

与黄独 (*Dioscorea bulbifera*) 性别相关的 RAPD - SCAR 标记研究

王筱璐, 杭悦宇^①, 周义峰, 吴宝成

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园)江苏省植物迁地保护重点实验室, 江苏 南京 210014]

摘要: 对黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 14 个居群 42 个单株的总 DNA 进行 RAPD 分析, 并根据测序结果合成 1 对特异的 SCAR 引物, 即 5'-GGCTTCTGTCCTACTACATGGG-3' 和 5'-GGCTTCTGTCCAGTGCATCT-3', 对 42 个单株的总 DNA 进行检测, 扩增到 1 条长 681 bp 的与雄性相关的特异片段。除形态上有一定变异的 4 个单株外, 这个与雄性相关的 RAPD - SCAR 标记在黄独原变种的 29 个单株中验证准确, 在可能为其变种的 9 个单株中部分验证准确, 表明该 RAPD - SCAR 标记能够准确标记黄独的原变种及一些变种的雄性性别。

关键词: 黄独; 变种; 雄性性别; RAPD - SCAR 标记

中图分类号: S567.23+9; Q344+.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2007)02-0001-05

Study on sex-associated RAPD-SCAR marker of *Dioscorea bulbifera* WANG Xiao-lu, HANG Yue-yu^①, ZHOU Yi-feng, WU Bao-cheng (Jiangsu Provincial Key Laboratory for Plant *Ex-situ* Conservation, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(2): 1-5

Abstract: The total DNA of 42 individuals in fourteen populations of *Dioscorea bulbifera* L. were analyzed by RAPD technique. According to the obtained sequences, a pair of 20-mer specific primers, i. e. 5'-GGCTTCTGTCCTACTACATGGG-3' and 5'-GGCTTCTGTCCAGTGCATCT-3', were designed and synthesized as SCAR primers. The total DNA of 42 individuals were tested by these SCAR primers. A male-associated fragment about 681 bp was amplified. The diagnostic reliability of male-associated RAPD-SCAR specific marker was verified on all 29 individuals of *D. bulbifera* var. *bulbifera* except four individuals which had the morphological variation, and some of nine individuals which might be varieties of *D. bulbifera*. It is indicated that the RAPD-SCAR specific marker can be used correctly for screening male gender of *D. bulbifera* var. *bulbifera* and some other varieties of it.

Key words: *Dioscorea bulbifera* L.; variety; male gender; RAPD-SCAR marker

黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 为薯蓣科 (*Dioscoreaceae*) 薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 植物, 是世界广布种, 在中国主要分布于河南南部、安徽南部、江苏南部、浙江、江西、福建、台湾、香港、广东、广西、湖北、湖南、陕西西部、甘肃南部、四川、贵州及云南等地^[1]。

由于薯蓣属植物繁育系统极为复杂, 野生状态下有性繁殖和无性繁殖并存, 因此, 许多种类是天然多倍体。黄独染色体基数在其分化中心(南非)为 9 或 10, 往东的旧大陆为 10, 往西的新大陆为 9^[2]; 其染色体倍性更为复杂, 如来源于海南吊罗山、福建南靖和云南蒙自的黄独染色体数分别为 $2n = 40$ 、 $2n = 60$ 和 $2n = 80$ ^[3]。由于染色体在复制过程中易畸变,

因此, 有些居群仅有 2/3 的染色体被正常复制^[2]。薯蓣属植物常雌雄异株, Martin 等用人工杂交方法对该属 5 个种的植株进行研究后认为, 雄性染色体可能是异质性的, 薯蓣属植物性别可能是由性染色体决定的, 但存在异议^[3]。由于薯蓣属植物的染色体多为点状或短棒状, 极小, 长度不超过 $3 \mu\text{m}$ ^[4], 无法采用染色体压片技术清楚地形态上分辨出 X 或 Y 染色体, 因此, 利用染色体形态对薯蓣属植物

收稿日期: 2007-01-15

基金项目: 中国科学院植物园与生物分类研究资助项目 (KSCX2-YW-Z-028)

作者简介: 王筱璐 (1982-), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 主要从事植物繁育生物学研究。

^① 通讯作者 E-mail: hangyueyu@21.cn.com

的性别进行鉴定较为困难。

RAPD 技术已成功应用于白麦瓶草 (*Silene latifolia* L.)^[5]、石刁柏 (*Asparagus officinalis* L.)^[6]、黄瓜 (*Cucumis sativus* L.)^[7] 及猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.)^[8] 等植物的性别差异研究中。SCAR (sequence characterized amplified region) 分子标记^[9] 是根据 RAPD 分子标记的序列分析结果, 采用 20~28 bp 的特异引物进行 PCR 扩增得到的, 是对基因组限定区域的可重复性扩增。目前, RAPD-SCAR 标记技术已成功用于许多植物的性别研究, 如 Otto 等获得了大麻 (*Cannabis sativa* L.) 与 Y 染色体连锁的 RAPD-SCAR 雄性标记^[10]; Urasaki 等获得的 RAPD-SCAR 雄性标记可精确快速地用于番木瓜 (*Carica papaya* L.) 的早期性别鉴定^[11]。

作者拟采用 RAPD-SCAR 标记技术探讨黄独

雌雄性别间的基因组差异, 从而筛选出与黄独性别相关的分子标记, 为黄独性别相关基因的克隆提供理论依据, 也为薯蓣属植物的性别研究和探讨提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

野外采集黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 14 个居群的 42 个单株, 引种至江苏省·中国科学院植物研究所薯蓣种质圃内栽培, 常规田间管理; 凭证标本存于江苏省·中国科学院植物研究所, 采集地点及采集号见表 1。于 2006 年盛花期时分别采集雌株和雄株的幼嫩叶片进行总 DNA 提取。

表 1 用于 RAPD-SCAR 标记分析的黄独样品的来源及数量

Table 1 Sources and number of *Dioscorea bulbifera* L. samples used for analysis of RAPD-SCAR marker

编号 No. of sample	采集地 Locality	生长习性 Habit	采集号 No. of collection	雌株数 Number of female	雄株数 Number of male
1	四川汶川 Wenchuan, Sichuan	野生 Wild	周义峰, 等 200308019	5	0
2	四川都江堰 Dujiangyan, Sichuan	野生 Wild	周义峰, 等 200308021	0	1
3	四川峨眉山 Emei Mountain, Sichuan	野生 Wild	周义峰, 等 200308001	3	9
4	广西田林 Tianlin, Guangxi	野生 Wild	黄春洪, 等 200211067	1	1
5	云南景洪 Jinghong, Yunnan	野生 Wild	黄春洪, 等 200212112	1	0
6	广东韶关 Shaoguan, Guangdong	野生 Wild	黄春洪, 等 200211037	1	0
7	台湾 Taiwan	野生 Wild	Caijinlai 200212132	2	0
8	重庆南川 Nanchuan, Chongqing	栽培 Cultivated	周义峰, 等 200308034	2	0
9	云南景洪 Jinghong, Yunnan	栽培 Cultivated	黄春洪, 等 200211090	3	0
10	云南蒙自 Mengzi, Yunnan	野生 Wild	黄春洪, 等 200212102	1	2
11	广西龙州 Longzhou, Guangxi	野生 Wild	黄春洪, 等 200211059	0	3
12	云南丽江 Lijiang, Yunnan	野生 Wild	黄春洪, 等 200211077	0	1
13	海南吊罗山 Diaoluo Mountain, Hainan	野生 Wild	周义峰, 等 200309013	0	3
14	海南吊罗山 Diaoluo Mountain, Hainan	野生 Wild	周义峰, 等 200309006	3	0
Total				22	20

实验用 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂ 及 10 × PCR buffer 缓冲液均购自上海申能博彩生物科技有限公司; 10 bp 随机引物及特异引物购自上海英骏生物科技有限公司; 实验用琼脂糖购自南京赛吉生物科技有限公司; DNA 纯化试剂盒购自北京莱博生物实验材料研究所; 100 bp DNA 分子标记物购自 Takara(宝)生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的制备及 DNA 池的构建 参照 Paterson 等^[12] 的 CTAB 法提取总 DNA, 并用 DNA 纯

化回收试剂盒进行 DNA 纯化, 回收的总 DNA 溶解于灭菌的双蒸水中, -20 °C 保存备用。

为提供具有相同遗传背景的雌、雄性总 DNA 样品, 取雌、雄株齐全的来源于四川峨眉山、广西田林和云南蒙自 3 个居群的雄株和雌株各 1 株的叶片, 按上述方法分别提取总 DNA, 再将同性别的 DNA 样品等量混合, 分别建成雄性和雌性 DNA 池 (DNA pools)。

1.2.2 随机引物的筛选 随机引物筛选采用 Michelmores 的混合分组分析法 (BSA)^[13] 进行。扩增

反应体系总体积为 20 μL , 反应液包括 2 μL 10 \times PCR buffer, 1.2 μL 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 2 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.8 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 随机引物和 20~50 ng 模板 DNA。

PCR 扩增反应在 PE-9600 PCR 扩增仪上进行。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 然后于 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 38 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 共 35 个循环反应; 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

反应结束后, 以 100 bp DNA Ladder 为分子量标记, 用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 检测 PCR 扩增结果, 溴化乙锭 (EB) 染色后, 紫外凝胶成像系统观察并拍照。

1.2.3 特异引物的获得 按上述方法和条件, 利用筛选出的随机引物对雄性和雌性 DNA 池进行 PCR 扩增, 产物经纯化、转质粒后, 挑选 1 个克隆进行测序, 并根据 DNA 序列分析结果, 设计 1 对长 20 bp 的特异引物。测序和引物设计工作由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2.4 RAPD-SCAR 分子标记的获得 以黄独 14 个居群 42 个单株的总 DNA 为模板, 用上述特异引物进行 PCR 扩增。除将扩增条件调整为上下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.6 μL 、DNA 50 ng、62 $^{\circ}\text{C}$ 退火外, 其他条件与 RAPD 分析时相同。根据扩增产物电泳图谱中出现的条带及其迁移率确定是否为

RAPD-SCAR 标记。

2 结果和分析

2.1 RAPD 标记的获得

100 个随机引物经 PCR 筛选后得到的最适引物为 AU04 (5'-GGCTTCTGTGTC-3'), 用其对黄独雌性和雄性 DNA 池进行扩增, 得到 1 条长约 700 bp 的与雄性相关的特异片段。

2.2 特异片段的测序结果及特异引物的设计

与雄性相关的特异片段的测序结果见图 1。该片段长 681 bp, 含有多个终止子, 属非编码序列。将该序列与 Genbank 中的序列进行比对, 未发现与之同源的序列。

根据全序列设计 SCAR 标记特异引物, 引物 1 为 5'-GGCTTCTGTGTCCTACTACATGGG-3', 引物 2 为 5'-GGCTTCTGTGCCAGTGCATCT-3'。

2.3 与黄独性别相关的 RAPD-SCAR 标记分析

用 SCAR 引物对黄独 14 个居群 42 个单株总 DNA 的 PCR 扩增结果表明 (图 2), 16 个雄性单株的 DNA 均能扩增出 1 条相应于 RAPD 标记的雄性特异条带 (图 2: 1-16), 其中有 3 个单株的条带很淡 (图 2: 14-16), 而其他 4 个雄性单株和 22 个雌性单株均不能扩增出此条带。

```

5'-GGCTTCTGTGTCCTACTACATGGGATGAGGTGGTAGAGGCTTTTCTCGCATGATACTTCTTGT
TGGAAAACCCAGCAAAGCATAACAATGAAATCTTCTCCTATGTACAAAATAAGCGGGAGTCCCT
ATTTGAGACTTGGGAGAAAATTTAAGGATCTCTTGTGGCGGTGCCCCAACATGGATTCTCCATT
GGATGCTAGCTCACACATTTCTTATGGGCTCAATTTGAGCACTAGGTAACCTTATAGATGTCATT
GCAAGAGGTAATTTGGTAACAAGACCTAGAAGATGCTAGACAGCTCATAGACTGTCACGCCT
GGACCCCGGACATGGCACACAACATACCGCCATGACAACCCAACGAAAGTGAACACCGCC
AAGACCATGAGTTATCGTAAGGATAGCATAATTTCTGTTTACAAACACTGCTATAACTGGGAAA
GATAACAACCTCATGATGATATATTCTCAAGAAAATATATATACCCATAAGGTAATACATGTCCT
CAATACGAGTTTAAATACAACAGTTTGACATTAACAAGCTTAGAATTTCCAAGATAGAAGAACA
AAATGCAAGAAATCCAAATGAATACACTAATGGATCCCATGACTACATGTCACAACAGATAAG
AAGACCTACACAATGCAATACAAGAGATGCACTGGACAGAAAGCCAATC-3'

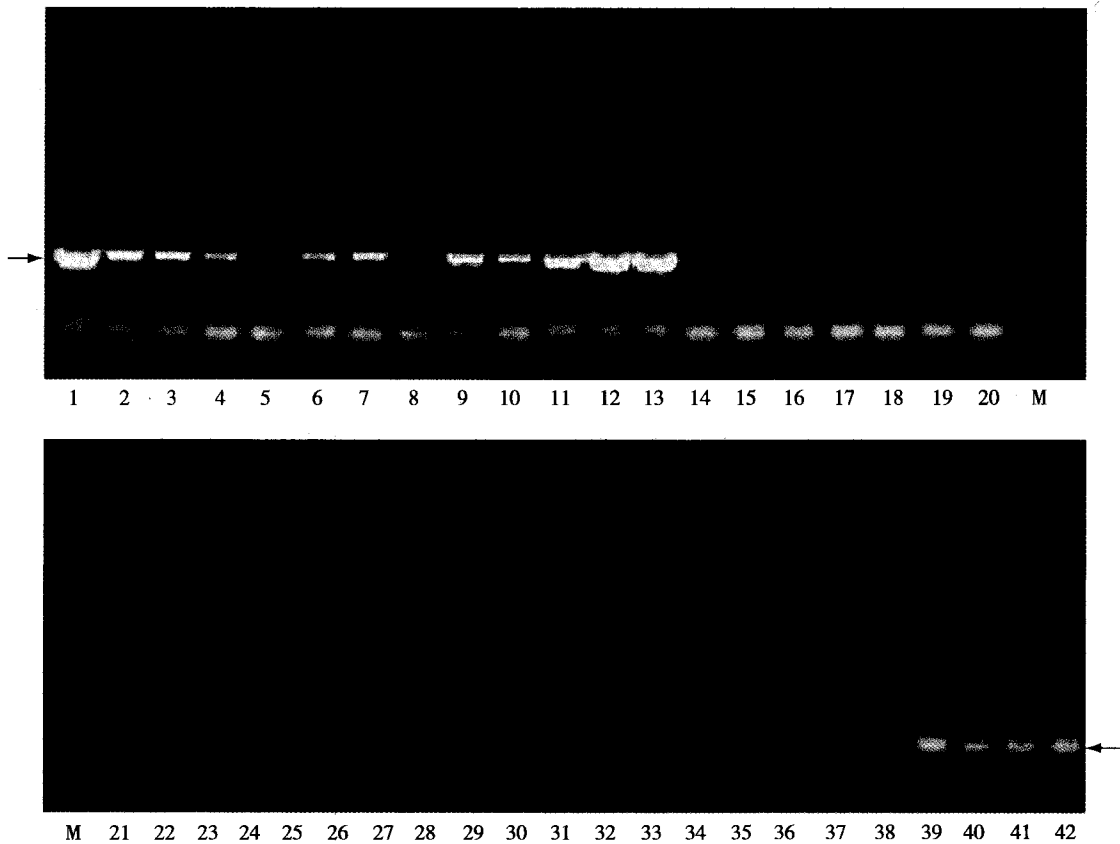
```

(3'-TCTACGTGACCTGTCTTCGG-5')

有下划线的序列为引物 AU04 的序列 The sequence underlined shows the sequence of primer AU04; 黑体字表示 2 条 SCAR 引物序列 The bold letters show the sequences of two primers of SCAR marker.

图 1 与黄独雄性相关的特异片段的全序列

Fig. 1 Complete sequence of male-associated fragment of *Dioscorea bulbifera* L.



M: 100 bp ladder DNA marker; 1-20. 雄性单株 Male individuals; 1-9. 四川峨眉山 Emei Mountain, Sichuan; 10. 四川都江堰 Dujiangyan, Sichuan; 11. 广西田林 Tianlin, Guangxi; 12-13. 云南蒙自 Mengzi, Yunnan; 14-16. 广西龙州 Longzhou, Guangxi; 17. 云南丽江 Lijiang, Yunnan; 18-20. 海南吊罗山 Diaoluo Mountain, Hainan. 21-42. 雌性单株 Female individuals; 21-23. 四川峨眉山 Emei Mountain, Sichuan; 24-28. 四川汶川 Wenchuan, Sichuan; 29-30. 重庆南川(栽培) Nanchuan, Chongqing (cultivated); 31. 广东韶关 Shaoguan, Guangdong; 32. 广西田林 Tianlin, Guangxi; 33-35. 云南景洪(栽培) Jinghong, Yunnan (cultivated); 36-37. 台湾 Taiwan; 38. 云南蒙自 Mengzi, Yunnan; 39-41. 海南吊罗山 Diaoluo Mountain, Hainan; 42. 云南景洪 Jinghong, Yunnan. 左箭头所示为与黄独雄性相关的 SCAR 标记, 右箭头所示为引物二聚体 The left arrow shows the male-associated SCAR markers of *D. bulbifera*, the right arrow shows the primer-dimers.

图2 与黄独雄性相关的 RAPD-SCAR 标记的单株检测结果

Fig. 2 Test results on male-associated RAPD-SCAR marker of *Dioscorea bulbifera* L. with individual plants

3 讨 论

《中国植物志》^[1]及《Flora of China》^[14]认为中国薯蓣属基生翅组仅有黄独 1 种,但有研究者提出黄独在中国有 4 个变种,包括原变种黄独、大花黄独 (*D. bulbifera* var. *simbha* Prain et Burkill)、三角叶黄独 (*D. bulbifera* var. *deltoidea* Prain et Burkill) 和宽叶黄独 (*D. bulbifera* var. *vera* Prain et Burkill)^[15]。在野外调查采集和对国内各大标本馆馆藏标本观察分析基础上,笔者发现在中国有大花黄独的分布,并且还可能存在一些新的变种和新的分布,如异叶黄独 (*D. bulbifera* var. *heterophylla* Prain et Burkill)^[16]及白山山药 (*D. bulbifera* var. *albitubera* C. T. Ting et Z. L.

Xu)^[17]等。本研究中,作者根据植株形态及其他相关性状将来源于云南蒙自的样品新拟为新变种短序黄独 (*D. bulbifera* var. *brachybotryum* Y. F. Chou et Y. Y. Hang) (另文发表); 而采自海南吊罗山的样品经鉴定可能为异叶黄独。研究发现,除以上 2 个来源地的样品外,在 RAPD-SCAR 标记分析中,15 个黄独原变种的雄性单株出现了较复杂的实验结果,11 个雄株出现了与雄性相关的 RAPD-SCAR 标记条带,且条带很亮,但采自广西龙州的 3 个雄株此条带很淡,采自云南丽江的 1 个雄株无此条带。前述的后 4 个雄性单株在形态上与其他 11 个雄性单株有一定的差异,即雄花的穗状花序中有 1 枝突变为圆锥花序,并且遗传关系也与其他 11 个单株相距较远^[18],因此,用与雄性相关的 RAPD-SCAR 标记

进行检测,就表现为条带不清晰甚至没有该 RAPD - SCAR 标记条带。

在对与黄独雄性相关的 RAPD - SCAR 标记进行单株检测时发现,采自云南蒙自的新拟变种的 2 个雄株均出现了与原变种一样的亮带,并且更宽更亮。这与根据分子标记^[18]和主要化学成分^[16]进行的亲缘关系的研究结果一致。

可能是变种异叶黄独的海南吊罗山的 3 个雄性单株不能扩增出相应的 RAPD - SCAR 标记条带。对黄独及其变种遗传多样性的研究表明^[18],异叶黄独主要分布在海南岛,地理阻隔妨碍了物种之间的基因交流,经过长期的演化,已在海南岛稳定演化成异叶黄独。

黄独种内分化复杂,通过本研究筛选得到的与黄独雄性相关的 RAPD - SCAR 标记可能与物种有关,而与 Y 染色体无关。该标记或许还会随着黄独变种的进化而衰退,甚至消失。

参考文献:

- [1] Ding Z Z, Gilbert M G. Flora of China (Vol. 24) [M]. Beijing: Science Press, St. Louis: MBG Press, 2000. 276 - 296.
- [2] Martin F W, Sonia O. Chromosome numbers and behavior in some species of *Dioscorea* [J]. Cytologia, 1963, 28: 96 - 101.
- [3] Martin F W. Sex ratio and sex determination in *Dioscorea* [J]. Journal of Heredity, 1966, 57: 95 - 99.
- [4] 秦慧贞, 张美珍, 凌莘莘, 等. 中国薯蓣属细胞分类的研究——染色体数与该属起源和演化 [J]. 植物分类学报, 1985, 23(1): 11 - 18.
- [5] Mulcahy D L, Weeden N F, Kessel R, et al. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm [J]. Sex Plant Reprod, 1992, 5: 86 - 88.
- [6] Jiang C X, Sink K C. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in *Asparagus* [J]. Euphytica, 1997, 94: 329 - 333.
- [7] 陈劲枫, 娄群峰, 余纪柱, 等. 黄瓜性别基因连锁的分子标记筛选 [J]. 上海农业学报, 2003, 19(4): 11 - 14.
- [8] Harvey C F, Gill G P, Fraser L G, et al. Sex determination in *Actinidia* 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis* [J]. Sex Plant Reprod, 1997, 10: 149 - 154.
- [9] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce [J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 985 - 993.
- [10] Ottó T, Nándor B, Erzsébet K, et al. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MAD6) in hemp [J]. Euphytica, 2002, 127: 209 - 218.
- [11] Urasaki N, Tokumoto M, Tarora K, et al. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 281 - 285.
- [12] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP of PCR analysis [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11(3): 122 - 127.
- [13] Michelmore R W. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific regions by using segregating populations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828 - 9832.
- [14] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第十六卷 第一分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1985. 88 - 89.
- [15] Prain D, Burkill I H. An account of the genus *Dioscorea* in the East. I. The species which twine to the left [J]. Ann Roy Bot Gard, 1936, 14: 117.
- [16] 周义峰. 中国薯蓣属黄独分类及遗传多样性研究 [D]. 南京: 江苏省·中国科学院植物研究所, 2006. 5 - 21, 35 - 37.
- [17] 丁志遵, 徐增莱, 秦慧贞. 黄药子专题 [A]. 徐国钧, 徐珺珊, 王峥涛. 常用中药材品种整理和质量研究 (南方协作组, Ⅲ) [C]. 福建: 福建科学技术出版社, 1999. 239.
- [18] 郑玉红, 夏冰, 杭悦宇, 等. 黄独遗传多样性研究 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(10): 2011 - 2017.