

应用 RAPD 技术区别芒果抗炭疽病品种的研究*

张 欣

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 儋州 571737)

摘 要 应用 RAPD 技术在分子水平上对 10 个芒果品种的遗传变异程度研究分析结果表明,10 个芒果品种被聚为 3 个 RAPD 组,RAPD 组与品种对炭疽病的抗性有明显相关性。表明 RAPD 技术在筛选抗病品种时可作为辅助手段之一。

关键词 芒果 炭疽病 抗性 RAPD 技术

The utilization of RAPD technique for the differentiation of mango anthracnose resistance cultivars. ZHANG Xin(Institute of Environment and Plant Protection ,Chinese Academy of Tropical Agricultural Science ,Danzhou 571737 ,China), CJEA 2005 ,13(4) 20~21

Abstract The degree of genetic variation of 10 *Mangifera indica* cultivars was measured at the molecular level by random amplified polymorphic DNA(RAPD). The results show that 10 *Mangifera indica* cultivars are clustered into 3 RAPD groups which is markedly correlated with the resistance of mango to anthracnose revealing that the RAPD technique can be used as an aid in screening the disease resistance cultivars.

Key words *Mangifera indica* ,Anthracnose ,Resistance ,RAPD technique

(Received July 1 ,2004 ;revised Aug. 19 ,2004)

芒果炭疽病(*Colletotrichum gloeosporioides*)为严重的真菌病害,目前主要用化学方法防治,但成本高、效益低且污染果实和环境,而采用抗病品种防治该病可有效解决上述问题。目前对抗炭疽病芒果品种的筛选主要有大田筛选法、室内筛选法和综合筛选法,但这些方法费时费力^[1]。近年已探索出一些高效简便、快速的生物技术方法进行抗病品种筛选,如同工酶电泳酶活性方法、用近等基因系法和分离群体分组分析法获得抗病基因连锁的 RAPD 标记等,此外 RAPD 技术能区别不同品种(系)及其耐盐性和抗虫性等^[2-4]。应用分子生物学技术对芒果种质多样性的研究已见诸报道^[5,6,8,9],而利用 RAPD 技术区别芒果抗炭疽病品种的研究尚少见报道。本研究应用 RAPD 技术区别 10 个芒果品种对炭疽病的抗性,为筛选芒果抗病品种提供辅助手段。

1 试验材料与方法

试验在海南省儋州市华南热带农业大学园艺学院教学基地采集 10 个芒果品种嫩叶,其编号、名称及抗病性 1 为“海顿”,中抗;2 为“枋红”,中抗;3 为“陵水大芒”,中抗;4 为“马切苏”,中抗;5 为“粤西一号”,中感;6 为“吕宋”,中感;7 为“秋芒”,中感;8 为“黄玉”,高感;9 为“小青皮”,高感;10 为“泰国生食芒”,高感。

按 CTAB 法提取基因组 DNA^[7],采用分光光度法检测 DNA 浓度。RAPD 反应体系总体积为 25 μ L,其中美国 Operon 公司生产 8 μ mol/L 引物 2 μ L,10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L,25mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L,广州华美公司产 5U/ μ L Taq 酶 0.4 μ L,上海 Sangon 公司产 2.5mmol/L dNTPs 2 μ L,10ng/ μ L DNA 2 μ L,水 13.6 μ L。PCR 反应循环条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 4min;94 $^{\circ}$ C 变性 1min,35 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,38 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。采用 Tgradient PCR 仪进行扩增。PCR 产物在 15g/kg 琼脂糖凝胶中电泳,Marker 为 GeneRuler 100bp DNA,采用 UVI 凝胶成像系统记录电泳结果。电泳图谱中各条谱带(DNA 片段)均为 1 个分子标记,代表 1 个引物结合位点,根据各位点有无谱带进行统计,有带记为 1,无带记为 0,以此为依据计算品种间相似系数,其公式为:

$$S_D = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} \quad (1)$$

式中, S_D 为相似系数, n_{xy} 为 2 品种间分子量相同的扩增 DNA 片段总数, n_x 、 n_y 分别为品种 x 和品种 y 的扩

* 中央级科研院所科技基础性工作专项资金项目资助

增 DNA 片段总数。利用 UPGMA 软件进行聚类分析 ,并构建系统树状图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

选用 Operon 公司生产的 E、F、P 3 组计 60 个随机引物 ,对供试品种的基因组 DNA 进行扩增 ,根据扩增结果筛选出 OPE-02、OPE-04、OPE-10、OPF-08、OPF-16、OPP-06、OPP-14 和 OPP-20 8 个扩增清楚的随机引物 ,各引物扩增出不同的 DNA 带谱。用 8 个随机引物对 10 个芒果品种进行 RAPD 扩增(见图 1),共扩增出 76 条 DNA 带 ,分子量大小为 0.2~2kb ,其中多态带 50 条 ,条带多态率为 65.8% ,表明 10 个芒果品种间具有丰富的遗传多样性 ,有利于应用 RAPD 技术分析研究其遗传分化。

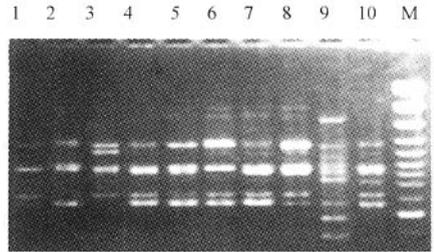


图 1 引物 OPF-08 的 RAPD 图谱

Fig.1 RAPD pattern with primer OPF-08

2.2 芒果品种对炭疽病的抗性与其 RAPD 组间相关性

由图 2 可知 ,以相似系数 0.72 划分 ,10 个芒果品种聚类为 MI1、MI2 和 MI3 3 个 RAPD 组 ,其中 MI1 组包含 1、2、3、4 号芒果品种 ,MI2 组包含 5、6、7 号芒果品种 ,MI3 组包含 8、9、10 号芒果品种。将供试芒果品种 3 个抗病等级与其 RAPD 聚类组作对照分析 ,RAPD 聚类组与抗病等级间有极明显相关性 ,如中抗 1、2、3、4 号芒果品种在 RAPD MI 1 组 ,中感 5、6、7 号芒果品种在 RAPD MI 2 组 ,高感 8、9、10 号芒果品种在 RAPD MI 3 组。

3 小结

采用 RAPD 技术可区别芒果品种对炭疽病的抗病程度 ,筛选抗病品种时可将已知与未知抗病程度的芒果品种一起进行 RAPD 分析 ,根据聚类分析结果判断未知品种抗病程度 ,该技术在筛选抗病品种时可作为辅助手段之一。

参 考 文 献

- 肖倩蕊,李绍鹏.芒果炭疽病抗病品种筛选研究.热带作物学报,1998,19(2):43~48
- 谭晓风,胡芳名,张党权等.香蕉主要栽培品种的 RAPD 分析.园艺学报,2000,29(1):69~71
- 海林,翁跃进.小麦耐盐种质遗传多样性的 RAPD 分析.西北植物学报,2000,20(6):942~948
- 耿川东,龚蓁蓁,黄骏麒等.用 RAPD 鉴定棉花品种间差异.江苏农业学报,1995,11(4):21~24
- 徐碧玉,金志强,彭世清等.海南主栽芒果品种基因组 DNA 的 RAPD 分析.热带作物学报,1998,19(3):33~37
- 房经贵,乔玉山,章镇.AFLP 在芒果品种鉴定中的应用.广西植物,2001,21(3):281~283
- 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 R.E.等.精编分子生物学实验指南.北京:科学出版社,1998.37~38
- Degani C, Ruth E. L. Enzyme polymorphism in mango. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1990, 115(5):844~847
- Adato A, Sharon D, Lari U. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analyses of mango (*Mangifera indica* L.) genotypes. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1995, 120(2):259~264

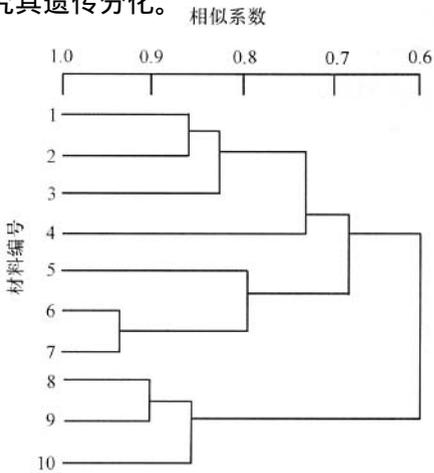


图 2 10 个芒果品种聚类图

Fig.2 Cluster analysis of the ten *Mangifera indica* cultivars