

利用 RAPD 技术快速鉴定番茄体细胞无性系变异

李继红 邵寒霜 郑学勤

(中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要 从以镰刀菌酸为选择剂筛选的番茄再生植株和未经筛选的植株叶片中提取 DNA, 建立了适合番茄 RAPD 分析的 PCR 条件, 进一步在 60 个随机引物中找到了 4 个可用于鉴定四个番茄品种体细胞无性系变异的引物。利用该法鉴定体细胞无性系变异不仅简单、迅速、可靠, 而且因 DNA 的用量少, 不影响被检植株的后期生长, 可尽早淘汰那些生理适应性而非分子水平发生变异的再生植株。

关键词 番茄; RAPD; 体细胞无性系变异株鉴定

中图分类号 Q94-336

RAPID IDENTIFICATION OF TOMATO SOMACLONAL VARIATION WITH RAPD

Li Jihong Shao Hanshuang Zheng Xueqin

(National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Chinese Academy for Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101)

Abstract Total DNA was extracted from the leaves of generated tomato plants that were screened and non-screened with fusaric acid, and was used to make the optimization for RAPD analysis. Four of the 60 random primers were adapted for the identification of somaclonal variation. This kind of method is not only simple, rapid, but also accurate. Furthermore, because the quantity of the DNA template is less, it is not influential in the growth of the tested plants. Therefore, this method can help us to pick out the plants that are physiologically tolerant, whereas mutant plants are reserved.

Key words Tomato; RAPD; Somaclonal variation identification

目前利用植物组织培养技术离体筛选抗病突变体一般采用将病原菌毒素加入培养基中作为选择因子, 正向筛选抗病细胞和植株^[1]。Hartman 等认为在毒素的选择压力下, 易产生某些生理适应性变异体, 一旦选择压力消失, 这些变异体又恢复到原来的对毒素敏感状态, 因而必须对选择的抗性变异体进行抗性稳定性鉴定^[2]。现多采用经过无毒素回复培养, 再筛选能在毒素培养基上继续正常生长的愈伤组织^[3]。该法不仅所需时间长, 而且由于继代时间的延长而影响植株的再生频率, 因此, 需要一种从 DNA 水平上迅速、有效地鉴定体细胞杂种的简便方法。

近年来发展起来的随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术, 其反应条件可标准化, 只需少量的材料 (DNA) 即可完成反应程序得到结果, 该法现已在动物、植物、人类遗传作图和基因分析等诸多领域广泛应用^[4], 但在鉴定体细胞无性系

变异方面尚未见报道。本文就其在番茄体细胞无性系变异株鉴定上的应用进行了探讨。

1 材料和方法

1.2 材料

番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 品种为丽春、中蔬四号 (购自中国农业科学院蔬菜研究所); 大肉番茄、S2 号 (本实验室保存), 随机选取未经筛选株、组织培养再生株和毒素镰刀菌酸 (FA) 筛选再生植株各若干。

Taq DNA 聚合酶, dNTPs, DNA 标准分子量 λ DNA/Hind III + EcoR I, 琼脂糖购自华美生物工程公司上海分公司; 随机引物购自北京大北方生物技术发展中心, 共 3 组 (OPB、OPK、OPH) 60 个; 其它化学试剂均为国产分析纯试剂。PCR 仪为 PE 公司生产的 Thermal Cycler。

1.2 方法

模板 DNA 的提取及浓度测定 番茄总 DNA 抽提参见文献[4]。用紫外分光光度计 (Beckman Du-70 型) 测定浓度并稀释成 $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, 用于 PCR 扩增。

PCR 扩增及电泳分析 PCR 反应液中各组分的浓度分别为: 随机引物 0.5 pmol/L ; dNTPs 0.25 mmol/L ; $1 \times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液; $1-2 \text{ ng}$ 模板 DNA。94 °C 预变性 10 min, 随后加入 1.5 U Taq DNA 聚合酶和 50 μl 液体石蜡, 94 °C 1 min, 36 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 44 个循环。反应结束后取 12.5 μl 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外灯下观察并照像。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选

为了避免工作的盲目性及尽快地得到试验结果, 首先用 60 个寡核苷酸引物分别扩增 4 个栽培品种的未经筛选株 (CK1)、无选择压力上的再生植株 (CK2) 和 FA 筛选株 (S1、S2) 4 个样品, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳结果表明扩增所得的 DNA 条带清晰, 根据带型差异可分为如下三种类型: 类型 1 是引物对 4 个样品的 DNA 扩增带型相同或基本相同, 占全部所用引物的 86.67% - 91.67%, 因品种的不同而有差异 (图 1)。类型 2 是引物对 CK2、S1、S2 扩增带型相同, 而与 CK1 不同, 这种占全部所用引物的 6.67% - 11.67% (图 2)。类型 3 是引物 CK1 和 CK2 的扩增带型相同, 而与 S1 和 S2

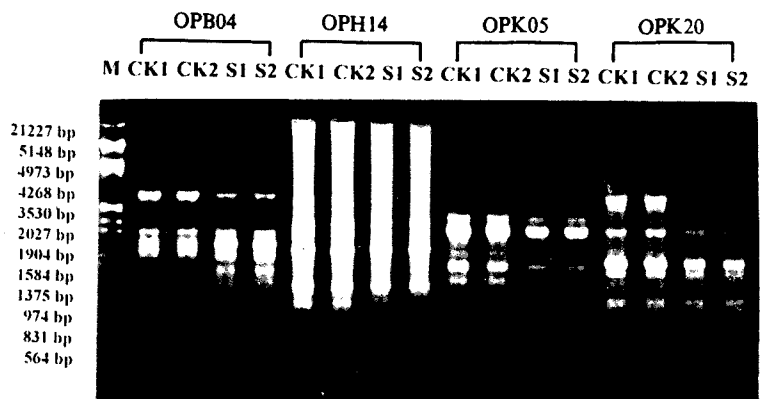


图 1 OPB04、OPH14、OPK05 和 OPK20 对 4 个品种的扩增结果
Fig. 1 The result of primers OPB04, OPH14, OPK05 and OPK20 amplified four cultivars

M— DNA 标准分子量 λ DNA/Hind III + EcoR I

的扩增带型不同, 这种情况仅占全部所用引物的 1.67% (图 3)。由此可见, 只有类型 3 的带型可区分出 FA 筛选株, 对这些引物进行重复试验, 结果完全一致, 因此可用引物 POH12、OPB18、OPH06 及 OPK17 对 4 个品种的筛选株进行 RAPD 检测。

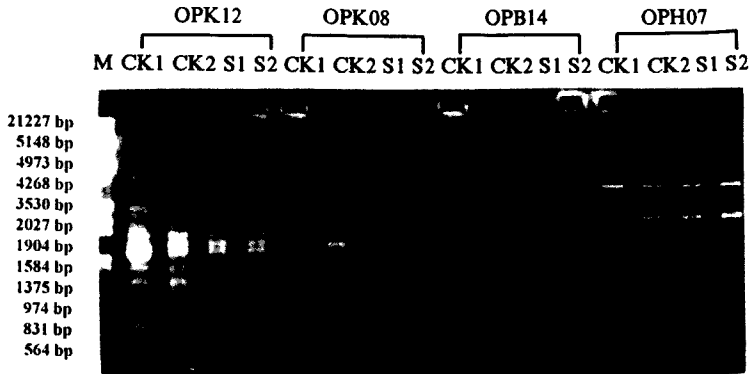


图 2 OPK12、OPK08、OPB14 和 OPH07 对 4 个品种的扩增结果

Fig. 2 The result of primers OPK12, OPK08, OPB14 and OPH07 amplified four cultivars
M— DNA 标准分子量 λ DNA/Hind III + EcoR I

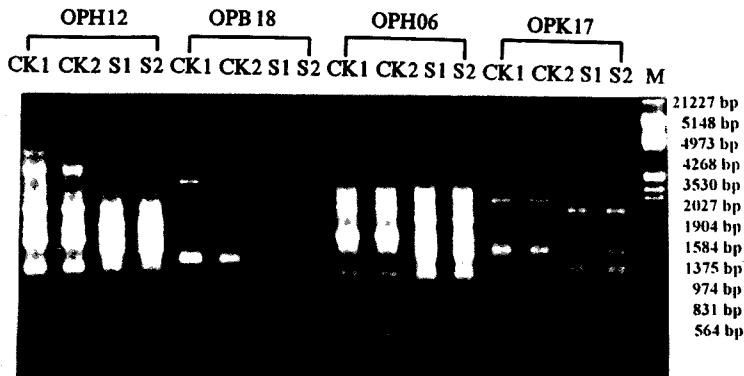


图 3 OPH12、OPB18、OPH06 和 OPK17 对 4 个品种的扩增结果

Fig. 3 The result of primers OPH12, OPB18, OPH06 and OPK17 amplified four cultivars
M— DNA 标准分子量 λ DNA/Hind III + EcoR I

2.2 体细胞无性系变异的 RAPD 检测

本实验设计了两个对照, 即亲本植株和无选择压力下再生植株, 根据筛选出的引物对各品种中的两株亲本植株 (CK1-1, CK1-2)、三株无选择压力下再生植株 (CK2-1, CK2-2, CK2-3) 及五株有选择压力下再生植株 (S1-S5) 的 DNA 进行 PCR 扩增, 结果见图 4-7, 图 4 是随机引物 OPH12 对品种丽春的 PCR 检测, 从图中可见 FA 作用下的再生植株扩增条带与对照相比在约 500 bp 处多一条特异片段。图 5 是随机引物 OPB18 对品种中蔬四号的 PCR 检测, 从图中可见 FA 作用下的再生植株扩增条带与对照相比在约 1100 bp 处增加一条特异片段。图 6 是随机引物 OPH06 对品种大肉番茄的 PCR 检测, 从图中可见 FA 作用下的再生植株扩增

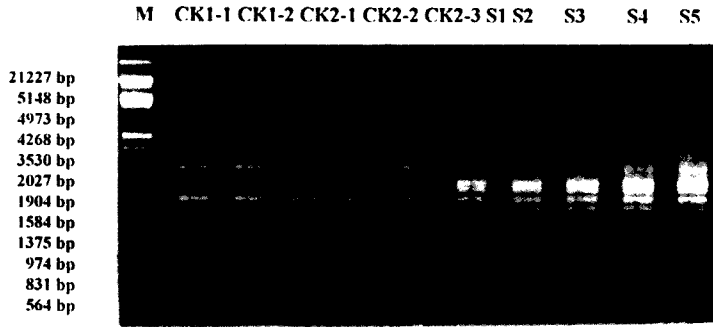


图 4 随机引物 OPH12 对品种丽春的 PCR 扩增结果

Fig. 4 The result of primer OPH12 amplified cultivar Lichun

M— DNA 标准分子量 λ DNA/Hind III +EcoR I

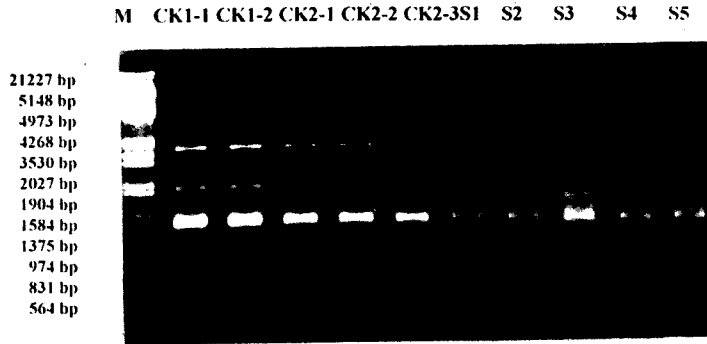


图 5 随机引物 OPB18 对品种中蔬四号的 PCR 扩增结果

Fig. 5 The result of primer OPB18 amplified cultivar Zhongshu No.4

M— DNA 标准分子量 λ DNA/Hind III +EcoR I

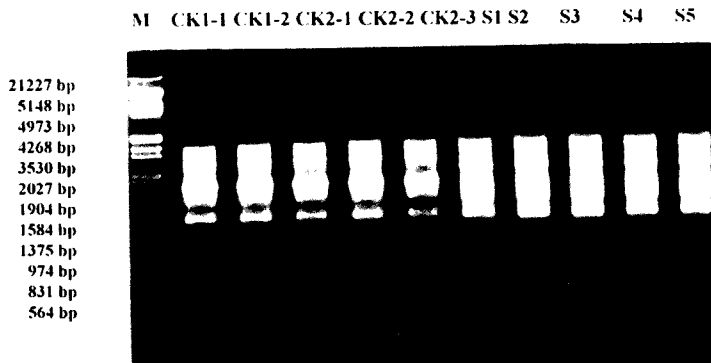


图 6 随机引物 OPH06 对品种大肉番茄的 PCR 扩增结果

Fig. 6 The result of primer OPH06 amplified cultivar Darou

M— DNA 标准分子量 λ DNA/Hind III +EcoR I

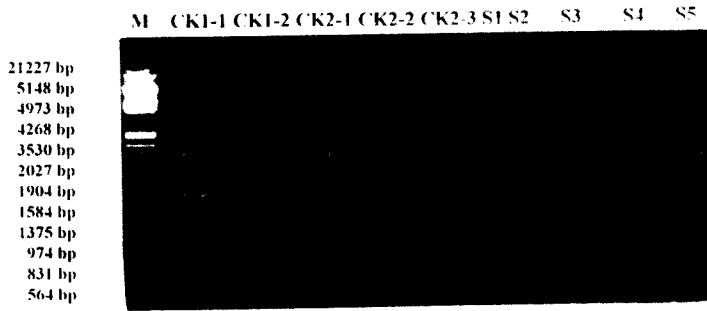


图7 随机引物 OPK17 对品种 S2 号的 PCR 扩增结果

Fig. 7 The result of primer OPK17 amplified cultivar No. S2

M— DNA 标准分子量 λ DNA/Hind III + EcoR I

条带与对照相比在约 1000 bp 处多一条特异片段。图 7 是随机引物 OPK17 对品种 S2 号的 PCR 检测，从图中可见 FA 作用下的再生植株扩增条带与对照相比在 200 bp 左右处缺失一条特异片段。本结果说明对照株及有选择压力下的再生植株在分子水平上存在明显的多态性，且重复性较好，因此也说明了我们的多态性随机引物能够区分出亲本植株、无选择压力下再生植株及有选择压力下再生植株，即本方法在对突变体的鉴定上是适用的。

3 讨论

由毒素筛选出来的再生植株到底是分子水平上发生了变异还是一种生理性适应，以及有选择压力下再生植株和无选择压力的再生植株分子水平上是否有差异，在常规育种中要解释这些问题是很困难的，但利用 RAPD 方法检测出的多态性可分为三种类型，即扩增产物的长度多态性，扩增条带的有无(零等位)以及条带强度。模板 DNA 上引物同源序列之间发生的 DNA 片段的插入或缺失是导致扩增产物长度多态性的原因；引物结合位点内核苷酸序列的变化(突变、插入和缺失)是丢失或产生新的扩增条带的原因，扩增条带强度的变化则来自模板 DNA 中扩增片段拷贝数的差异以及引物与模板 DNA 错配程度的差异。因此，用 RAPD 法鉴定体细胞无性系变异株具有快速、准确、可靠的优点，同时，因取样量很少，不至于影响被检植株的后期生长。本实验中经毒素筛选的再生植株在分子水平上与不经毒素筛选的再生植株有差异，是由于毒素起到了定向筛选的作用，这对将来研究毒素对植物体作用的机理有一定的帮助。总之，采用将病原毒素加入培养基中作为选择因子，正向筛选抗病细胞和植株，进而培育成抗病种质^[9]。而在抗性突变体选择过程中，分子生物学技术是获得具有遗传能力的突变体，减少选择盲目性的一个有力工具，并有助于了解病原菌毒素对植物组织的作用机制。

参考文献

- 1 赵成章. 再论植物体细胞无性系变异及作物改良. 生物工程进展, 1993, 13(4):32-35
- 2 Hartman C L, McCoy T J, Knous T R. Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Plant Science Letter, 1984, 34:183-194
- 3 李社荣, 张敬, 李安生等. 小麦抗赤霉菌毒素细胞变异体的筛选及再生植株生化特性分析. 农业生物技术学报, 1997, 5(3):216-220
- 4 肖顺元, Frederick G Gmitter, Jude W Grosser 等. RAPD 分析—鉴定柑桔体细胞杂种的快速方法. 遗传, 1995, 17(4):40-42