

试验研究

利用 RAPD 方法鉴定两个
春甘蓝品种的纯度

庄木 王晓武 杨丽梅 刘玉梅 孙培田 方智远

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘要 利用 RAPD (随机扩增多态性 DNA) 方法,通过对 100 个随机引物的筛选获得能区分中甘 11 号及其亲本和 8398 及其亲本的引物 OPRI5,并得到单株验证。结果表明,利用 RAPD 方法对中甘 11 号和 8398 这两个早熟春甘蓝一代杂种进行快速、准确的纯度鉴定是可行的。

关键词 甘蓝 RAPD (随机扩增多态性 DNA) 品种纯度

甘蓝是我国重要的蔬菜作物之一。当前北方地区的春甘蓝主栽品种中甘 11 号和 8398 均是利用自交不亲和系配制的一代杂种,由于制种过程中管理措施不当和自交不亲和性本身的缺陷常会产生自交种子,即假杂种。纯度不高的种子会给生产造成很大的损失,因此,生产的种子在销售前必须进行纯度鉴定。传统的纯度检验多采用田间鉴定法,它既占用土地,又需耗费较长的时间,影响种子的及时销售。为了使合格种子尽快应用于生产,本试验试图利用 RAPD (即随机扩增多态性 DNA) 方法,实现甘蓝一代杂种纯度的快速鉴定。

1 材料和方法

1.1 试验材料

引物筛选和验证以中甘 11 号和 8398 及它们各自的亲本 01-88、02-12 和 01-20、79-156 成株叶片为材料。商品种子纯度检验用在培养皿中催芽 5~7 d(天)的幼苗。

RAPD 扩增用的引物为 Operon 公司提供的 10 个碱基的 10 套引物(OPA、OPB、OFL、OPM、OPN、OPO、OPP、OPR、OPS、OPT) 共计 100 个。

1.2 试验方法

DNA 提取参考 Haymes 的简易 CTAB 法^[1],DNA 浓度调整为 $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 左右。引物筛选 DNA 为 10 个单株的混合样,引物验证及纯度检验 DNA 为单株样。

扩增缓冲液为 Promega 公司提供的 PCR 缓冲液,扩增体积为 $10 \mu\text{L}$,包含模板 20 ng、引物 3.2 pmol、Taq 酶 0.4 U,另有 $20 \mu\text{L}$ 石蜡油,其它成分同文献^[2]。扩增程序为 95 热启动 3 min(分),然后 94 变性 20 s(秒),36 退火 40 s(秒),72 延伸 1 min(分) 20 s(秒),共 40 个循环。

采用 4% 的聚丙烯酰胺凝胶进行垂直板电泳,电压 250 V,稳压,2 h(小时)。电泳后进行银染,先用 A 液(95%乙醇 52.5 mL + 冰醋酸 2.5 mL + 去离子水 445 mL) 3 min

收稿日期:1998-12-21;修回日期:1999-05-11

划,制定相应政策,建立省级蔬菜发展、引导、风险、调控基金。二是把蔬菜产业纳入政府工作议程,并纳入种植业调整财政预算方案。三是完善必要的网络联系手段,改变目前靠

传统报表获取市场信息的落后方式。省与主产区通过微机联网的方式建立全省蔬菜产销联络网,为领导决策和蔬菜产业建设服务。四是在政策上建立促进外销机制。

(分),再用 B 液(硝酸银 1 g + A 液 500 mL) 5 min(分),去离子水浸洗 1 min(分) 20 s(秒)后用 C 液(氢氧化钠 15 g + 甲醛 2.5 mL + 去离子水 497.5 mL),直到电泳谱带清晰为止。

2 结果与分析

2.1 RAPD 引物筛选和验证

通过对 100 个 Operon 随机引物的筛选,发现 OPR15 (5'-GGA CAA CGA G3) 是一个较好的引物,它能区分中甘 11 号及其两个亲本 01-88 (580bp) 和 02-12 (450bp);同时又能区分 8398 及其两个亲本 01-20 (560bp) 和 79-156 (450bp);并且它们均是强带。以单株样验证,OPR15 的确可作为中甘 11 号和 8398 品种纯度检验的 RAPD 标记(图 1)。

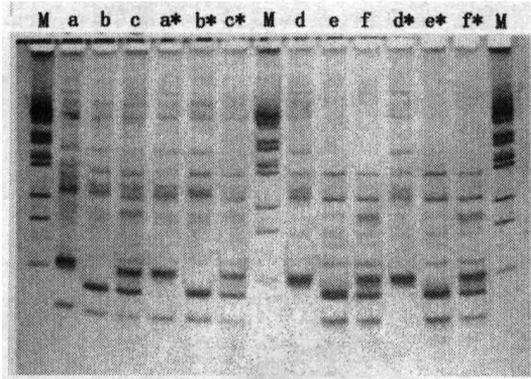


图 1 引物 OPR15 扩增中甘 11 号、8398 及其各自亲本和单株检验

M: 标样 a:01-88 b:02-12 c:中甘 11 号
d:01-20 e:79-156 f:8398
带 *号为各自的验证单株

2.2 中甘 11 号商品种子纯度检验

通过对一份河北产未经加工的商品种子中甘 11 号 83 株幼苗的检测,确定其中真杂种 66 株,纯度为 79.5%;余者亲本 01-88 有

12 株 (14.5%),亲本 02-12 为 5 株 (6.0%) (图 2)。此结果与田间鉴定结果 83.8% 很近似。

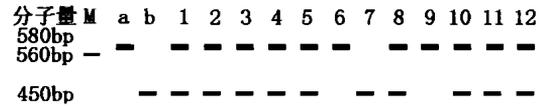


图 2 中甘 11 号商品种子纯度测定电泳结果示意图

M: 标样 a:01-88 b:02-12
1~12:中甘 11 号商品种子单株

3 讨论

蔬菜杂种优势的充分表现取决于种子的纯度,因此,一代杂种的纯度是种子质量最重要的因素。田间鉴定杂种的纯度时,需要植株长到一定大小,具备品种的典型性状后才能确定,这往往影响种子的及时销售和菜农的生产。利用 RAPD 方法,在引物筛选好的条件下,鉴定一份一代杂种种子纯度的成本不到 100 元,仅需 1 周左右的时间,这对于种子销售部门和广大菜农都是极其有利的。模板纯度和浓度是影响 RAPD 结果的重要因素,本试验筛选出的引物 OPR15 对模板 DNA 的纯度和浓度要求不严格,扩增特异谱带均是稳定表现的强带,对几份中甘 11 号和 8398 商品种子纯度检验的结果与田间鉴定很近似,这表明利用 RAPD 方法可在室内对甘蓝一代杂种进行快速、准确的纯度检验。

参考文献

- Haymes K.M. Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Mol. Biol. Rept.*, 1996, 14: 280 ~ 284
- 王晓武,方智远,孙培田,等. 一个与甘蓝显性雄性不育基因连锁的 RAPD 标记. *园艺学报*, 1998, 25 (2): 197 ~ 198

Purity Test of Two Spring Cabbage F_1 Varieties by RAPD Zhuang Mu, Wang Xiaowu, Ynag Limei, et al. (Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract Primer OPR15 which can distinguish F_1 hybrids of Zhonggan No. 11 and 8398, and their parents was screened from 100 random primers by RAPD method. Its ability to test F_1 variety purity was proved by single plant test. The results indicated that RAPD analysis could be a rapid and reliable method to test the purity of spring cabbage Zhonggan No. 11 and 8398.

Key words Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), RAPD, Variety purity