

辣椒经地面模拟诱变后的 RAPD 鉴定

郭亚华¹, 谢立波¹, 王雪¹, 陈立新¹, 刘录祥², 周宇¹

(1. 黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 国家农作物航天诱变技术改良中心, 北京 100081)

摘要:以地面模拟处理辣椒干种子为试材, 采用 RAPD 技术对辣椒染色体进行多态性检测, 研究了不同剂量的物理诱变处理对辣椒产生的影响。结果表明: 采用 Li 离子照射可以诱导辣椒发生遗传位点的改变, 但是不同剂量的效应不同; 采用物理进行诱变可以诱导多个性状发生改变, 该方法可以产生复杂的遗传变异。

关键词:辣椒; 地面模拟; RAPD

中图分类号:S 641.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0095-03

随着科技的发展和社会的进步, 各种资源正被开发利用, 当然也包括空间资源。空间诱变育种以及地面模拟诱变育种已经引起育种学家和科学界的广泛关注, 并在很多方面得到广泛应用^[1-21]。利用空间诱变进行农作物品种改良不仅涉及到飞行器在空间所处的复杂环境条件, 也涉及搭载作物在空间条件下所引起的细胞学、形态学、分子生物学及生理生化等各方面的变异^[1-3]。而检测这些遗传变化往往需要快速和有效的手段, 分子标记技术可以快速检测植物发生的变异

位点, 从而根据标记的遗传规律, 推测和跟踪其目标性状的变化^[4-12]。

在该研究中, 通过 RAPD 分子标记技术, 在采用 Li 离子处理的条件下, 对辣椒的诱变程度进行检测, 同时检测其染色体及基因多态性的变化特点, 从而探讨了采用不同剂量的物理诱变对辣椒进行处理产生变异的机理, 以期对辣椒物理诱变育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料由黑龙江省农业科学院园艺分院通过地面模拟锂(Li)离子处理的辣椒, 同时以未处理的材料为对照, 其中 mn17、mn18、mn19、mn20 分别为不同剂量 Li 处理的第 1 代, mnR17、mnR18、mnR19、mnR20 为不同剂量 Li 处理的第 2 代。

1.2 试验方法

1.2.1 种子处理的 Li 离子剂量 辣椒种子 Li 离子处理的 4 种剂量为 Li-1(30 Gy)、Li-2(50 Gy)、Li-3(70 Gy)、Li-4(100 Gy)。

第一作者简介:郭亚华(1953-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 研究员, 现主要从事植物空间诱变育种和生物技术工作。E-mail: guoyahua@sina.com.

责任作者:陈立新(1963-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 研究员, 现主要从事设施园艺规划和设计及蔬菜栽培工作。E-mail: cbc03@126.com.

基金项目:国家“863”计划资助项目(2012AA101202); 国家大宗蔬菜产业技术体系哈尔滨综合试验站资助项目(CARS-25-G-11)。

收稿日期:2013-11-14

Abstract: With *Capparis spinosa* L. as material, the method of modified SDS, RNeasy Plant Plus Reagent, RNeasy Plant Plus Reagent and RNeasy Pure Plant Kit were compared to find out the optimal method for extracting high quality total RNA from blades in wild *Capparis spinosa* L.. The results indicated that four kinds of methods to extract total RNA were seen two electrophoretic bands of 28S and 18S, RNeasy Pure Plant Kit method to obtain an RNA bands were clear pattern, bright, stable, brightness of 28S rRNA was two times of 18S rRNA, while the value of OD₂₆₀/OD₂₈₀ was 2.00 and the yield of RNA was 175.3 μg/g, except RNeasy Pure Plant Kit method could be extracted from the leaves to integrity is good, high purity and high yield of total RNA, other three kinds of total RNA extraction are pollution, such as biodegradation and DNA and protein. Further using RNeasy Pure Plant Kit method from *Capparis spinosa* L seedlings in the whole plant, root, stem and leaf could obtain high quality total RNA, therefore, RNeasy Pure Plant Kit method was suitable for the extraction of total RNA.

Key words: *Capparis spinosa* L.; RNA extraction; method comparison; verification

1.2.2 辣椒叶片基因组 DNA 的提取 选取幼嫩的植物叶片进行速冻,然后采用改良的 CTAB 法进行 DNA 的提取。

1.2.3 DNA 检测 PCR 产物利用浓度为 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,最后在凝胶成像仪下观察,照相。

1.2.4 RAPD 引物筛选 该试验采用 S14、S29、S96、S201、S48、S119 6 个引物进行筛选。

1.2.5 RAPD 反应体系的优化 反应总体积为 25 μ L,包括:模板 20 ng;引物 1 μ L(20 mol/L);dNTPs 0.5 μ L(2.5 mmol/L);Buffer 缓冲液(含 Mg^{2+}) 2.5 μ L; *Taq* DNA 聚合酶 1 U。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min;然后在 94℃ 变性 1 min;36℃ 退火 90 s;72℃ 延伸 5 min,进行 35 个循环,最后再 72℃ 延长 10 min。

2 结果与分析

2.1 DNA 检测

在试验中,应尽可能保证 DNA 较高的纯度,因为辣椒叶片中含有大量的有机成分,同时叶片中含有的大量蛋白质和糖类对 DNA 浓度的影响也较大,从而对 DAN 提取产生了一定影响,为了解决该问题,对普通的 CTAB 方法稍加改进,用 Tris-平衡酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)进行抽提,去除蛋白,最后再用氯仿抽提以去除酚,从而有效地减少了对后续 PCR 扩增的影响,试验结果见图 1 和图 2。

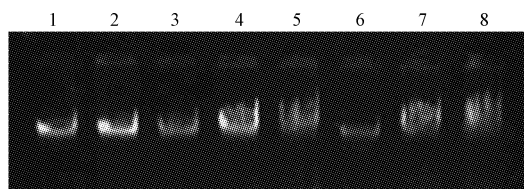


图 1 利用未经改良的 CTAB 法提取的 DNA 图谱
注:1~8 均为提取的叶片总 DNA。

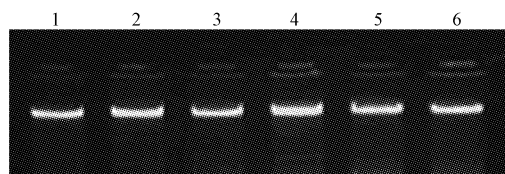


图 2 利用改良的 CTAB 法提取的 DNA 图谱
注:1~6 均为提取的叶片总 DNA。

2.2 扩增结果

由图 3 可以看出,有 2 个引物有明显条带,故选用 S48 和 S119 作为引物进行 PCR 扩增,部分扩增的电泳图见图 4。由表 1 可以看出,利用引物 S48 扩增后,与对照相比,Li-3 和 Li-4 照射后,第 1 代和第 2 代均发生位点的变化,且保持不变。在 Li-1 和 Li-2 的照射下出现了改变,在 Li-1 照射下出现位点增加,而在 Li-2 照射下出

现位点缺失,但是在 2 代均出现变化。利用引物 S119 扩增后发现,在 Li-1 和 Li-2 照射下 1 代均出现位点的缺失,但是在 2 代又出现位点的恢复现象。Li-3 剂量照射后 1 代和 2 代的表现不同,同样 Li-4 剂量照射后 1 代和 2 代的表现也不同。因此 Li 照射可导致不同的位点发生改变,同时采用不同的剂量的效果不同。

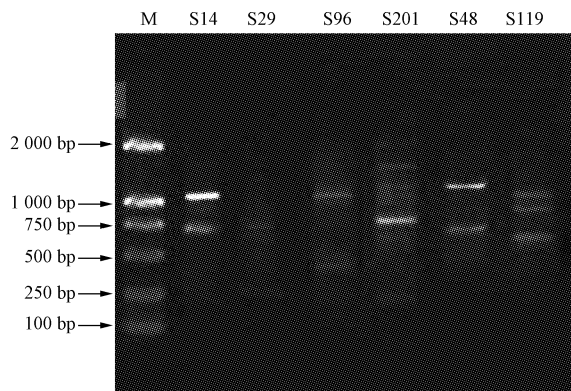


图 3 引物筛选
注:M 为 Marker DL 2 000。

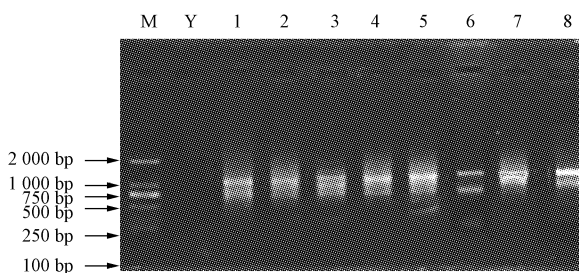


图 4 经 Li 离子照射后辣椒的部分扩增图

注:M 为 Marker DL 2 000;Y 为阴性对照。1、2 为 Li-1 处理的 1 代和 2 代;3、4 为 Li-2 处理的 1 代和 2 代;5、6 为 Li-3 处理的 1 代和 2 代;7、8 为 Li-4 处理的 1 代和 2 代。

表 1 在不同剂量 Li 离子照射下的位点变化

代号	CK	Li-1		Li-2		Li-3		Li-4	
		1 代	2 代	1 代	2 代	1 代	2 代	1 代	2 代
S48-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S48-2	0	1	1	1	1	1	1	1	1
S48-3	1	1	0	0	1	0	0	0	0
S119-1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
S119-2	1	0	1	0	1	0	0	0	1
S119-3	1	1	1	1	1	1	1	1	0

注:"0"表示无条带,"1"表示有条带。

3 结论与讨论

该试验结果表明,采用 Li 离子照射可以诱导辣椒发生遗传位点的改变,但是不同剂量的效应不同,而且在 1 代和 2 代时位点的改变可以恢复。而且无明显的

规律可遵循。因此利用物理射线诱变,不应该在 1 代和 2 代时进行选择,因为此时诱变的方向比较混乱,遗传性状还未稳定,应该持续进行选择,例如需要 3 代和 4 代以上进行持续选择和观察。同时说明了采用物理进行诱变产生的诱变较为复杂,另一方面也说明了采用物理进行诱变可以诱导多个性状发生改变,该方法可以产生复杂的遗传变异。因此可以克服传统方法进行辣椒育种时间久、变异小、操作复杂等弊端。

此外,该试验只选用了 RAPD 进行检测,由于此方法稳定性差,而且遗传多态性的检测的变异率不高,因此可以考虑在今后的试验中选择利用其它分子标记的方法进行分析验证,例如:采用 SSR、AFLP 等重复性较好、多态性更高的分子标记方法。另外,该试验只采用 2 对引物进行了扩增,因此在今后的试验中应采用更多的引物进行扩增,以增加试验的准确性。

参考文献

- [1] 马惠平,赵永亮,杨光宇,等. 诱变技术在作物育种中的应用[J]. 遗传,1998(4):48-50.
- [2] 石铁松,王贵学. 微重力和模拟微重力对植物生长发育的影响[J]. 重庆大学学报(自然科学版),2003(4):24-27.
- [3] 詹玉丝,陈晓,齐卫强,等. 辣椒 RAPD 反应体系建立及杂交种纯度鉴定研究[J]. 辣椒杂志,2004(4):32-35.
- [4] 王玲,郑金贵,赖钟雄,等. 辣椒遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 福建农业大学学报,2003(2):213-216.
- [5] 马艳青,刘志敏,邹学校. 辣椒种质资源的 RAPD 分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2003(2):120-122.
- [6] 周群初,何清,马艳青,等. 利用 RAPD 技术进行辣椒杂种纯度鉴定的研究[J]. 湖南农业科学,1999(5):23-26.
- [7] 谢立波,郭亚华,孟凡娟,等. 辣椒 RAPD 扩增体系的建立[J]. 安徽农业科学,2010(34):19272-19274.
- [8] 雷建军,陈国菊,曹必好,等. 辣椒基因工程研究进展[C]//中国园艺学会第十届会员代表大会暨学术讨论会论文集,2005:35-36.
- [9] 马海宾. 辣椒抗疫病的生化和分子标记研究[D]. 儋州:华南热带农业大学,2002.
- [10] Chatterjee A, Holley W R. Biochemical mechanisms and clusters of damage for high-LET radiation[J]. Adv Space Res,1992,12(2):35-39.
- [11] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:79-80.
- [12] Gu R Q, Shen H M. Effects of space flight on the growth and some cytological characteristics of wheat seedling[J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 1989,15:403-407.
- [13] 王得元,张长远,殷秋妙. 辣椒 RAPD 反应体系研究[J]. 广东农业科学,2001(1):21-22.
- [14] Mshara P J, Oanapath T R, Suprasannap P, et al. Effect of single and recurrent gamma irradiation of *in vitro* shoot cultures of banana[J]. International Journal of Fruit Science,2007,7(1):47-57.
- [15] 任少雄,王丹,李卫锋,等. ^{60}Co 射线辐射唐菖蒲鳞茎诱变育种试验[J]. 福建林业科技,2006,33(2):34-36.
- [16] 花欣,尹淑霞. 空间诱变育种的研究现状与展望[J]. 山东农业科学,2011(4):29-32.
- [17] 李戈,曾会才. 诱变在产抗生素微生物育种中的应用进展[J]. 安徽农业科学,2007(4):970-971.
- [18] 王艳芳,赵彦宏,刘林德,等. 空间诱变微生物研究进展[J]. 安徽农业科学,2009(16):7335-7336.
- [19] 谷卓,那日,石薇,等. 高压电晕电场对黄霉素产生菌诱变效应[J]. 核农学报,2012(5):740-745.
- [20] 伊虎英,鱼红斌,马建中. 利用核技术选育高产优质谷子新品种辐谷 6 号[C]//中国原子能农学会第七次代表大会暨学术研讨会论文集,2004:141-142.
- [21] Chen B M, Xu X P, Hou Z G, et al. Identification and mutagenesis of a new isolated strain *Bacillus* sp. B26 for producing (R)- α -hydroxyphenylacetic acid[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering,2011(4):636-643.

The RAPD Detection of *Capsicum annuum* L. After Ground Simulation

GUO Ya-hua¹, XIE Li-bo¹, WANG Xue¹, CHEN Li-xin¹, LIU Lu-xiang², ZHOU Yu¹

(1. Horticultural Sub-Academy, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069; 2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Center of Space Mutagenesis for Crop Improvement, Beijing 100081)

Abstract: Taking the seeds of *Capsicum annuum* L. by ground simulation from Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences as materials, using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) to detect polymorphism of pepper, the influence of different dose of physical simulation on pepper were studied. The results showed that the genetic site could be changed after Li treatment, however, different dose had different effects; many characteristics could be changed by physical simulation, accordingly, this method could produce a complex genetic variation.

Key words: *Capsicum annuum* L.; ground simulation; Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)