园 艺 学 报 2005, 32 (2): 321～323
Acta Horticulturae Sinica

茄子抗青枯病基因的 RAPD 标记研究

朱华武[1] 姚元干[2] 刘志敏[1] 杨建国[2] 陈惠明[2] 邹学校[2]
([1] 湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; [2] 湖南省蔬菜研究所, 长沙 410125)

摘 要: 为探明茄子抗青枯病的遗传机制, 以高感青枯病品种北京六叶茄 064, 高抗青枯病半栽培种马来西亚 S3及其 F_2 代为材料, 用 RAPD技术对供试材料的抗青枯病基因进行了研究。结果表明: 通过 300个随机引物的 PCR扩增分析, 发现 15.6%的引物在双亲间表现出多态性, 找到了一个与茄子抗青枯病亲本 S3中的抗病基因紧密连锁的分子标记 $S264_{780}$ (该引物的碱基序列为 CAGAGCGGA), 该标记与 S3的抗病基因的交换值为 4.32%, 遗传距离为 4.33 cM。

关键词: 茄子; 抗青枯病基因; 分子标记
中图分类号: S 641.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-353X (2005) 02-0321-03

Studies on RAPD Marker of Bacterial Wilt Resistance Gene in Eggplant (*Solanum melongena*)

Zhu Huawu[1], Yao Yuangan[2], Liu Zhimin[1], Yang Jianguo[2], Chen Huiming[2], and Zou Xuexiao[2]
([1] College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; [2] Hunan Vegetable Research Institute, Changsha 410125, China)

Abstract: To probe into the genetic resistant law to bacterial wilt (BW) in eggplant, the genetic studies to BW of 064 (Beijing six-leaf eggplant), S3 (highly resistant half-cultivated species of Malasia) and 064 × S3 F_2 populations is carried out on RAPD marker. 300 decamer primers with arbitrary sequences are chosen for polymerase chain reaction amplication. It is found that the polymorphism between the parents could be detected by 15.6% of the primer; one RAPD marker $S264_{780}$ (the sequence of the primer: CAGAAGCGGA) tightly links to the resistance gene of S3 with the overcross value of 4.32% and genetic distance of 4.33 cM.

Key words: *Solanum melongena*; Bacterial wilt resistance gene; RAPD

1 目的、材料与方法

近年来, 人们对茄科蔬菜抗青枯病遗传机制研究报道颇多。本研究在采用温室苗期人工接种鉴定方法对茄子材料进行抗性鉴定和抗性遗传分析[1]的基础上, 应用 RAPD技术对马来西亚茄子半栽培种 S3的抗青枯病基因进行了分子标记。

用抗病亲本马来西亚半栽培种 S3、感病亲本北京六叶茄 064及其杂交获得的 F_2 代单株 (139株) 为材料, 待茄苗长到 5～6片叶时各取 1～2片叶提取 DNA; 将经温室人工接种鉴定后的 F_2 代茄苗[1]分成抗病组和感病组, 分别随机选取 10株的叶片 DNA等量混合构建抗病池和感病池; 同时提取亲本 DNA, 与抗病池和感病池共同进行 RAPD分析。寡聚核苷酸引物、Taq酶、dNTP、Mg^{2+}以及各种规格的离心管购自上海 Sangon生物工程有限公司和北京鼎国生物工程有限公司。

茄子总 DNA提取采用 CTAB-酚-氯仿-异戊醇法, 参照 Murry等[2]的方法, 略作修改。PCR扩增程序为: 94℃预变性 4 min, 然后 92℃变性 45 s, 36℃退火 30 s, 72℃延伸 75 s, 38个循环, 最后 72℃延伸 5 min。每一反应总体积为 25 μL, 由 10 ×buffer 2.5 μL, Taq酶 (2 U/μL) 0.5 μL, dNTP

收稿日期: 2004-05-20; **修回日期**: 2004-10-10
基金项目: 国家 '863' 资助项目 (2002AA244021)
本研究得到湖南省蔬菜工程与技术重点实验实资助, 特此致谢。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（10 μmol/L） 0.625 μL，引物 1 μL，模板 DNA （20 ng/μL） 2 μL，Mg^{2+} （25 μmol/L） 2.5 μL，灭菌去离子水 16.175 μL组成。片段长度根据核酸分子量标准 D015-2进行估计。

共选用 Sangon公司 300个 10 bp寡聚核苷酸引物，首先用亲本作模板，筛选出在亲本中表现出相同或相似多态性的引物，然后用这些引物对感病亲本、感病池、抗病亲本和抗病池进行进一步扩增，从中筛选出在四者之间表现出相同或相似多态性的引物，重复 3次，初步确证连锁关系，最后将扩增模板扩大到整个 F_2 代群体，确证连锁关系。

2 结果分析与讨论

2.1 扩增多态性引物筛选和 RAPD标记分析

用随机选取的 300个 10 bp随机引物，对抗病亲本 S3、感病亲本 064及其 F_2 代抗、感植株构建的抗病池、感病池以及 F_2 代 139株单株进行 PCR扩增。结果表明，15.6%的引物 （40个）在双亲间表现出多态性。在抗病池和感病池之间表现出多态性的引物有 3个，其中引物 S264经 3次重复扩增，在双亲、抗病池和感病池间表现出稳定的、一致的差异。引物 S264共扩增出 5条主要带，长度在 0.55～1.5 kb之间，但仅 1条扩增带表现出多态性，其长度约为 0.78 kb，因此暂定名为 $S264_{780}$。在抗病亲本 S3和 F_2 代抗病池中均能扩增出 $S264_{780}$，而感病亲本北京六叶茄和 F_2 代感病池均缺失这条带。结果见图 1，在泳道中，介于核酸分子量标准 D015-2的 700 bp和 800 bp之间的带即为特异带 $S264_{780}$。

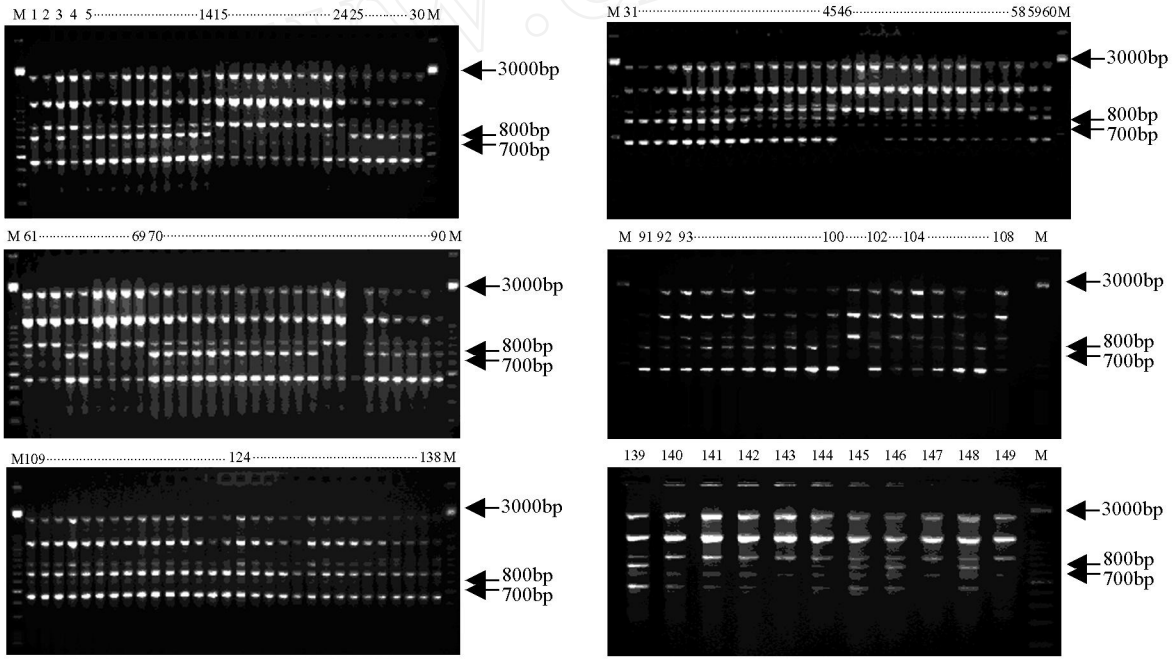

图 1 引物 S264的 RAPD扩增图谱

M: 分子量标记 D015-2; 1: 抗病亲本 （PR）; 2: 感病亲本 （PS）; 3: 抗病池; 4: 感病池; 5～14: 组成抗病池的抗病单株; 15～24: 组成感病池的感病单株; 25～45: 抗病株; 46～58: 感病单株; 59, 60: 抗病单株; 61～69: 感病单株; 70～90, 91 (同 84): 抗病单株; 92: 抗病亲本 （PR）; 101, 103: 感病单株; 93～100, 102, 104～139: 抗病单株; 140～143: 感病单株; 144, 145: 抗病单株; 146: 抗病池; 147: 感病池; 148: 抗病亲本; 149: 感病亲本。

Fig. 1 DNA amplification of F_2 induced by primer S264 in RAPD analysis

M: 100 bp DNA ladder D015-2, 1: PR; 2: PS; 3: R-pool; 4: S-pool; 5 - 14: R-plants of R-pool; 15 - 24: S-plants of S-pool; 25 - 45: R-plants; 46 - 58: S-plants; 59, 60: R-plants; 61 - 69: S-plants; 70 - 90, 91 (Same as 84): R-plants; 92: PR; 101, 103: S-plants; 93 - 100, 102, 104 - 139: R-plants; 140 - 143: S-plants: 144, 145: R-plants; 146: R-pool; 147: S-pool;. 148: PR; 149: PS

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 茄子抗青枯病基因与 RAPD标记的连锁分析

为了确定特异片段与抗病基因之间的遗传距离，用引物 S264对 F_2 代分离群体随机选取的 139个单株的 DNA进行扩增，以此来分析 $S264_{780}$的分布。结果发现：101株有特异带，38株无特异带；有6株个体发生了重组，其中 3株感病植株（61、64、65号）有特异带，另 3株抗病植株（82、83、84号）无特异带，重组型个体占总个体的比例即重组率为 4.32%，经 X^2 测验表明该 RAPD标记符合孟德尔分离比例。将 F_2 代植株抗青枯病鉴定结果和 RAPD标记结果编码后，用 Mapmaker 3.0程序计算交换值和遗传距离。结果表明：RAPD标记 $S264_{780}$带与 S3抗病亲本抗病基因间的交换值为 4.32%，遗传距离为 4.33 cM。

2.3 有待深入研究的问题

茄子的抗病基因主要存在于野生种或半野生种中，可通过双氧末端终止法对本研究所获得的特异片断进行序列测定，然后将该标记转化成 SCAR标记等，以寻找 S3抗病基因两侧的紧密连锁标记，也可利用该分子标记筛选茄子栽培种或半栽培种中含有抗病基因的品种，同时可用一系列高抗青枯病的茄子品种检验 $S264_{780}$的存在是否具有普遍性。另外，Tsukasa Nunome等[3]构建了茄子果实形状与颜色分子标记图谱，共包含了 88个 RAPD标记和 93个 AFLP标记。可将该标记（$S264_{780}$）定位到前人绘制的茄子的遗传连锁群上。

参考文献：

1 朱华武，姚元干，刘志敏，杨建国，陈惠明. 茄子抗青枯病遗传规律研究. 湖南农业大学学报（自然科学版），2004，30（3）：288～289

Zhu H W，Yao Y G，Liu Z M，Yang J G，Chen H M. On resistance to bacterial wilt in eggplant（*Solanum melongena*）. Journal of Hunan Agricultural University（Natural Sciences），2004，30（3）：288～289（in Chinese）

2 Murry M G，Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research，1980，8（19）：4321～4325

3 Tsukasa N，Keizo I，Tatemi Y，Masashi H. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant（*Solanum melongena* L.）based on RAPD and AFLP markers. Breeding Science，2001，（51）：19～26

欢迎购阅下列新书

1-67《RNA实验技术手册》75元
1-68《蛋白质化学与蛋白质组学》85元
1-69《蛋白质与蛋白质组学实验指南》(影印版）110元
1-70《蛋白质组学：理论与方法》53元
1-71《分子酶学工程导论》56元
1-72《分子生物学实验室工作汉英图解指南》53元
1-73《高级分子生物学要义》179元
1-74《高级植物分子生物学》85元
1-75《基础生物化学》144元
1-76《基因及其表达》(第二版）58元
1-77《进化生物技术-酶定向分子进化》45元
1-78《景观生态学原理及应用》53元
1-79《抗体技术实验指南》46元
1-80《耐盐植物研究》108元
1-81《染色体带：基因组的图型》32元
1-82《生物安全》68元
1-83《生物芯片分析》100元
1-84《生物信息学：方法与实践》47元
1-85《生物信息学中的计算机技术》(影印版）56元
1-86《实用生物化学与分子生物学词典》86元
1-87《数量遗传学》38元
1-88《统计遗传学》67元
1-89《探索基因组学、蛋白质组学和生物信息学》(附光盘）67元
1-90《现代细胞分子生物学技术》166元
1-91《现代英汉生物工程词典》75元
1-92《植物成分功能》111元
1-93《植物分子育种》69元
1-94《植物生物化学与分子生物学》(全彩色）289元
1-95《中国农作物及其野生近缘植物染色体图谱》203元
1-96《中国园林花卉植物染色体图谱》251元
1-97《种子生理研究》124元
1-98《种子植物系统学》111元
1-99《种子植物形态解剖学导论》(第二版）57元
1-100《转基因植物》78元
1-101《自由基生物学的理论与应用》124元
1-102《作物 DNA标记辅助育种》22元

以上价格已含邮资。购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12号《园艺学报》编辑部，邮编：100081。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net