

RAPD 鉴定番茄一代杂种遗传纯度的研究^{*}

高 蓝¹,傅建熙¹,王建华²,王 荣²

(1 西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨陵 712100;2 西安市 园艺研究所,陕西 临潼 710603)

[摘 要] 以番茄优良一代杂交种毛粉808、毛粉818和强选一号为材料,提取DNA进行RAPD分析,在300个RAPD随机引物中筛选出了可鉴定3个品种一代杂种遗传纯度的特异性引物。其中S₁₀₁₉,S₁₃₈₈和S₁₄₂₂可用于这3个品种的纯度鉴定;S₁₀₇₂可用于毛粉808和毛粉818的纯度鉴定;S₁₃₈₈可用于区分3个品种的父本和子代。

[关键词] RAPD;番茄;一代杂种;遗传纯度鉴定

[中图分类号] S641.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)03-065-04

番茄(*Lycopersicon esculentum*, Mill)是重要的蔬菜作物,其杂种优势十分明显,现有的大部分番茄品种均为一代杂种。由于番茄是自花授粉植物,在制种中稍有不慎,人工去雄不及时就会造成母本自交产生假杂种,这是番茄一代杂种遗传纯度控制中的主要问题,也是纯度检测的主要指标。目前,对一代杂种的遗传纯度鉴定主要采用形态学鉴定方法,该方法需要进行田间种植,费时费力,有时鉴定结果还会受到环境的影响,因此鉴定效率低、准确性差。同工酶方法也已成功地用于一些杂种的鉴定工作^[1~2],但这种方法具有组织器官及发育的特异性,且可标记的位点较少,从而限制了该方法的应用。RAPD是近年来发展起来的一种有应用前景的新方法,其特点是检测的多态性范围大,可直接检测DNA水平的变化,检测结果不受环境条件的影响^[3]。本文对番茄一代杂交品种毛粉808、毛粉818和强选一号进行了RAPD分析,筛选出可用于鉴定这3个品种遗传纯度的RAPD随机引物。其中毛粉808和毛粉818是2000年农业部推广的优良番茄品种。并对西北地区广泛种植的优良番茄品种毛粉802和西粉三号进行了RAPD扩增试验。

1 材料与方 法

1.1 材 料

毛粉808、毛粉818和强选一号及其亲本由西安市园艺研究所提供。毛粉802、西粉三号购自市场。

RAPD扩增反应所用的试剂与仪器: Taq酶购自上海 Promega 公司; dNTP 和 RAPD 引物购自上

海生物工程公司; PCR 扩增仪为 PE 公司的9600型。

1.2 方 法

材料制备 分别种植毛粉808、毛粉818和强选一号及其亲本,毛粉802和西粉三号,在幼苗期各取5~6株幼苗的叶片提取DNA。毛粉802、毛粉808和毛粉818均有两种类型的植株,一类全株覆有细密的白色茸毛,称为“毛苗”,有避蚜作用;一类为茸毛密度正常的植株,称为“光苗”,对这两类植株分别提取DNA。

模板DNA的提取 DNA提取参考杨崇林等^[4]的方法经改进而成。称取0.5g叶片,洗净后在液氮中磨成粉末,移至5mL经60℃预热的2×CTAB缓冲液(20g/L CTAB, 1.4mol/L NaCl, 0.02mol/L EDTA, 0.1mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2mL/L 巯基乙醇)中,在60℃水浴中保温30min,用等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提2次,水相加入2/3体积预冷异丙醇,置-18℃沉淀2h后以5000r/min离心10min,沉淀溶于2mL无菌双蒸水中,加入1/10体积的NaAc溶液(3mol/L, pH 5.2)和2倍体积的无水乙醇,置-18℃沉淀2h后以5000r/min离心10min,沉淀以700mL/L乙醇洗2次,挥干乙醇,溶于400μL pH 8.0的TE缓冲液中。以紫外光吸收法测定DNA的质量浓度,调整DNA的质量浓度为80ng/μL。

RAPD体系的建立 对RAPD反应体系进行了优化,采用20μL的反应体系。各因素的选择范围:模板DNA用量每反应40~80ng, 4×dNTP浓度各为0.1~0.4mmol/L, Mg²⁺浓度为1.5~

^{*} [收稿日期] 2000-07-10

[作者简介] 高 蓝(1964—),女,河北元氏人,青岛大学在职博士,主要从事生物化学研究。

3 mmol/L, Taq 酶用量每反应1~2 $\mu\text{mol}/\text{min}$, 热循环参数中的预变性温度为94~97 $^{\circ}\text{C}$, 退火温度为34~36 $^{\circ}\text{C}$ 。

RAPD 反应条件 在20 μL 反应体系中含10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl_2 , 4 $\times$ dNTP 各0.2 mmol/L, 60 ng 引物, 80 ng 模板 DNA, 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ Taq 酶, 在反应液上覆盖20 μL 的石蜡油; 热循环参数为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, 36 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min 的程序扩增45个循环, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。扩增产物在15 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳, 经 EB 染色后在凝胶成像仪中观察照像。

2 结果与讨论

2.1 RAPD 反应体系的稳定性

RAPD 扩增反应由于所用的10 bp 引物较短, 使扩增结果有时出现不稳定的情况, 如扩增的弱带在重复扩增时有可能消失, 因此当多态性扩增片段为弱带时一定要通过多次重复试验才能进行确认。另外, 对参加扩增反应的所有种类的模板 DNA 需要在反应条件优化时采用多个引物进行扩增试验, 大多数引物对这些模板的扩增结果应是完全一致的, 从一致性对比试验中可以保证各模板反应性能的均一性, 为筛选多态性引物创造条件。图1为非特异性引物 S503 (序列为 ACACAGAGGG) 对毛粉802、毛粉808、毛粉818、强选一号和西粉三号的扩增结果, 可以看到扩增结果完全一致。

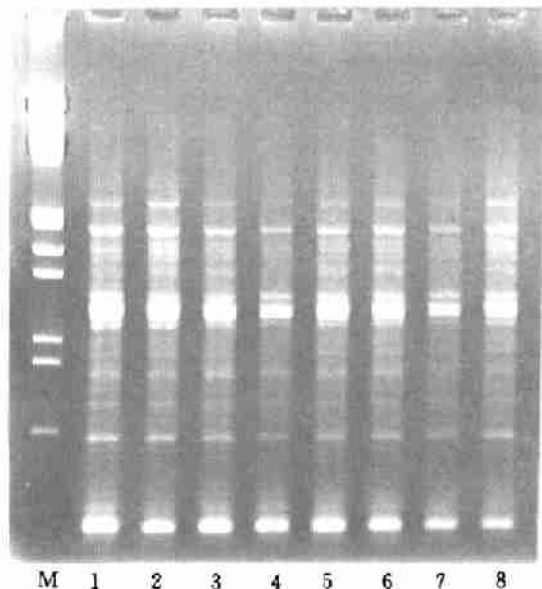


图1 毛粉802、毛粉808、毛粉818、强选一号和西粉三号以 S₅₀₃ 扩增的结果

M. DNA *EcoR* I / *Hind* III 双酶切分子质量标记;
1. 毛粉802毛苗; 2. 毛粉802光苗; 3. 毛粉808毛苗;
4. 毛粉808光苗; 5. 毛粉818毛苗; 6. 毛粉818光苗;
7. 强选一号; 8. 西粉三号

Fig 1 Electrophoretic patterns of PCR amplified DNA products using primer S₅₀₃ from Genomic DNAs of tomato commercial cultivars Wool-Pink802, Wool-Pink808, Wool-Pink818, Qiangxuan1 and West-Pink3. M. Molecular size markers (DNA *EcoR* I / *Hind* III -digest).
1. 3. 5. wooly F₁ hybrid of Wool-Pink 802, 808, 818 respectively;
2. 4. 6. normal F₁ hybrid of Wool-Pink 802, 808, 818 respectively;
7. F₁ hybrid of Qiangxuan1; 8. West-Pink3

2.2 多态性引物的筛选

以毛粉808、毛粉818、强选一号的父母本为模板, 筛选了300条引物, 得到4条多态性引物。见表1。

表1 多态性引物及其扩增片段

Table 1 RAPD primer and amplified polymorphic fragments

引物号 Primer number	引物序列 Primer sequence	特异片段长度/bp Band length	杂种纯度鉴定 Purity identification	区分杂种与其父本 Separate F ₁ hybride from mole parent
S ₁₀₁₉	GGCAGTTCTC	400	+	
S ₁₀₇₂	AGTGTAAGCCC	680	+	
S ₁₃₈₈	TCCGCAGTAG	940 800	+	+
S ₁₄₂₂	GTCGTCGTCT	1 270	+	

注: + 表示有效。

Note: + present effect.

2.3 番茄基因组的 RAPD 扩增图谱

图2箭头所示约400 bp 的片段是引物 S₁₀₁₉ 扩增的毛粉808、毛粉818和强选一号及其父本所特有的片段, 从而可以用来鉴定这3个一代杂种的遗传纯度。

图3箭头所示约1 270 bp 的片段是引物 S₁₄₂₂ 扩增的毛粉808、毛粉818和强选一号及其父本所特有的片段, 从而可以鉴定这3个一代杂种的遗传纯度。

图4箭头所示约940 bp 的片段是引物 S₁₃₈₈ 扩增的毛粉808、毛粉818和强选一号的母本及子代特有

的片段,这个片段可用于区分这3个一代杂种和它们的父本。约800 bp 的片段是毛粉808、毛粉818和强选一号及其父本所特有的片段,从而可以鉴定这3个一代杂种的遗传纯度。

图5箭头所示约680 bp 的片段是引物 S_{1072} 扩增的毛粉808和毛粉818及其父本所特有的片段,从而可以鉴定这2个一代杂种的遗传纯度。

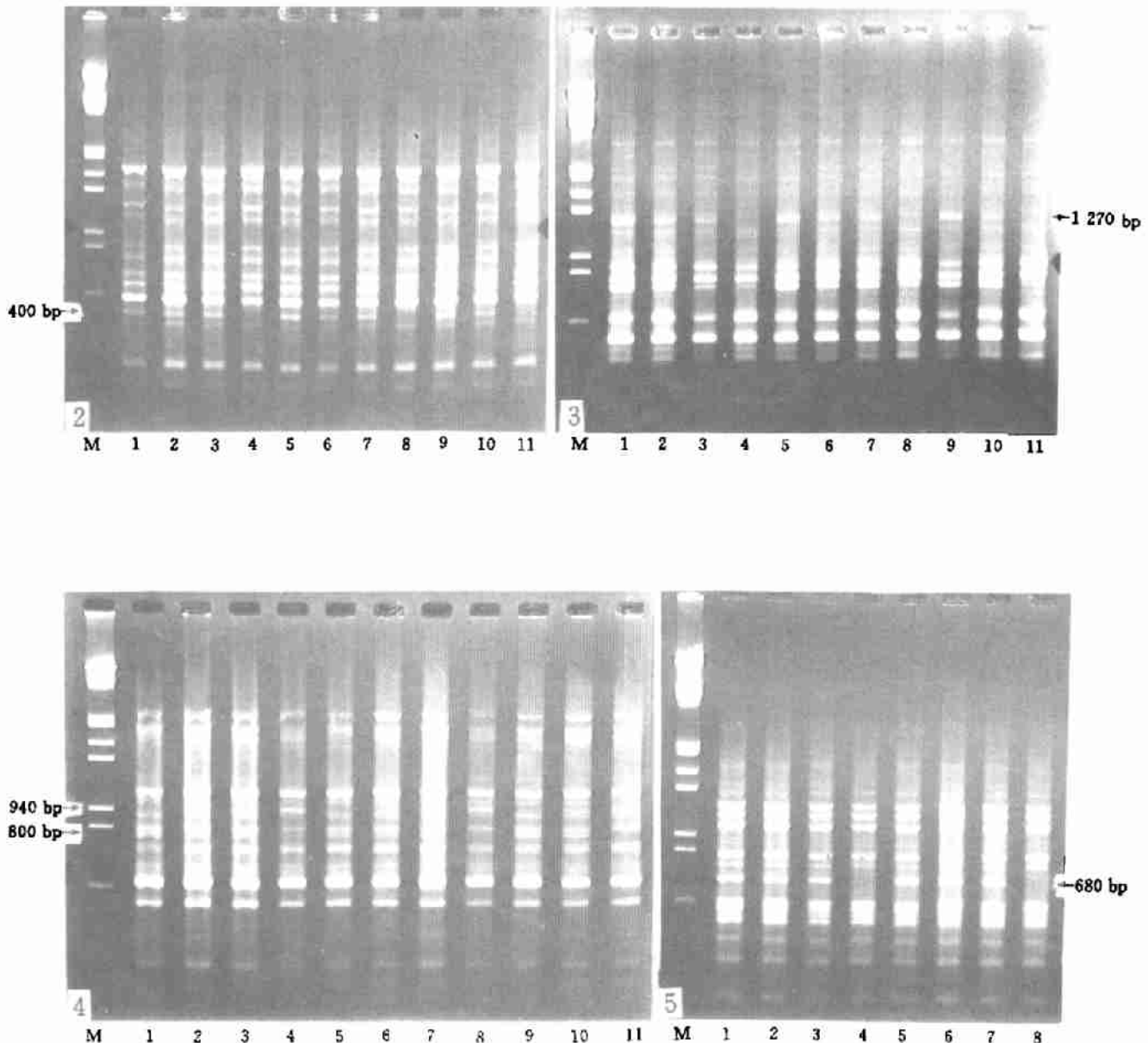


图2~5 4个特异引物对毛粉808、毛粉818和强选一号及其亲本的扩增图谱

M. λ DNA *EcoR* I / *Hind* I 双酶切分子质量标记。1. 毛粉808父本; 2. 毛粉808毛苗; 3. 毛粉808光苗; 4. 毛粉808母本; 5. 毛粉818父本; 6. 毛粉818毛苗; 7. 毛粉818光苗; 8. 毛粉818母本; 9. 强选一号父本; 10. 强选一号; 11. 强选一号母本

Fig 2-5 Electrophoretic patterns of PCR amplified DNA products using primer S_{1012} , S_{1072} , S_{1358} , S_{1422} from Genomic DNAs of tomato commercial cultivars Wool-Pink808, Wool-Pink818, Qiangxuan1 and their parents. M. Molecular size markers (DNA *EcoR* I / *Hind* I -digest). 1-4. Male parent of Wool-Pink 808, wooly F_1 hybrid of Wool-Pink808, normal F_1 hybrid of Wool-Pink 808, female parent of Wool-Pink808 respectively; 5-8. male parent of Wool-Pink 818, wooly F_1 hybrid of Wool-Pink818, normal F_1 hybrid of Wool-Pink 818, female parent of Wool-Pink818 respectively; 9-11. male parent of Qiangxuan1, F_1 hybrid of Qiangxuan1, female parent of Qiangxuan1

3 小 结

本研究在300个 RAPD 随机引物中筛选出了可鉴定番茄优良一代杂种毛粉808、毛粉818和强选一号遗传纯度的 RAPD 随机引物共4条,其中 S_{1019} 、 S_{1388} 和 S_{1422} 可用于这3个品种的纯度鉴定, S_{1072} 可用于毛粉808和毛粉818的纯度鉴定。 S_{1388} 可扩增出2条特异性片段,1条为母本和子代的特有片段,可用于区分3个品种与它们的父本,1条为父本和子代特有

的片段,可用于3个品种的纯度鉴定。

本研究找到的几条特异性引物可用于毛粉808、毛粉818和强选一号的纯度鉴定,从而在番茄种子的生产实践中发挥了一定的作用。在300个随机引物中仅选出4个能在父本和一代杂种中扩增出母本所没有的多态性条带的引物,即可以用于这3个一代杂种纯度鉴定的引物,表明番茄的栽培品种之间的遗传背景十分相似,这可能与番茄自花授粉的习性有关^[5]。

致谢:西北农林科技大学生命科学院生理生化教研室郭蔼光老师,西北农林科技大学生物工程中心张涌老师、郭泽坤老师和王保莉老师及小麦中心朱建楚老师在本项工作中给予很多帮助,在此表示衷心的感谢。

[参考文献]

- [1] 黄永芬,汪清胤,王海廷. 从番茄过氧化物酶同工酶表型差异探讨杂种优势机理[J]. 遗传学报,1985,12(3):193—199.
- [2] 方文德,李卓杰,傅家瑞. 用 ACP 及 ADH 同工酶等电聚焦快速鉴定番茄杂种纯度[J]. 园艺学报,1996,23(2):202—204.
- [3] Rom M, Bar M, Rom A, et al. Purity control of F_1 hybrid tomato cultivars by RAPD markers[J]. Plant Breeding, 1995, 114(2):188—190.
- [4] 杨崇林,汪 敏,李 毅,等. 番茄抗病基因 Cf_9 的3'UTR 区含有内含子序列[J]. 植物学报,1998,40(9):809—813.
- [5] Rick C M. Germplasm resources in the wild tomato species[J]. Acta Horticulturae, 1986, 190:39—47.

Identification of genetic purity for tomato F_1 hybrids by means of RAPD

GAO Lan¹, FU Jian-xi¹, WANG Jian-hua², WANG Rong²

(1 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Horticulture Institute of Xian, Lintone, Shaanxi 710603, China)

Abstract: Extract DNA from three commercial tomato F_1 hybrid cultivars, “Wool-Pink808”, “Wool-Pink818”, “Qiangxuan1” and their parents, these DNAs were subjected to RAPD screening with 300 RAPD primers, and DNA from other cultivars “Wool-Pink802” and “West-Pink3” were also used to RAPD analysis. Four primers S_{1019} 、 S_{1072} 、 S_{1388} and S_{1422} were found to be useful for identifying these cultivars's purity. Three of them could be used to identify the three commercial tomato F_1 hybrid cultivars's purity while primer S_{1072} could be used to identify the purity of “Wool-Pink808” and “Wool-Pink818”. The primers S_{1388} could separate the male parents from the F_1 hybrid of the three cultivars. Using RAPD marker will be the alternative method for phenotypic tests method to control tomato F_1 hybrid's purity and to identify tomato cultivars.

Key words: RAPD; Tomato; Genetic hybrid; purity identification