter rape cultivar varied much in different sites. For example, the growth period of Longyou 6 was 300 days in Qinwangchuan, but it was only 251 d in Khotan and was 49 d earlier than that in Qinwangchuan. The growth periods of different winter rape cultivars had large difference. For example, the growth periods of Longyou 6 and Longyou 7 were 300d in Qinwangchuan, while that of Longyou 8 was 285 d there. The others were 290 days, with 10d earlier than that of Longyou 6. The agronomic traits and average yield also varied greatly in different sites. In conclusion, the strain productivity and stability of Longyou 8, Longyou 7 and Longyou 6 were the best, followed by Longyou 9. The suitability of winter rape cultivars in different ecological regions was also different. Longyou 6 and longyou 7 were the most suitable cultivars in Beijing and its surrounding areas, west Xinjiang and north-central Gansu, Hexi corridor and Jingbian surrounding areas in Shaanxi. The Longyou 8 and Longyou 9 were the most suitable cultivars in south Xinjiang, and Tianyou 2, Tianyou 5 and Tianyou 8 were also suitable in this region.

Keywords: winter rape; winter survival rate; growth period; productivity; stability; cold and dry regions of North China