

# 茄子空间诱变后的变异分析

李莲芳<sup>1</sup>, 曹翠文<sup>1</sup>, 刘军<sup>2</sup>, 林鉴荣<sup>1</sup>, 郭爽<sup>1</sup>

(1. 广州市农业科学研究院, 广东 广州 510308; 2. 江苏省农业科学院 蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 以卫星搭载的长茄种子及其经系谱选育获得的3个优良变异株系为材料, 通过种子发芽试验及RAPD分子标记技术分析检测了茄子空间诱变后代发生的变异情况。种子发芽试验表明, 空间诱变对茄子种子发芽出苗影响较大, 抑制了诱变种子的萌发, 推测太空环境抑制了种子活力和生长势。3个优良变异株系的RAPD标记以及聚类分析结果均表明, 太空环境使茄子种质在DNA水平上发生了变异, 其中优良变异株系9301A-3与对照种的相似系数最小, 差异最大; 9301A-1与对照种的相似系数最大, 差异最小。

**关键词:** 茄子; 航天诱变; 种子萌发; RAPD分析

**中图分类号:** S641.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2012)增刊-0074-03

## Variation Analysis after Space Mutation on Eggplant

LI Lian-fang<sup>1</sup>, CAO Cui-wen<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>2</sup>, LIN Jian-rong<sup>1</sup>, GUO Shuang<sup>1</sup>

(1. Guangzhou Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510308, China; 2. Institute of Vegetable Crop, Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** The space flight mutation effects on eggplant seeds and three eggplant lines obtained by space mutation and traditional breeding selection were studied using seed germination test and RAPD markers. The results showed that space flight had obviously inhibited the seed germination in eggplant variation lines. By RAPD markers and cluster analysis, three eggplant lines had apparent variation compared with the original species on DNA level. 9301A-3 had the minimum similarity coefficient and the largest difference compared to the control material 9301A; But 9301A-1 had the largest similarity coefficient and the smallest difference compared to the 9301A.

**Key words:** Eggplant; Space mutation; Seed germination; RAPD analysis

航天诱变是将供试诱变材料搭载返回式卫星或宇宙飞船, 送到距离地球200~400 km的太空, 利用空间宇宙射线辐射、高真空、微重力及交变磁场等特殊环境进行诱变处理, 使供试的农作物种子和材料产生变异, 获得地面常规方法较难得到的特异种质资源, 具有易出现特殊突变体、变异频率高、变异幅度大、多数性状的变异能稳定遗传等特点。近年来, 我国利用航天诱变育种技术先后育成50多个农作物新品种(系), 在作物新种质的创造和新品种选育方面取得了显著的成果。

以广州市农业科学研究院选育的长茄高代自交系经卫星搭载后获得的太空搭载种子为试验材料, 进行种子发芽试验; 并应用RAPD分子标记技术对

经系谱选育获得的3个优良变异株系进行多态性及聚类分析, 检测茄子种子经空间诱变后发生的变异情况, 旨在探讨和评价太空环境对茄子产生的诱变效果, 为茄子航天诱变育种提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

本研究以广州市农业科学研究院选育的长茄高代自交系9301经卫星搭载后获得的太空搭载种子9301A为试验材料, 进行种子发芽试验, 并对9301A经8代系谱选育后获得的3个优良变异株系(编号分别为9301A-1、9301A-2、9301A-3)进行RAPD分析, 以未经卫星搭载的原始种(编号为9301CK)为

收稿日期: 2012-08-12

基金项目: 广州市科技支撑项目(2010Z1-E381)

作者简介: 李莲芳(1968-), 女, 广东梅县人, 高级农艺师, 主要从事蔬菜遗传育种及新品种选育研究。

通讯作者: 郭爽(1982-), 女, 山西长治人, 博士, 主要从事辣椒遗传育种与分子生物学研究。

对照。3 个优良变异株系及对照种于 2009 年春季在广州市农科院花都试验基地塑料大棚内播种,待幼苗长至 6~7 片真叶时取 3~4 片叶于离心管中, -20℃ 保存, 以备提取 DNA。

## 1.2 试验方法

1.2.1 种子萌发及发芽统计 参照马崇坚<sup>[1]</sup>的方法, 先将茄子种子用 70℃ 的温水浸泡至水温为 30℃, 去掉水, 加入 3% KNO<sub>3</sub> 溶液, 室温浸泡 12 h; 吸出 KNO<sub>3</sub> 溶液, 蒸馏水清洗 3 次, 取出种子, 用吸水纸吸干水分; 培养皿中放入 3 张滤纸, 用蒸馏水湿润, 每个皿中放入 50 粒种子, 设 3 个重复, 放培养箱中 30~32℃ 暗培养, 每天统计发芽数。

1.2.2 DNA 提取及检测 采用改良的 CTAB 法提取茄子总 DNA<sup>[2]</sup>, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 条带完整性, UV9100B 型紫外可见分光光度计测定其吸光度值, 检测纯度和浓度, 并稀释为 20 ng/μL, -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 PCR 扩增 扩增反应在 Thermo PX2 PCR 仪上进行, 反应体系 25 μL, 包括 2.5 μL 10 × PCR Buffer, 1.6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.5 μL 0.2 μmol/L dNTP, 2 μL 0.36 μmol/L Primer 1 μL, 2.5 U Taq 酶 0.2 μL, 20 ng 模板 DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 15.8 μL。PCR 的反应过程为: 94℃ 预变性 5 min; 然后为 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物检测 在扩增产物中加入 5 μL 加样缓冲液混匀, 取 7 μL 混合液点样于 1.5% 琼脂糖凝胶, DYY-34A 型水平电泳槽电泳检测, 电场强度 5 V/cm, Gold View 染色, BioRed 自动凝胶成像系统观察照相, 并记录电泳结果。

1.2.5 数据分析 在扩增产物电泳图谱中的同一迁移位置上, 有扩增条带的记为“1”, 无扩增条带的记为“0”, 得到各样品带型分布表。采用 POPGEN 32 软件计算多态位点百分率 P(%) 以及相似性系数, 并用 MTSUS 2.11 版软件的非加权算术平均法 (UPGMA) 进行系统聚类分析, 构建分子进化系统树。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子发芽率统计

如表 1 所示, 9301CK 在培养后第 2 天开始大量萌发, 到第 4 天平均发芽率达到 92%, 而太空搭载种子 9301A 第 2 天没有种子萌发, 从第 4 天种子才开始陆续萌发, 发芽率仅为 2.7%, 到第 6 天发芽率略有提高, 到第 9 天发芽率也仅为 68%, 仍低于对照种 9301CK, 由此可见, 太空环境对茄子种子发芽

出苗影响较大。

表 1 茄子种子发芽率统计

材料 Materials	第 2 天 Second day	第 4 天 Fourth day	第 6 天 Sixth day	第 9 天 Ninth day
9301CK	16.7	92	94.7	98
9301A	0	2.7	27.3	68

### 2.2 优良变异株系选育过程

太空搭载种子 9301A 于 2005 年春季种植于广州市农科院花都试验基地, 从种植群体中选择优良单株自交留种; 2006 年春季继续种植观察, 开始有变异株出现, 选优良变异株自交留种, 至 2006 年秋季共选出 7 个优良变异株; 2007 年春季继续种植观察, 选优留种; 至 2007 年秋进行到 SP6, 此时各变异株系群体已逐渐趋于一致, 从中筛选出优良变异株系 5 份; 2008 年经春、秋两季筛选鉴定, 自交选纯, 最终选出 3 个优良变异株系, 编号为 9301A-1、9301A-2、9301A-3。

### 2.3 基因组 DNA 质量鉴定

应用改良 CTAB 法提取茄子基因组 DNA, 电泳检测结果显示, DNA 条带清晰, 无拖尾现象, 表明所提取的总 DNA 没有 RNA 污染。UV9100B 型紫外可见分光光度计测定所提取样品的总 DNA 纯度, 其 OD<sub>260/280</sub> 值在 1.8~2.0 之间, 表明所提取的总 DNA 没有蛋白污染, 质量较好, 纯度较高, 可以进行下一步试验。

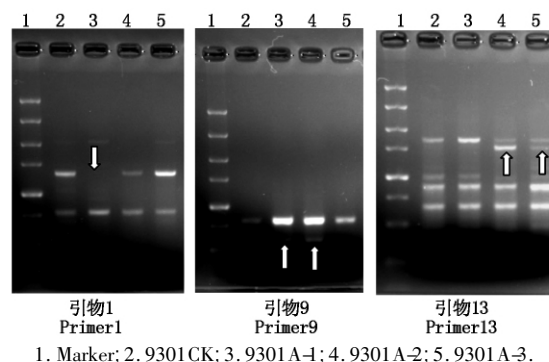


图 1 部分引物 RAPD 扩增图谱

Fig. 1 RAPD amplification results of partial primers

### 2.4 RAPD 标记多态性分析

以对照种及 3 个优良变异株系 DNA 为模板, 利用优化的反应体系在 50 个 RAPD 随机引物中, 有 9 个引物可以扩增出清晰、稳定的多态性条带, 部分引物 RAPD 扩增结果如图 1 所示。从 9 个多态性引物的扩增结果中, 共在 30 个位点获得扩增片段, 平均每个引物扩增片段为 3.33 条, 扩增片段最多的引物是 s421, 共扩增到 6 条条带。其中多态性条带共有 12 条, 多态性比例为 40%, 平均每个引物扩增出

1.33 条多态性条带,多态性变幅为 50% ~ 66.67%。总体来说,参试的 3 个优良变异株系的 RAPD 多态性比例相对较低,说明太空环境会使茄子种子在 DNA 水平上发生变异,但这种变异不大。

## 2.5 聚类分析

相似系数是衡量样品间相似性程度的度量,相似系数越小,表明样品间的差异越明显。4 份茄子种质两两间的相似系数分布在 0.34 ~ 0.69 之间。其中 9301A-1 与 9301A-2 之间的相似系数最大,为 0.69,表明两者之间的亲缘关系最近。9301CK 与 9301A-3 之间的相似系数最小,为 0.34,表明两者之间的亲缘关系最远。从聚类图上可以看出,以相似系数 0.63 为标准,可将 4 份茄子种质聚为两类,将 3 个优良变异株系聚为一类,未经卫星搭载的对照种 9301 单独聚为一类,表明太空环境使茄子种子在 DNA 水平上发生变异。其中对照种与 9301A-3 的相似系数最小,为 0.34,遗传距离最大,差异最明显;对照种与 9301A-1 的相似系数最大,为 0.54,遗传距离最小,差异最小(图 2)。

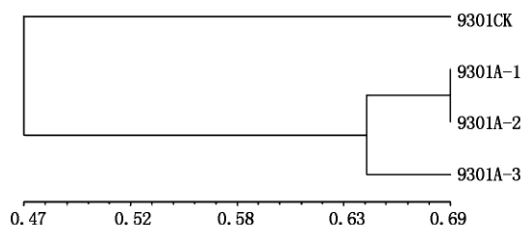


图 2 基于 RAPD 标记的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis based on RAPD markers

## 3 结论与讨论

茄子种质资源遗传基础逐渐趋于狭窄是目前茄子育种中面临的主要问题。生物种质经航天搭载受到太空环境中强辐射、微重力等因素的复合作用,会引起形态学、细胞学以及 DNA 水平的变异<sup>[3]</sup>,成为育种中解决这一问题的有效途径。DNA 指纹技术在遗传性状变异的检测方面显示出通用、快捷、准确的优点,是分子水平上评价航天诱变效果的主要手段。谭雪等<sup>[4]</sup>利用 RAPD 标记对菜薹航天诱变后代材料进行检测,发现诱变后代在 DNA 水平上发生了明显变异。

本研究对太空搭载的茄子种子进行了种子萌发试验,对照种在培养 2 d 后开始大量萌发,到第 4 天平均发芽率达到 92%,而经太空搭载的种子到第 4 天才开始陆续萌发,发芽率也仅为 2.7%,直到第 9

天发芽率仍低于对照。由此可见太空搭载抑制了种子的萌发,推测太空环境抑制了种子活力和生长势。这与徐荣<sup>[5]</sup>的空间诱变后胡芦巴种子的发芽率受到明显抑制的研究结果相一致。

本研究中利用 RAPD 标记对太空搭载茄子种子经系谱选育获得的 3 个优良变异株系进行的遗传多样性以及聚类分析结果均表明,航天诱变使茄子种质在 DNA 水平上发生变异,这与番茄<sup>[6]</sup>、水稻<sup>[7]</sup>、棉花<sup>[8]</sup>、花生<sup>[9]</sup>、黄瓜<sup>[10]</sup>和菜薹<sup>[11]</sup>等作物航天突变体的分子标记研究结果基本一致。本研究获得的 3 个优良变异株系与对照种遗传差异较大,在今后的育种工作中可以通过多代杂交、回交的方法将其优良性状转育到其他自交系或者品系中,以创新茄子种质资源,推进茄子杂交种优势利用研究。

## 参考文献:

- [1] 马崇坚. 不同化学试剂处理对茄子种子萌发的影响[J]. 种子 2005 24(10): 30-35
- [2] Clark. 顾红雅,礼嘉译. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998: 6-9.
- [3] Fan Qiuling, Liu Min. Research progress in space plant breeding[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2002, 15(3): 231-234.
- [4] 谭雪,郭爽,郑少薇,等. 油绿 80 天菜薹航天诱变后变异株系的 RAPD 分析[J]. 西南大学学报, 2011, 33(8): 1-4.
- [5] 徐荣,刘友刚,孙素琴,等. 太空搭载葫芦巴 SP-4 代生物效应研究[J]. 核农学报 2009 23(2): 262-265.
- [6] 鹿金颖,刘敏,薛淮,等. 俄罗斯“和平”号空间站搭载的番茄随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 航天医学与医学工程 2005, 18(1): 72-74.
- [7] 张健,李金国,王培生,等. 粳稻品种秋光空间诱变突变体的微卫星分析[J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1550-1555.
- [8] 宋美珍,喻树迅,范术丽,等. 棉花航天诱变的农艺性状变化及突变体的多态性分析[J]. 中国农业科技导报 2007 9(2): 30-37.
- [9] 周桂元,洪彦彬,林坤耀,等. 花生空间诱变及 SSR 标记遗传多态性分析[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(3): 238-241.
- [10] 余纪柱,顾晓君,金海军,等. 空间诱变选育特小型黄瓜新种质[J]. 核农学报 2007 21(1): 41-43.
- [11] 谭雪,郭爽,林锦英,等. 菜薹航天诱变后代变异及其 RAPD 标记多态性分析[J]. 中国蔬菜, 2011(10): 54-57.