

茄子抗冷细胞变异体的 RAPD 分析及自交一代株系的抗冷性鉴定

赵福宽, 高遐虹, 程继鸿, 范双喜, 于 颖

(北京农学院 园艺系, 北京 102206)

摘要: 以茄子品系 E-9903 花药低温胁迫培养获得的抗冷细胞变异体为试材, 用 SDS 方法从茄子幼嫩叶片提取 DNA, 选用 40 个长度为 10 个碱基的寡聚核苷酸(OPK01—OPK20, OPJ01—OPJ20)作为 RAPD 引物进行 PCR 扩增反应, 并测定抗冷细胞变异体自交一代株系的冷害指数。结果表明: 以 OPK12 为 PCR 反应引物时 RAPD 扩增谱带在抗冷性植株与同品系的对照株之间存在多态性差异, 抗冷细胞变异体自交一代株系的冷害指数显著低于同品系的对照。

关键词: 茄子; 随机扩增的多态性 DNA; 抗冷性

中图分类号: S641.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0017-03

RAPD Analysis and Identification of Chilling Resistance of Cellular Variation in Eggplant

ZHAO Fu-kuan, GAO Xia-hong, CHENG Ji-hong, FAN Shuang-xi, YU Ying

(Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstract: Chilling-resistant plants regenerated from anther of eggplant strain E-9903 under low temperature stress culture were used as experimental material. DNA was extracted from young leaves using SDS method. Forty 10-base-long oligonucleotide primers were used in polymerase chain reaction. The index of chilling injury of cellular variation S1 progeny were measured. Results showed that polymorphism existed when primer OPK12 was used in polymerase chain reaction. The index of chilling injury of cellular variation S1 progeny were much lower than that of control strain.

Key words: Eggplant; RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA); Chilling resistance

茄子(*Solanum melongena* L)是一种喜温蔬菜, 多数茄子品种在环境温度低于 5℃以下时就会表现明显的冷害症状, 植株体内超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性被显著抑制, 产量和品质显著下降。在植物抗低温突变体筛选方面张明鹏和 Rajashekar 应用悬浮培养进行葡萄细胞抗寒性筛选的研究, 获得了抗寒性细胞系^[1]。林定波用 γ -射线处理和细胞选择相结合的方法获得了抗寒锦橙悬浮细胞系并再生植株, 再生植株仍表现出较强的抗寒性^[2]。瞿国堂等从水稻愈伤组织株系中筛选出了抗冷变异株系^[3]。Majumder 和 Sun 筛选到了水稻抗冷突变体^[4,5]。国外还用细胞突变体选育出了抗冷的亚麻

品种^[6]。1990 年 Williams 等首次采用随机引物扩增寻找多态性 DNA 片段作为分子标记, 并将此法命名为 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)^[7]。进行 RAPD 分析时可用的引物很多, 理论上所检测的区域可覆盖整个基因组, 可对整个基因组 DNA 进行多态性差异检测。目前, RAPD 技术已广泛应用于基因组 DNA 的多态性分析和许多重要农艺性状分子标记的筛选。本项研究以北京农学院园艺系用花药低温胁迫培养获得的茄子抗冷细胞变异体为试材进行基因组 DNA 的 RAPD 分析, 并对抗冷细胞变异体自交一代株系进行抗冷性鉴定, 旨在了解茄子花药低温胁迫培养获得的抗冷细胞变异体的遗传稳定

收稿日期: 2002-04-16

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(5982006)

作者简介: 赵福宽(1962-), 男, 内蒙古人, 博士, 副教授, 主要从事蔬菜育种教学与科研工作。

性,为茄子抗冷性的遗传改良提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 本研究所用植物材料是由茄子品系 E-9903 经花药低温胁迫培养获得的茄子抗冷变异植株。茄子品系 E-9903 是北京农学院园艺系茄子育种课题组采用西安绿茄作基础材料,经 5 代系统选择育成的遗传稳定的品系。

1.1.2 试剂 本研究所用的化学试剂及分子生物学试剂均购自鼎国生物技术公司。

1.1.3 RAPD 引物 在 RAPD 扩增反应中所用的引物均为长度为 10 个碱基的寡聚核苷酸,所用引物及其碱基序列见表 1。

表 1 RAPD 引物及其碱基序列

引物序号	碱基序列(5'-3')	引物序号	碱基序列(5'-3')
OPK01	CATTCGAGCC	OPK11	AATGCCCCAG
OPK02	GTCTCCGCAA	OPK12	TGGCCCTCAC
OPK03	CCAGCTTAGG	OPK13	GGTGTACCC
OPK04	CCGCCCAAAC	OPK14	CCCGCTACAC
OPK05	TCTGTGAGG	OPK15	CTCCTGCCAA
OPK06	CACCTTTCCC	OPK16	GAGCGTGGAA
OPK07	AGCGAGCAAG	OPK17	CCCAGCTGTG
OPK08	GAACACTGGG	OPK18	CCTAGTCGAG
OPK09	CCCTACCGAC	OPK19	CACAGGCGGA
OPK10	GTGCAACGTG	OPK20	GIGTGGCGAG
OPJ01	CCCGGCATAA	OPJ11	ACTCCTGCGA
OPJ02	CCCGTTGGGA	OPJ12	GTCCCGTGGT
OPJ03	TCTCCGCTTG	OPJ13	CCACACTACC
OPJ04	CCGAACACGG	OPJ14	CACCCGGATG
OPJ05	CTCCATGGGG	OPJ15	TGTAGCAGGG
OPJ06	TCGTTCCGCA	OPJ16	CTGCTTAGGG
OPJ07	CCTCTCGACA	OPJ17	ACGCCAGTTC
OPJ08	CATACCGTGG	OPJ18	TGGTGGCAGA
OPJ09	TGAGCCTCAC	OPJ19	GGACACCACT
OPJ10	AAGCCCAGG	OPJ20	AAGCGGCCTC

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 参考 G. Barcaccia^[8] 的方法并稍加修饰进行茄子基因组 DNA 的提取。具体操作步骤如下:首先,将植物样品(约 400 mg)放入 1.5 mL Eppendorf 管,充分磨碎并挤出汁液,加入 400 μ L 预先配制好的 DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0), 50 mmol/L Na_2EDTA , 500 mmol/L NaCl, 1.5% SDS, 10 mmol/L β -mercaptoethanol)振荡约 10 s 后,将 Eppendorf 管(内含样品及 DNA 提取液)称重平衡。然后,以 14 000 r/min 离心 4 min,提取上清液 300 μ L 转移到另一洁净的 Eppendorf 管中,加入等体积的氯

仿,摇匀。再以 14 000 r/min 离心 4 min。将 300 μ L 上清液移至另一洁净 Eppendorf 管中,并加入 2/3 体积异丙醇,充分混匀置-20℃冰箱 30 min。取出后,以 12 000 r/min 离心 10 min,使 DNA 沉淀到 Eppendorf 管底部。再分别用无水乙醇和 75% 的酒精洗涤 DNA。然后将 DNA 干燥,加入 50 μ L TE 缓冲液和 100 μ L 无菌水,作为 DNA 扩增的模板。

1.2.2 PCR 扩增反应 DNA 扩增在 PE-2400 PCR 仪上进行。将提取的对照及抗冷突变株 DNA 用 TE 缓冲液稀释为 50 ng/ μ L。扩增反应体系为:总体积为 50 μ L,其中包含 100 ng 模板 DNA, 8 μ mol/L 引物 2 μ L, dNTP 0.2 mmol/L, 5 μ L 10 倍的反应缓冲液(100 mmol/L Tris HCl, 500 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl_2 , 1.0% Triton X-100), 1U Taq DNA 聚合酶,扩增条件为:94℃预变性 10 min,接着 94℃变性 1 min, 37℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min,反应进行 40 个循环,最后一次循环后 72℃延伸 7 min。

1.2.3 RAPD 多态性分析 PCR 反应产物加入 1/6 体积的 DNA 加样缓冲液,取 25 μ L 在 1.2% 的琼脂糖凝胶上以 3.5V/cm 电压电泳 3 h,电泳结束后将凝胶浸入溴化乙锭溶液(0.5 μ g/mL)中染色 45 min,然后在紫外灯下观察照像并进一步分析抗冷植株与对照植株 RAPD 扩增谱带的差异。

1.2.4 抗冷性鉴定 将抗冷变异株有性繁殖 1 代的种子播种于营养钵,待幼苗长有 4~6 片真叶时置 3±2℃冰箱处理 2 d,观察受害情况,据植株冷害症状分为 5 级,统计各级植株数计算冷害指数。冷害分级标准及冷害指数的计算公式如下^[9]:

冷害分级标准:0 级 无症状;1 级 植株下面叶片叶缘翻卷;2 级 叶片翻卷下倾,叶缘失水,有斑点水渍;3 级 叶片下倾,有的叶片全叶斑状水渍或水渍成片,心叶正常;4 级 全部叶片严重失水、下垂,或全叶呈干枯状。

冷害指数(%)=[(a₁x₁+a₂x₂+……+a_nx_n)/n·T]×100

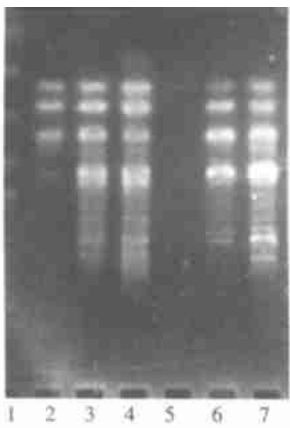
式中 x₁, x₂……x_n 为各级冷害的茄子株数, a₁, a₂……a_n 为冷害等级, T 为调查的总株数。

2 结果与分析

2.1 抗冷变异株的 RAPD 分析

对诱导获得的抗冷变异株采用 40 个随机引物(OPK01~20; OPJ01~20)进行基因组 DNA 的 RAPD 扩增,选用的 40 个 RAPD 引物有 29 个引物有扩增

产物。OPK12 为引物时, 抗冷变异株和对照株的扩增谱带存在明显差异。对照株扩增出清晰的 4 条带, 而抗冷变异株除扩增出与对照相对应的 4 条带, 还扩增出另外 2~4 条分子量大于 1000 bp 的 DNA 带, 其中有一条 DNA 带为 4 个抗冷变异株共有, 据此推测这条带很可能是与抗冷性有关的特异带。这暗示由茄子品系 E-9903 花药(粉)愈伤组织经低温胁迫培养获得的再生植株在 DNA 分子水平上已经发生了微细的变化。



第 1 泳道是 PCR 标准分子量参照。从靠近点样孔的一条带起各谱带所代表的分子量大小依次为 1000 bp、750 bp、300 bp、150 bp 和 50 bp。第 2 泳道为对照株的 RAPD 扩增谱带, 第 3、4、6、7 泳道为抗冷株的 RAPD 扩增谱带。第 5 泳道为不加 DNA 模板的空白对照

图 1 OPK 12 引物 RAPD 扩增产物电泳图谱

2.2 抗冷变异株系冷害指数的测定

对抗冷变异株有性繁殖 1 代(TC1~TC4)进行冷害指数测定的结果表明, 抗冷株系的冷害指数为 18.33%~44.17%, 而对照株系 E-9903 的冷害指数为 72.22%(图 2)。差异显著性分析的结果表明, 抗冷变异株有性繁殖一代与对照之间冷害指数的差异达到极显著水平, 说明抗冷变异株的抗冷性状经有性繁殖后仍能保持。

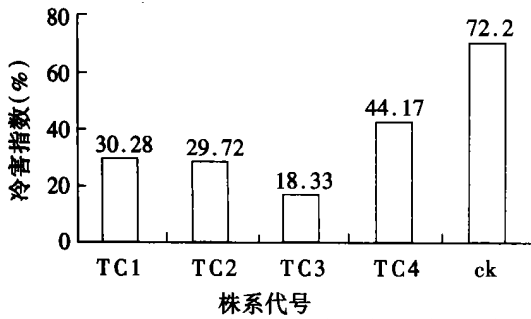


图 2 茄子抗冷细胞变异体自交一代株系的冷害指数

3 讨论

通过组织离体培养, 再加以低温选择压可以诱导植物产生抗冷性, 而诱导产生的抗冷性在育种工

作中是否具有实际应用价值, 则取决于获得的抗冷性是否可以稳定遗传。有关植物组织离体培养获得的抗冷性遗传稳定性的研究已有报道, Dorffing 等^[10]通过组织离体培养获得小麦抗冷变异系并对其遗传稳定性进行了分析, 发现耐冷性直至自交 4 代后仍能较稳定地遗传。从遗传学的角度来分析, 实际上诱导产生的抗冷性是否可以遗传关键取决于是否在 DNA 水平上产生了与抗冷性有关的变异。本项研究对茄子花药(粉)经低温胁迫培养获得的抗冷植株进行 RAPD 扩增的结果表明, 抗冷变异株的扩增产物与对照存在多态性差异, 这初步证明诱导产生的抗冷性与基因组 DNA 某些区域的微细变化有关, 而且抗冷变异株有性繁殖一代仍表现较强的抗冷性, 据此可推测抗冷株的抗冷性状可望稳定遗传。

参考文献:

[1] 张明鹏, Rajashanker C B. 利用悬浮培养进行葡萄细胞抗寒性筛选的研究[J]. 园艺学报, 1992, 19(1): 135-139.

[2] 林定波. 柑橘抗寒细胞变异体选择及其抗性生理研究[D]. 杭州: 浙江农业大学园艺系, 1996.

[3] 瞿国堂. 水稻耐寒变异体筛选[J]. 广西农业大学学报, 1996, 15(3): 209-213.

[4] Majumder M K, Seshu D V, Shenoy V V. Implication of fatty acids and seed dormancy in a new screening procedure for cold tolerance in rice [J]. Crop Science, 1989, 29: 1298-1304.

[5] Sun Z, Sun L, Shu L. Utilization of Somaclonal Variation in rice breeding [A]. In: Bajaj Y P S. Rice [M]. Paris: Springer-Verlag, 1991. 328-346.

[6] 朱至清. 细胞工程与植物改良[A]. 高技术新技术农业应用研究—全国高技术新技术农业应用学术讨论会文集[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991. 58-61.

[7] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K T, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.

[8] Barcaccia G, Rosellini D. A quick method for the isolation of plant DNA suitable for RAPD analysis [J]. J Genet and Breed, 1996, 50: 177-180.

[9] 周宝利, 王月英, 林桂荣, 等. 以托鲁巴姆为砧木的茄子嫁接苗耐低温特性研究[J]. 辽宁农业科学, 1999, (1): 5-8.

[10] Dorffing K. Heritable improvement of frost tolerance in winter wheat by in vitro selection of hydroxy proline-resistant proline over producing mutants[J]. Euphytica, 1997, 93: 1-10.