

适于南瓜遗传多样性分析的 RAPD 引物筛选

李海英^{1,2}, 赵晓萌¹, 赵福宽¹, 秦勇²

(1. 北京农学院生物技术系, 北京 102206 2. 新疆农业大学园艺学院, 乌鲁木齐, 830052)

摘要: 采用 CTAB 法提取南瓜 DNA 基因组, 优化的 RAPD 反应体系, 对 RAPD 随机引物进行了筛选, 从 260 条引物中筛选出多态性好、稳定性高的引物 26 条作为南瓜 RAPD 分析引物, 为进一步进行南瓜遗传多样性分析提供依据。

关键词: 南瓜; RAPD; 引物

中图分类号: S642.103.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2006)01-0020-03

南瓜是栽培广泛的蔬菜作物之一。其栽培价值、营养价值和药用价值都很高, 南瓜对于糖尿病和高血压有良好的辅助治疗作用。其对环境的适应性强、分布地域广, 在长期的进化和栽培历史中形成了许多种群和品种群, 其栽培种主要有中国南瓜(*Cucurbita. Moschata*), 又名倭瓜、饭瓜; 印度南瓜(*C. maxima*), 又名笋瓜; 美洲南瓜(*C. pepo*), 又名西葫芦。南瓜的种质资源极为丰富, 种质资源亲缘关系研究是蔬菜育种工作的重要组成部分, 而 DNA 分子水平上的遗传多样性更有助于阐明亲缘关系和正确分类^[1-3]。

RAPD 技术从 DNA 分子水平反映了基因组的多态性, 因而能揭示个体间的差异和物种的相关性。一般可以根据各品种指纹图谱的差异程度, 判断品种间亲缘关系的远近, 通过测量品种之间的遗传距离, 进行系谱分析和分类研究。但是, 不是所有的随机引物对南瓜 PCR 扩增都有良好的多态性, 所以必须先筛选出条带清晰、重复性好、多态性高的引物, 这对下一步 RAPD 分子标记很关键, 也减少了试验工作量^[4-5]。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试南瓜材料共 12 份, 包括中国南瓜、印度南瓜和美洲南瓜 3 个栽培种各 4 份材料。幼苗两叶一心时取幼嫩叶片, 每个品种取 5 株, 用于提取基因组 DNA。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取。具体步骤如下: 首先, 将南瓜叶片剪取约 4 g(克)放入研钵中, 迅速倒入液氮研磨至细粉状, 移入 1.5 ml(毫升)的 Eppendorf 管中, 同时加入 400 μ l(微升)于 65 $^{\circ}$ C 预热的 SDS-DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl pH=8.0, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Na_2EDTA , 1.5% SDS, 1%~2%的 β -巯基乙醇), 震荡混匀。放入 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 45 min(分钟), 待冷却至室温后加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)混合液, 缓慢反复倒置混匀, 4 $^{\circ}$ C 下以 14 000 r(转)/min(分钟)离心 10 min(分钟)。取出上清液重复抽提一次。再次取上清液, 并加入 2/3 体积的预冷的异丙醇, 充分混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱沉淀 DNA 一晚。第二

天取出后, 4 $^{\circ}$ C 下以 12 000 r(转)/min(分钟)离心 5 min(分钟)沉淀 DNA。去除上清液, 加入无水乙醇静置在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 30 min(分钟), 取出后, 4 $^{\circ}$ C 下以 12 000 r(转)/min(分钟)离心 5 min(分钟)。吸出剩余无水乙醇, 用 75% 酒精反复洗涤, 充分干燥, 最后将得到的沉淀 DNA 溶于 100 μ l(微升) 0.1 \times TE 缓冲液中, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.2 DNA 的质量检测

1.2.2.1 DNA 的电泳检测 取 100~200 ng(纳克)DNA 样品, 以 λ DNA/HindIII 为标准, 在 0.8% 琼脂糖凝胶中在 70 V 电压电泳, EB 染色, 在凝胶成像分析系统下照相, 记录结果, 分析检查 DNA 的质量。

1.2.2.2 DNA 紫外吸光值 取 10 μ l DNA 溶液, 稀释到 500 μ l(微升), 在 Eppendorf Biophotometer 6131 型分光光度计上测定波长 260 nm, 280 nm, 230 nm(纳米)的光吸收值, 检测 DNA 浓度和纯度。

1.2.3 RAPD-PCR 扩增 扩增反应在 PCR 仪(美国热电 PXE)上进行, 反应的总体积 25 μ l(微升), 其中含 40 ng~80 ng(纳克)模板, 引物 24 ng(纳克), 10 \times 反应 buffer(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, 80 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH9.0 NP-40) 2.5 μ l(微升), 3 mmol/L MgCl_2 , 0.2 mmol/L dNTPs, Taq 酶 1.0 U 加入 ddH₂O 至 25 μ l(微升)混匀。PCR 基本扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min(分钟), 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s(秒), 37 $^{\circ}$ C 退火 30 s(秒), 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s(秒), 进行 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min(分钟)。

2 结果与分析

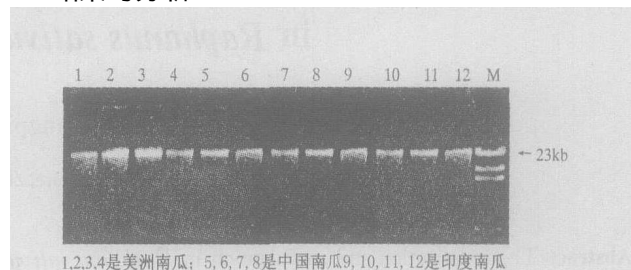


图1 琼脂糖凝胶电泳检测结果

2.1 DNA 的提取

提取高质量的 DNA 是南瓜 RAPD 分子标记研究的基础, 本实验采用 CTAB 法提取南瓜基因组 DNA。经测定, 供试材料

*基金项目: 北京市教委和农业应用新技术北京市重点实验室

资助项目。

收稿日期: 2005-09-21

DNA 的OD_{260/280}分布在 1.6~1.9 之间, OD_{260/280}分布在 1.9~2.2 之间, 表明用 CTAB 法提取的基因组 DNA 纯度高、质量好。样

品主带清晰、无降解。电泳分析结果见图 1。

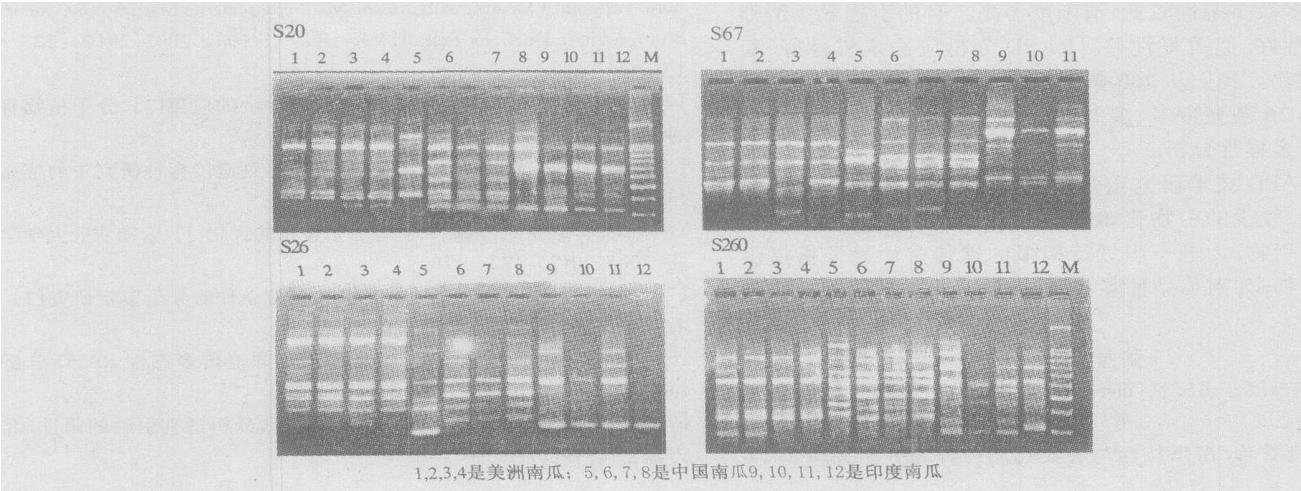


图2 筛选的部分引物扩增带型

表 1 南瓜遗传多样性分析引物筛选结果统计

引物编号	引物序列	扩增出的总带数	多态性带
S14	TCGCTCTGG	8	7
S20	GGACCCCTAC	11	9
S26	GGTCCCTGAC	14	11
S37	GACCGCTTGT	9	7
S41	ACCGGAAGG	9	6
S67	GTCOCGACGA	12	10
S121	ACGGATCCTG	8	7
S133	GGCTGCAGAA	8	8
S145	TCAGGGAGGT	10	8
S160	AACGGTGACC	13	9
S161	ACCTGGACAC	7	7
S193	GTCGTTCTTG	11	8
S241	ACGGACGTCA	11	9
S253	GGCTGGTTCC	8	8
S260	ACAGCCCCCA	9	8
S266	AGGCCGATG	10	9
S273	CACACGGAAC	10	10
S281	GTGGCATCTA	10	10
S290	CAAACGTGGG	12	10
S314	ACAGGTGCTG	9	8
S327	CCAGGAGGAC	8	7
S421	CTCAGTTGG	9	9
S433	AGCGTCACTC	11	9
S436	AAGCGACCTG	9	7
S452	CAGTGCTGTG	10	9
S459	GGTGACGTT	11	9

2.2 扩增条件的优化

采用本实验室优化的南瓜 RAPD 反应体系进行 PCR 扩

增^[6]。在反应体系中加入不同浓度的 MgCl₂、dNTPs、模板 DNA 和不同的退火温度处理, 研究这些因素对扩增产物的影响, 得到了最佳的实际浓度和扩增反应条件。根据此体系所做的 RAPD 扩增条带清晰明亮、多态性高, 可以用于遗传多样性、分子标记及辅助育种等研究。

2.3 引物筛选

实验选有代表性、表型性状差异较大、来自不同地区的 12 份材料为试材^[8~9] (其中中国南瓜、印度南瓜和美洲南瓜各 4 个品种), 对 260 条随机引物进行筛选, 选出多态性高、条带清晰、重复性好、稳定性高的引物 26 条作为 RAPD 分析引物。其引物编号、序列及多态性带统计和筛选出的部分引物扩增带型见表 1 和图 2。

在所有的材料中, RAPD 反应扩增的条带分子量一般在 200~2000 bp。通过对南瓜基因组 DNA 的 PCR 扩增, 大多数的 RAPD 标记在南瓜种质间表现出多态性, 但不同引物扩增的结果在总带数、多态性带数、带型及带的亮度等方面都表现出了差异。带型好、多态性高、重复性好的随机引物是 s20、s26、s67、s260。从种质间的差异来看, 美洲南瓜、中国南瓜、印度南瓜三大栽培种之间, 多态性较高、差异较大。但在三者种内差异各不相同, 其中美洲南瓜(1~4)的 4 个不同品种, 带型整齐, 多态性不高, 种间差异不大。中国南瓜(5~8)条带最多, 多态性较高, 种内差异大, 其中 5 号品种与其他品种间差异最大。印度南瓜(9~12)带较少、多态性不高, 种内差异不明显。

3 讨论

3.1 南瓜基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取的 DNA 产量和纯度都较高, 对 DNA 样品进行 RAPD 扩增分析, 结果表明, 这些 DNA 样品均可扩增出谱带, 且扩增带型清晰度较高。说明少量的 RNA、部分蛋白、糖类物质对 PCR 扩增的结果无明显影响。另外模板中残留的氯仿、异戊醇等小分子有机物会影响 TaqDNA 聚合酶活性。为了得到纯度较高的 DNA, 保证 RAPD 的扩增结果, 最好抽提 2~3 次^[7]。

3.2 引物筛选

在实验过程中我们发现,多数引物在南瓜材料中能扩增出带,但大多数多态性较低、清晰度不高。有的引物虽然剪晰度高、多态性好,但重复性差。RAPD 分析应选重复性好、稳定性高的引物。我们从 260 条引物出 51 条多态性引物,又进一步筛选出 26 条亮带多、多态性较好、稳定性高的引物用于南瓜的遗传多样性分析。

利用 RAPD 技术研究南瓜的遗传多样性及鉴定品种的遗传距离时,较少的引物很难得到足够的特异性谱带。本实验筛选出的引物,为进一步进行南瓜的遗传多样性分析提供了大量的引物,为南瓜品种鉴定、种质资源的鉴定等深入研究提供了依据。

参考文献:

[1] 王鸣,南瓜属一多样性(diversity)之最[J].中国西瓜甜瓜,2002(3):42~45.

- [2] 魏瑛 董秀珍.南瓜特性与种类述略[J].北方园艺,1997,6(117):17~19.
- [3] sudhaka—Pandey; Jagdish—Singh; Upadhyay, A. K; Ram, D. Genetic variability for antioxidants and yield components in pumpkin (Cucurbita moschata Duch. ex Poir.). Vegetable—Science, 2002, 29(2): 123~126.
- [4] 梁美霞. RAPD 技术在蔬菜遗传育种上的应用[J]. 分子植物育种, 2003 1(56): 737~740.
- [5] 范丙友等. RAPD 技术在我国主要蔬菜遗传育种研究中的应用[J]. 中国蔬菜, 2002(3): 55~56.
- [6] 周辉 赵富宽. 南瓜 RAPD 分析体系的优化[J]. 云南农业大学学报, 2005 20(2): 172~178.
- [7] 李海真. 南瓜属三个种的亲缘关系与品种的分子鉴定研究[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2): 161~164.
- [8] 刘小俊. 中国部分栽培南瓜种质资源遗传多态性 RAPD 分析[J]. 西南农业学报, 2004, 47(5): 567~571.
- [9] 栾雨时,周洪基,安利佳. 番茄 RAPD 分析适宜引物的筛选. 北方园艺, 1999(2): 3~4.

RAPD Primers Screening Suitable for Genetic Diversity Analysis Squash

LI Haiying^{1,2}, ZHAO Xiaomeng¹, ZHAO Fukuan¹, QIN Yong²

(1. Beijing Agricultural College, Beijing 102206; 2. Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, china)

Abstract: The total DNA of squash were extracted using CTAB method. RAPD primers were screened by optimized RAPD reaction system. 26 polymorphic primers were screened from 260 arbitrary 10—mer primers. These polymorphic primers could be used in genetic diversity analysis of squash.

Key words: Squash; RAPD; Primer

李树流胶病的发生与防治

刘忠巍,孙淑凤

李子为我国人民喜食的水果,在我国栽培广泛。据统计,1996 年我国李树面积达 24.1 万 hm²(公顷),产量达 150.8 万 t(吨)。近几年,李树生产在东北地区发展迅速,成为当地夏秋主要鲜食水果之一。随着李树面积的增加,李树流胶病的发病率呈逐年上升趋势。笔者通过 2002~2004 年对吉林省的部分李树园的调查发现,在树龄 5 年以上的李树流胶病发生率为 38%以上。受侵染的果树,不仅缩短其经济寿命,也降低了果实的产量和品质,对果农的生产构成了严重威胁。

1 症状

流胶病主要发生在树体的主干和主枝的桠杈处,果实也可发病。树体发病初期,病部肿胀并逐渐分泌出黄色透明的树胶,经空气氧化后变成褐色硬质胶块。流胶处树皮开裂,病部组织逐步变色直至坏死,再被腐生菌侵染和蠹虫侵蚀,削弱树势。随着侵染部位的扩大和流胶量的增加,造成韧皮部、木质部的大面积坏死,直至树体死亡。果实受害时,胶体渗出果面,果肉发硬,不能食用。

2 发病原因及规律

李树流胶病亦称树脂病,主要危害桃、李、杏、樱桃等核果类果树。据研究,半知菌类、轮枝孢菌和蕉孢壳菌等真菌病原

菌对树体流胶有致病性,该病原菌是因果树生理病变造成流胶后而侵入,加重流胶程度。李树流胶病的致病菌潜伏在被害的树体组织中,其分生孢子通过风和雨水的传播,侵入其他伤口和流胶处,造成其他树体致病。李树流胶病在生长期均可发病,而在高温、高湿的 6~8 月为发病盛期。树体的物理伤害,如人为的机械损伤和冻害、日灼等自然伤害成为发生流胶病的诱因,而土壤粘重、通风透光差、过度修剪、土壤含水量过高且持续时间长,以及病虫害严重等栽培管理措施不当也为流胶病的发生提供了条件。

3 防治方法

3.1 农业防治 采果后深施基肥,基肥应以腐熟的优质农家肥为主,并掺入少量复合肥,适当控制氮肥使用量。同时,保证水分充足,提高树体营养水平,增强树势,提高树体的抗病能力。加强夏季修剪,保持树体营养均衡和通风透光,冬季修剪要除去病虫枝,并对伤口涂抹保护性药剂。尽量减少树体损伤,及时解除绑缚物。加强果园管理,及时清理枯枝病果、除去杂草和消灭蛀干害虫,雨涝时及时排水,土壤定期耕翻,改善土壤结构和通气状况。

3.2 化学防治 李树从栽植开始就应重视流胶病的发生,要及时检查,及时治疗。入冬前对树干喷施杀虫剂进行除虫和用 100 倍果富康涂干。发现病斑及时刮除,并在伤口涂抹 70%的甲基托布津或 50%的退菌特,也可用 5°石硫合剂和波尔多液进行伤口消毒。在距离树干 1.5 m(米)挖 30 cm(厘米)深的环状沟,在沟内以每株 100 g(克)硫酸铜和 20 kg(公斤)水的标准浇灌,随即埋土,每月 1 次,共 3 次。

(吉林省松原市农村成人高等专科学校,138000)