

番茄 RAPD 分析适宜引物的筛选

栾雨时

周洪基

安利佳

(大连理工大学)

(佳木斯市蔬菜所)

(大连理工大学)



第一作者简介 栾雨时

1962 年生,理学博士,副教授。曾先后就读于吉林农业大学和东北师范大学。硕士期间从事保护地环境与蔬菜生理的研究,攻读期间掌握了多项细胞生物学及分子生物学等高新技术领域的操作技能。截至目前已在国内外刊物上

发表论文 17 篇,译文 10 篇,参加选育出作物新品种 8 个,现主要从事植物基因工程研究。

摘要 使用国产 PCR-90AD 反应仪,对野生番茄及栽培番茄的基因组 DNA 进行 RAPD 分析,从 100 个随机引物中找到了 35 个扩增效果良好的引物,为 RAPD 技术应用于番茄的遗传研究奠定了基础。

关键词 番茄 RAPD PCR

在遗传育种中,遗传标记是重要工具,由于很多作物的形态标记、同工酶生化标记数量非常有限,很难对它们的基因组进行详细的分析,对多基因控制的重要性状的研究也受到限制。九十年代初发展起来的 RAPD 技术^[1,2]具有快速、有效、灵敏度高,而且不受环境条件、发育状况的影响,可以客观地揭示供试材料之间的真实差异,因而成为遗传学研究中一个十分活跃的研究领域。目前已在蔬菜育种上得到广泛应用^[3,4]。但是并非所有的随机引物的 PCR 扩增效果都很好,特别是对于象番茄这样高度自交、遗传背景狭窄的物种,多数引物扩增的效果不佳,致使研究人员常常要花费大量的精力和财力去筛选适宜的引物,造成很大的浪费。为了避免上述现象的发生,进一步为番茄 RAPD 实验打下基础,我们做了下面的试验。

1 材料与方法

试验用番茄材料中蔬 4 号、L402 母本、醋栗番茄

(*L. pimpinellifolium* Mill.)、多腺番茄(*L. glandulosum* Mill)。每份随机取 8~10 株幼苗进行模板 DNA 的提取。随机引物为美国 Operon Technologies 公司产品,共 5 组(OPA、OPF、OPG、OPH、OPK)100 个;Taq DNA 聚合酶由大连渤嘉生物制品公司生产;4×dNTP 为美国 SIGMA 公司产品;RNase 购自华美生物工程公司;其它常规试剂为国产分析纯产品。使用中国科学院遗传研究所生产的 PCR-90AD 反应仪。用 SDS 法提取 DNA、扩增反应体系^[4],DNA 浓度通过电泳-EB 染色的荧光强度测定。PCR 扩增反应条件为:94℃1min 变性,36℃1min40S 复性,72℃2min40S 延伸条件下循环反应 45 周;最后一次延伸反应为 72℃10min。取全部反应产物与 2~3μl 凝胶加样缓冲液(0.25% 溴酚蓝,40% 蔗糖水溶液)混匀,点入含 0.5g/ml 溴化乙锭的 1.4% 琼脂糖凝胶中,用 1×TAE 缓冲液(Tris-乙酸 0.04mol, EDTA 0.001mol)在 4V/cm 电场强度下电泳 3h 左右或 1V/cm 电场强度下电泳 10h 左右,取出凝胶在紫外灯下观察并照相。

2 结果与讨论

通过试验发现多数引物在这四份材料间的扩增效果不理想,我们淘汰了无扩增带和扩增后无多态带的引物(如图 1 中 OPH18 OPH17 引物),选留那些扩增条带清晰且又能在这四份材料中产生明显多态性片段的引物(尤其是在两个栽培品种间能产生多态性片段的引物),如此共筛选出 35 个引物,它们的名称及核苷酸序列见表 1。

RAPD 分析可使研究者快速高效地获取涉及许多个体或基因型许多位点的 DNA 序列为基础多态性资料,尤其是它对无任何分子生物学基础的物种也可采用。它既不需要已知的基因组 DNA 序列,也不需要物种特异的探针或引物。只要合成一套随机引物,便可用于任何物种。因此, RAPD 分析非常适合于涉及大规模样品的植物育种、种群遗传学及生物多样性的研究^[5]。正因为如此, RAPD 标记自建立以来,迅速在基因组图谱构建^[6]、阐明物种亲缘关系^[7]、种质资源鉴定与分类^[8]、种群遗传学^[9]等各方面得到了广泛应

用。相信该技术将会很快的在番茄的遗传育种上得到普及和推广。

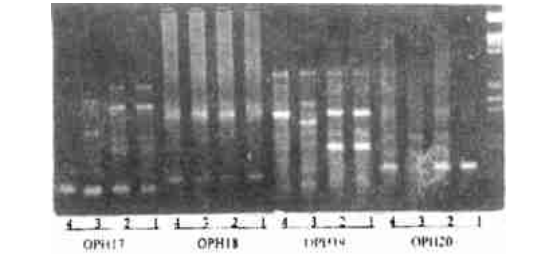


图 1 四个随机引物在四份番茄属材料间的扩增结果
M 为 DNA 分子量标记 λ DNA—HindIV/EcoRI

1、2、3、4 分别为中蔬 4 号、L402 母本、醋栗番茄、多腺番茄材料
番茄属植物 RAPD 分析适宜的引物
及其核苷酸序列表(5'—3')

引物	序列	引物	序列	引物	序列	引物	序列
OPA02	TGCGAGCTTC	OPA07	GAACGGGTG	OPA09	GGTAAACCC	OPA12	TGCGGATAG
OPA13	CAGCACTAC	OPA15	TTCCGAACCC	OPA18	AGGTGACGT	OPA20	GTTCGATCC
OPF01	ACGGAATCTC	OPF08	CCTGATCACC	OPF07	CGATATGCC	OPF08	GGATATGCG
OPF10	GGAACTTGG	OPF11	TTGGTACCC	OPF12	ACGGTACCAG	OPF13	GGCTGACAG
OPF14	TGCTGACGT	OPF15	CCAGTACCTC	OPF17	AACCGGGAA	OPF02	GGCACTGAGG
OPF04	AGGTGCTC	OPG13	CTCTCCGCA	OPG18	GGCTCAATG	OPH14	ACCAAGTTCG
OPH15	ACTGGGACTC	OPH16	AGCGTCTTCC	OPH19	CTCAACAGCC	OPH20	TCTCCCTCAG
OPK08	CCAGCTTAGG	OPK04	CCGCCAAAC	OPK08	GAACACTGGG	OPK14	CCGCTACAC
OPK16	GAGGTGCGAA	OPK18	CCTAGTCGAG	OPK19	CACAGCGGA		

参考文献

1 Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213—7218

2 Williams JGK, Kublik AR, Livak KJ et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531—6535

3 曹家树. RAPD 技术在蔬菜育种上的应用. *园艺学进展*, 1994: 18—23

4 栾雨时 苏乔 李海涛等. 利用 RAPD 技术快速鉴定番茄杂种纯度. *园艺学报*, 1998, 23(3): 148—151

5 汪小全 邹喻苹 张大明等. 1996. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. *中国科学(C 辑)*, 26(5): 436—441

6 Tingey SV, del Tufo JP. 1993. Genetic Analysis with RAPD Markers. *Plant Physiol*, 101: 349—352

7 Chalmers KJ, Newton AC, Waugh R. et al. 1994. Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet*, 89: 504—508

8 庄炳昌 惠东威 王玉民等. 1994. 中国不同纬度不同进化类型大豆的 RAPD 分析. *科学通报*, 39(23): 2178—2180

9 Huff DR et al. 1993. RAPD variation within and among natural population of outcrossing buffalograss. *Theor. Appl. Genet*, 86: 927—934

3 结论

3.1 宁南霉素在番茄病毒病发病初期应用, 防治效果明显, 但对病毒病的治疗效果不明显, 治愈率较低。宁南霉素是生物制剂, 对番茄安全、无药害, 是一种无公害药剂。

3.2 宁南霉素的最佳使用剂量为 260 倍液。此处理不但防效好, 而且有增产作用, 增产率为 25.1%。(第 1、2 名作者齐齐哈尔市植保站 第 3 名作者齐齐哈尔市梅里斯区植保站)

宁南霉素防治番茄病毒病

丛 玲 刘福齐 关升禄

宁南霉素是一种新型生物制剂, 防治番茄病毒病效果好, 经济实惠。

1 试验设计与方法

试验设 2% 宁南霉素水剂(黑龙江德强生物农药开发有限公司海林生物农药厂提供)200 倍液、260 倍液、400 倍液, 20% 病毒 A 可湿性粉剂(齐齐哈尔市北方化工研究所提供)600 倍液及清水对照共 5 个处理。

2% 宁南霉素防治番茄病毒病的效果

使用 药剂	药前 病指%	防治效果%		增产率 %
		第一次喷药后 7d (5 月 23 日)	最后一次施药后 10d (6 月 9 日)	
处理 I 宁南霉素 200×	7.48	55.8	77.5	22.6
处理 II 宁南霉素 260×	8.9	61.9	80.5	25.1
处理 III 宁南霉素 400×	7.5	46.9	59.4	9.8
病毒 A 600×	7.8	46.4	58.3	14.6
对照	11.4			

小区面积 20m², 小区随机排列, 4 次重复。试验地土壤肥力均匀, 正常栽培管理。番茄品种为佳粉 15 号。用手动背负式喷雾器分别于 5 月 16 日、5 月 23 日、5 月 30 日进行三次喷药。在第一次喷药前进行基数调查, 第一次、第三次喷药后调查发病率、病情指数。

2 试验结果

2.1 宁南霉素各处理间的效果 宁南霉素 3 个处理在喷药前病情指数分别为 7.48%、8.9%、7.5%, 第一次喷药后 7d 病指防效分别为 55.8%、61.9%、46.9%, 最后一次喷药后 10d 病指防效分别为 77.5%、80.5%、59.4%。处理 I 和处理 II 差异不显著, 处理 I 和处理 II 同处理 III 差异显著。

2.2 宁南霉素同对照药剂相比的效果 病毒 A 施药前病情指数为 7.8%, 第一次喷药后 7d 病指防效为 46.4%, 最后一次喷药后 10d 病指防效为 58.3%。病毒 A 同宁南霉素的处理 III 差异不显著, 病毒 A 同宁南霉素的处理 I 和处理 II 差异显著。