

江苏省首届青年学术年会

论文集

(农科分册)

JIANGSU

1992

江苏省首届青年学术年会执行委员会编

中国科学技术出版社

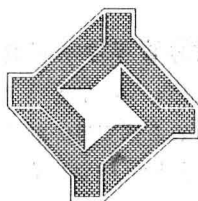
江苏省首届青年学术年会

论文集

(农科分册)

江苏省首届青年学术年会

执行委员会编



JIANGSU
1992

中国科学技术出版社

内 容 提 要

本书主要反映了近年来江苏省农、林、牧、渔等领域青年科技工作者的研究成果。主要内容包括有关农业与人口、资源、环境问题研究；农业综合及宏观问题研究；农业基础理论及高技术、新技术农业应用问题研究；农业生产技术，以及农业生产与农业科技其他问题研究等。该书对于农、林、牧、渔等科研单位、大专院校、管理部门的科技工作者有重要参考价值。

(京)新登字 175 号

江苏省首届青年学术年会论文集

(农 科 分 册)

江苏省首届青年学术年会

执行委员会 编

*

中国科学技术出版社出版发行 (北京海淀区白石桥路 32 号)

江苏省新华印刷厂印刷

*

开本：787×1092 毫米 1/16 印张：119 字数：2800 千字

1992 年 12 月第一版 1992 年 12 月第一次印刷

印数：1—1000 册 全套定价：134.00 元

ISBN 7-5046-0932-3/Z·88

江苏省首届青年学术年会 执行委员会名单

主 席：尤肖虎

副 主 席：张 荣

秘 书 长：张铁恒

副秘书长：王安宁

委 员：	王兆球	王建国	沈其荣	王心如	李剑波
	梁德旺	毛罕平	姚 远	刘 平	钱海鑫
	顾晓松	郭 荣	葛世荣	裘 伟	王明秋
	杨善德	朱永官			

江苏省首届青年学术年会 指导委员会名单

主 席：吴锡军
副 主 席：孙钟秀 潘 恕
秘 书 长：王世璜
副 秘 书 长：李茂典
委 员：李庆逵 严 恺 钱钟韩 冯 端 窦国仁
 童 傅 韦 钰 高亮之 余之祥 陈家伟
 郭克礼 葛锁网 王永顺 潘宗白 陈 懿
 何立权 王臻中 叶钟音 陈荣华

前 言

当今时代，科学技术已成为决定生产力的首要因素，社会经济的发展更多地依赖于科学技术的进步，依赖于掌握先进科学技术的人。青年科技工作者作为跨世纪的科技生力军，必将并且正在成为我国科技队伍的骨干力量。有计划地培养和造就一支强大的、高水平的青年科技中坚力量，是一项重要的战略任务。江苏省科学技术协会主办的江苏省首届青年学术年会，旨在检阅江苏省青年科技工作者的科技成果，发现和培养优秀青年科技人才，推动全社会进一步形成关心、重视青年科技人才成长的良好环境，激励广大青年科技工作者奋发图强、建功立业。

本届年会的征文工作得到全省青年科技工作者以及海外留学生的大力支持，共收到应征论文 2000 余篇，其中来自美国、日本、英国、法国、加拿大、德国、菲律宾等国家的论文 20 余篇，内容涉及了理、工、农、医、交叉等学科领域，作者大部分为具有高、中级职称或博士、硕士学位的青年科技工作者，反映了江苏省乃至全国青年科技工作者的科技水平。应征论文经年会所聘请的专家委员会反复筛选，从中精选出 320 余篇，分理、工、农、医、交叉学科五部分汇编成论文集出版发行。由于论文集篇幅所限，许多优秀论文只好割爱。

本届年会得到了中共江苏省委、江苏省人民政府及有关部门的高度重视，得到了江苏省省级学会、各市人民政府、各市科学技术协会及所属学会、各高等院校、研究院所及有关单位的大力支持，特别是得益于南京大学、东南大学、南京农业大学、南京医学院、南京师范大学的积极协助和具体承办。论文集出版过程中承蒙中国科学技术出版社、江苏省新华印刷厂全力支持，并且有一大批热心的同志付出了辛勤劳动，籍此机会一并表示诚挚的谢意。

本书为江苏省首届青年学术年会论文集的农科分册，主要内容包括与人口、资源、环境有关的农业问题研究；农业综合及宏观问题研究；农业基础理论及高技术、新技术农业应用问题研究；农业生产技

术以及农业生产与农业科技其他问题研究等。青年学术年会执行委员会农科分部组织有关专家从各农业高等院校、研究院所、有关省级学会、地方科协推荐的 220 余篇论文中,评审筛选出 60 篇论文汇编成册。这些论文反映了近年来江苏省农、林、牧、渔等领域青年科技工作者的最新研究成果,对有关领域的科技工作者有重要参考价值。参加农科专家评审委员会的成员有叶钟音、刘大钧、黄丕生、张荣铨、王璐、王金生、张佳宝、郭绍铮、徐少甫、顾焕章等先生,我们在此表示衷心感谢。

本分册的编辑工作由青年学术年会执行委员会农科分部的沈其荣、翁益群、徐锡忠、何晨阳、韩锋、朱永官、朱洪生、张文卉等同志集体完成。出版印刷工作得到胡晓河、刘福在、禹正瑜等同志协助。由于时间仓促及编辑水平有限,难免出现错误,希望读者予以谅解。

江苏省首届青年学术年会执行委员会农科分部

1992 年 10 月 20 日

目 录

绞股蓝悬浮细胞的原生质体再生植株	张航宁等(1)
小麦抗白粉病近等基因系的 RAPD 分析	钟少斌等(5)
APPCR 测定白菜基因组 DNA 的遗传多态性	曹家树等(9)
大豆球蛋白 A _{1b} B ₂ 基因表达分子基础的探讨	张德玉(15)
普通小麦与鹅观草正反交属间杂种及 回交后代的细胞遗传学与赤霉病抗性研究	翁益群等(19)
黑麦草和苇状羊茅 (4x) 属间杂种体 细胞无性系的形态细胞学及同工酶分析	曹明树等(25)
南方大豆种质资源脂肪含量的遗传变异与选择响应	宋启建等(30)
小麦抗赤霉病性表型轮回选择效应研究	蒋国梁等(35)
小麦矮秆基因 Rht ₃ 对光合特性及生物量的影响	马国英等(40)
木素酸钠对湿地松幼苗抗逆性的影响	王永银(46)
琼脂浓度对水稻愈伤组织植株再生率和内源激素含量的影响	梅传生(49)
无 CO ₂ 空气、强光处理对大豆叶片 β -淀粉酶活性影响及其作用机理	熊福生(53)
ABA 结合蛋白及其免疫探针的研究	张能刚等(57)
不同夜间温度对小麦旗叶光合作用和单株产量的影响	方志伟(61)
紫外光 B 对作物影响的研究现状	戴秋杰(65)
IAA、GAs 受体对水稻矮生性的调控	吴永宏等(70)
Molecular basis of the germination / dormancy breaking of <i>Echinochloa oryzicola</i> seeds	施卫明等(75)
小麦强源扩库高产栽培途径的研究	严六零(81)
水稻间歇灌溉水分胁迫指数研究	王绍华(86)
棉田开发增效的途径浅析	纪从亮(90)
改变源库关系对小麦籽粒灌浆动态的影响	赵新华(96)
水稻白叶枯病菌诱导非寄主植物烟草过敏性反应及其信号物质	何晨阳等(99)
低温辐射诱导共聚合亲水性载体固定化酒精酵母细胞	李正魁(105)
大蒜花叶病毒外壳蛋白和核酸的性状及 外壳蛋白 cDNA 合成和克隆	陆振晓(109)
重组杆状病毒在棉铃虫体内表达马立克氏病毒 pp38 基因产物	秦爱建等(114)
耗散结构理论与农田杂草防除新策略	王 健(117)
运用微机进行小蠹科昆虫分类鉴别的研究	于复坤(121)
用单克隆抗体结合生物素一亲和素酶联免疫 吸附试验检测水稻白叶枯病菌	胡广淦等(125)
我国主要水稻螟虫飞翔能力的研究	孙建中等(129)

二化螟三龄幼虫抗药性监测方法研究	谭建国等(135)
植株茎部施药方法及机具的研究	吴春笃等(139)
异质不结球白菜雄性不育新材料选育及应用潜力研究	任成伟等(144)
不结球白菜核型不育 (CMS) 无性系的建立和繁殖	侯喜林等(150)
草莓植株适宜冷藏时间的研究	潘耀平等(154)
梨树应用石硫合剂疏花技术研究	谭国华等(158)
不同农业利用方式及改良措施对滨海盐土性状变迁的影响	邓力群等(162)
茶树与土壤酸化	刘友兆等(168)
高潜水位塌陷地泥浆泵造地复田技术模式的研究	胡振琪(173)
用卫星遥感研究江苏海涂土壤资源动态	宗良纲等(179)
植物营养与农产品品质及其经济学意义	朱永官(184)
持续农业中土壤肥力问题	赵红挺(189)
Effect of abscisic-acid analogs in control of barley germination during malting	尹象胜等(193)
淹水对石灰性土壤磷素形态转化影响的研究	尹金来等(194)
Tonic species and balances in soybean influenced by chloride accumulation	杨 嘉(198)
Antibiotic-producing organisms as co-inoculum to stimulate rhizobial colonization and nodulation in the rhizosphere	李德明(206)
从土地承载力看农业持续发展战略	陈 艳等(209)
硬草生态学特性及防除途径的研究	王兆龙等(215)
海水养殖供排水系统的优化设计	吴玉柏等(220)
促进动物生长的新型基因工程疫苗	徐文忠等(228)
兔核移植胚胎的融合、激活及发育研究	王 斌等(233)
进口粮船中害虫分布趋势及其扦样技术的研究	魏厚德等(238)
单克隆抗体在沙门氏菌血清学鉴定中的应用研究	焦新安等(244)
肉鸡血液同功酶型与脂肪性状的关系	顾志良等(248)
间接 ELISA 检测鸡多杀性巴氏杆菌抗体的研究	丁 铲等(251)
高产池塘生态效益的分析研究	唐 宏(254)
棉籽饼常规饲喂对水牛犊毒性的研究	黄克和等(259)
实现农业高产优质高效的必由之路——农业综合开发与资源合理利用	安晓宁(263)
江苏省农业资源开发中的肥料投入问题研究	陈东平等(267)
论江苏林业的现状问题与对策	许文力(274)
试论连云港市创汇农业的发展方向及途径	刘炳慧(279)
摘要部分	
春油菜华盖式结角层模式栽培原理与技术研究	冷锁虎(284)
农产品的成熟度及内部品质判定——南瓜和萝卜的硬度测定	陈介余(284)
棉花优化配方施肥技术研究	曹凤进等(285)

江苏省发展高纤维品质棉花存在问题及其对策探讨	周宝良等(285)
水稻×玉米属间杂种 F_1 的植株再生及形态变异	王月芳等(286)
抗丁草胺水稻变异体筛选	蒋 宁等(286)
丘陵地区小麦高产的障碍因子与技术对策	祁胜媚(287)
现代月季试管苗无土栽培研究	王国良(287)
沿海气候条件对啤酒大麦生产的影响分析及其对策	杨 力(288)
利用原生质体技术构建双孢蘑菇杂交系统	金建康等(288)
塑料遮阳网保温性能的研究及其在冬季蔬菜生产上的运用	徐乐进等(289)
冶炼厂区镉污染土壤中镉的形成分配及其影响因素	郑绍建等(289)
硅素养分对水稻生长及其吸收	
N、P、K、Ca、Mg、Mn、Si等元素的影响	张永春等(290)
不同养殖类型池塘浮游生物种群结构的初步分析	谷孝鸿(290)
感染小斑病的玉米植株中过氧化物酶活性及同工酶的变化	陈建国(291)
小麦穗期病虫害优化管理模型研究	梁振中(291)
如东农业如何走向大市场——对调整农业内部结构的调查与思考	黄松飞(292)
我国农业科技推广不力的原因及对策——兼谈农业科技推广体制的改革	周曙东(292)
对我省茧丝质量现状的分析与思考	祁力言(293)
肉鸡机械化饲养发展方向的探讨	宋卫东等(293)
室内繁殖二化螟绒茧蜂的研究	杭三保等(294)

绞股蓝悬浮细胞的原生质体再生植株

张航宁 吴琴生 刘大钧

(南京农业大学农学系)

摘要 绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum* (Thumb) Mak) 幼茎切段在含 1mg/l 2, 4-D+ 0.2mg/l KT 的 MS 固体培养基上诱导形成胚性愈伤组织, 经液体振荡培养, 形成胚性悬浮细胞系。胚性细胞团经含有 Cellulase RS2%, Pectolyase Y-230.1%, 0.55M 甘露醇和 CPW 盐的酶液酶解, 游离出大量原生质体。原生质体培养 4 天后出现第一次分裂, 4 周后形成肉眼可见的小细胞团, 经增殖后在含有 1mg/l KT+ 0.5mg/l IAA 的 MS 固体培养基上分化出胚状体, 转到含 1mg/l 6-BA+ 0.5mg/l IAA 的 MS 固体培养基上分化出茎叶, 再在不含任何生长调节剂的 MS 固体培养基上发育成完整植株。

绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum* (Thumb) Mak) 属葫芦科, 含有 52 种与人参皂甙有类似结构的达烷型绞股蓝皂甙 (gypenosides) 及四种人参皂甙^[1], 临床用于治疗 20 多种癌症, 并有明显的镇静、催眠、降血脂和治疗偏头痛等作用^[2, 3]。现已得到广泛的开发利用^[1]。药用植物原生质培养近年来开始受到人们的重视^[4], 利用原生质体培养可以筛选高药物含量的细胞系^[5], 或是通过细胞融合, 基因导入等遗传操作手段进行品种改良^[6]。本文首次报道了绞股蓝悬浮细胞的原生质体再生植株。

1 材料和方法

1.1 绞股蓝悬浮培养系统的建立

取绞股蓝盆钵扦插苗幼茎, 20% 次氯酸钠溶液消毒 10 分钟, 无菌水洗 3 次, 切成 2mm 小段, 放在含 1mg/l 2, 4-D, 0.2mg/l KT 的 MS 固体培养基上诱导培养。1 个月后, 将形成的愈伤组织转移到含 0.5mg/l 2, 4-D, 1mg/l NAA, 0.1mg/l KT 的 MS 液体培养基中, 26°C 左右黑暗中振荡培养, 每 3 天更换一次培养基, 5 周后形成了增殖快速, 分散均匀, 含有大量胚性细胞团的悬浮细胞系, 此后每周继代一次。

1.2 原生质体的游离

将继代培养 4 天的绞股蓝悬浮细胞 2ml 放入含 20ml 酶液的 250ml 三角烧瓶中 (酶液组成: Cellulase RS2%, Pectolyase Y-23 0.1% , 0.55M 甘露醇+CPW 盐, $\text{pH}=5.8$), 27°C 下缓慢振荡 (30r/min) 5 小时后, 用 300 目尼龙网过滤, 滤液在 400r/min 钟下离心 5 分钟, 收集其中的原生质体, 用含 1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.55M 甘露醇的溶液洗两次, 再用原生质体培养基洗一次, 将原生质体密度调节至 10×10^4 个/ ml , 悬浮于原生质体培养基中。

1.3 绞股蓝原生质体培养

1.3.1 绞股蓝原生质体的浅层培养 将悬浮有绞股蓝原生质体的培养基 1ml 滴入直径 3cm 小培养皿中, 使原生质体在培养皿底部均匀地铺成一薄层, 27℃, 散射光下培养。

1.3.2 绞股蓝原生质体的看护培养 预先配制 MS+0.5mg/l₂, 4-D+0.1mg/lKT+8g/l 琼脂固体培养基, 高压灭菌后, 在琼脂将要凝固时, 按 1:20 的比例加入绞股蓝悬浮细胞, 倒入直径为 5cm 的培养皿中, 凝固后铺一层直径为 0.45μm 的硝酸纤维细菌滤膜, 再将悬浮有原生质体的培养基 0.5ml 滴在滤膜上, 作看护培养。

1.4 绞股蓝原生质体培养再生愈伤组织和植株分化 将绞股蓝原生质体培养 4 周后形成的肉眼可见的细胞团转到 MS+0.5mg/l₂, 4-D+0.1mg/lKT 的固体培养基上, 使其长大到 5mm 后, 转移到 MS+1mg/lKT+0.5mg/lIAA 的固体培养基上, 出现绿色胚状体后, 再转到 MS+1mg/l₆-BA+0.5mg/lIAA 培养基上分化出茎和叶, 最后在不含激素的 MS 固体培养基上发育成完整植株。

2 结 果

2.1 绞股蓝悬浮培养系统的建立

由绞股蓝幼茎诱导形成的淡黄色、颗粒状胚性愈伤组织很适于建立起悬浮培养系统, 镜检可以看到, 其细胞均呈球形, 内含物丰富, 细胞分裂旺盛, 因而也特别适于原生质体游离, 并获得较高的原生质体分裂频率和植株再生频率。

2.2 绞股蓝原生质体的游离和培养

每毫升绞股蓝悬浮细胞经酶解能得到 7.5×10^6 个原生质体。刚游离得到的原生质体呈球形, 大小基本一致, 细胞质浓厚, 内容物丰富, 在合适的培养基中, 第 2 天开始复壁, 第 4 天出现第一次分裂, 2 周后形成含几十个细胞的细胞团, 4 周后即能形成肉眼可见的小愈伤组织。

本研究试验了几种常用的培养基对绞股蓝原生质体培养的影响, 结果见表 1。IM 和 KM 培养基含有丰富的氨基酸、维生素等有机营养成分, 原生质体在其中的分裂频率和植板率都很高, MS 培养基也能使绞股蓝原生质体正常地持续分裂, 但频率要低于 IM 和 KM 培养基。在 NT 培养基中, 原生质体分裂频率和植板率均很低。采用琼脂平板加滤膜看护的培养方法能大大提高原生质体培养的植板率。在 NT 培养基上, 看护培养和浅层培养的植板率分别为 2.36 和 0.67; 在 MS 培养基上, 分别为 20.5 和 13.4。

表 1 不同培养基对原生质体培养的影响

培养基	NT ⁽⁷⁾	MS ⁽⁸⁾	IM ⁽⁹⁾	KM ⁽¹⁰⁾
分裂频率 (%)	2.20	15.2	32.5	47.3
植板率 (%)	0.75	8.30	26.5	25.2

*: 培养 10 天后的分裂频率。

2.3 绞股蓝原生质体再生愈伤组织和植株分化

绞股蓝原生质体形成的小愈伤团在 MS+0.5mg/l₂, 4-D+0.1mg/lKT 的培养在上增

殖到 5mm 左右, 转移到不同的分化培养基上, 3 周后即能分化出绿色胚状体, 再将胚状体继代接种到相同的分化培养基上, 3 周后发育形成带茎叶的绿色小植株, 不同激素配比对胚状体发生及绿苗再生频率的影响见表 2。

表 2 植物激素对胚状体发生及绿苗再生频率的影响

培养基代号	植物激素组合	胚状体发生频率 (%)	绿苗分化频率 (%)
D ₁	6-BA 1mg/l IAA 0.5mg/l	15.5	78.5
D ₂	KT 1mg/l IAA 0.5mg/l	32.0	46.4
D ₃	6-BA 0.5mg/l KT 1mg/l IAA 0.5mg/l	16.6	51.6
D ₄	6-BA 0.25mg/l KT 0.25mg/l Zcatin 0.1mg/l IAA 0.5mg/l	28.8	53.5

注: 基本培养基均为 MS。

从表 4 可以看出, D₁ 培养基上胚状体发生频率最低而绿苗分化率最高, D₂ 培养基上胚状体发生频率最高, 绿苗分化率却最低, 可见 KT 有利于胚状体的发生, 而 6-BA 有利于茎叶的形成。当幼苗长到 3cm 左右高时, 转移到不含任何激素的 MS 固体培养基上, 4 周后发育成完整的植株。

3 讨 论

胚性悬浮培养细胞系由于增殖快、分散性好非常适于原生质体的游离和培养, 同时也是植物细胞工业化大规模培养的优良细胞系筛选的基础材料。跟大多数植物一样, 绞股蓝细胞悬浮培养物经长期继代培养, 也会发生细胞胚性的下降甚至丧失, 细胞内含物减少, 并变成长弯形。我们在继代培养 10 个月, 分化能力降到 5% 左右时, 在培养基中添加 500mg/l 水解酪蛋白和 0.1mM 脯氨酸, 同时把 2,4-D 水平降至 0.1mg/l, 这样继代一月后, 悬浮细胞分化能力又恢复到 52%。

培养基组成对原生质体培养的影响也很大, KM、IM 培养基很适合绞股蓝原生质体, 特别是低密度下的原生质体培养。但由于这些培养成份复杂, 药品价格较贵, 配制困难, 实验重复性也较差。MS 是普遍采用的一种培养基, 结合看护培养的方法, 也能大大提高原生质体分裂频率和植板率。我们也曾试图用 MS 培养基中提高原生质体密度的方

法来提高分裂频率,但由于高密度下极易发生原生质体的粘集,反而使分裂频率降低,所以我们认为:MS培养基结合看护培养是绞股蓝原生质体培养的理想方法。

研究成功地建立并保持了绞股蓝胚性悬浮细胞系,并完成了原生质体培养及植株再生,从而为药用植物绞股蓝的工业化大规模培养及品种改良打下了基础。

参考文献

- 1 于占洋,杨辉. 绞股蓝研究近况. 药学通讯,1988,23(1):12-14.
- 2 陈珏. 植物学绞股蓝在日本的研究概况. 浙江药学,1986,3(4):23.
- 3 郭生桢. 绞股蓝研究进展. 中草药,1987,18(7):37.
- 4 刘四清,蔡起贵. 水飞蓟原生质体培养形成愈伤组织及组织培养再生植株. 植物学报,1990,32(1):19-25.
- 5 Fujita, Y. Takahashi and Y. Yamada. Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplasts culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells. Agric. Biol. Chem., 1985, 49:1755-1759.
- 6 盛世纪,陈惠民. 防风悬浮细胞的原生质体再生植株. 植物学报, 1990, 32(4):268-273.
- 7 Nagata, T. and Takebe I. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta, 1971, 99:12-20.
- 8 Marashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 1962, 15:473-477.
- 9 Hanc, B; Fleck, J.; Hanc, G. Colony formation from mesophyll protoplasts of a cereal Oat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989,86:6157-6160.
- 10 Kao, K, N. and Michayluk, M.R. Nutritional requirement for growth of *Vicia hajstana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta, 1975, 126:105-110.

作者简介 张航宁,男,1966年6月生。1988年毕业于南京大学生物系植物专业,1988~1990年于南京农业大学农学系攻读硕士学位,1990年至今于南京农业大学农学系攻读博士学位,研究生期间一直从事植物细胞遗传及细胞工程的研究工作。

小麦抗白粉病近等基因系的 RAPD 分析^①

钟少斌 张德玉 姚景侠

(江苏省农科院遗传生理所)

李松涛 张忠廷 王 斌

(中国科学院遗传所)

摘要 本研究以 10 个核苷酸长的 DNA 序列为引物, 通过 PCR 技术对一对小麦抗白粉病近等基因系 *Chancellor* 和 *Khapli* / 8 *Chancellor* 的基因组 DNA 进行了扩增, 旨在鉴定出与抗白粉病基因连锁的分子标记。我们随机选用的 100 个引物均可在这对近等基因系中获得特异的扩增产物。平均每个引物产生 4 条扩增片段, 大小在 0.3Kb 到 5.0Kb 之间, 大多数引物(95%)在 *Chancellor* 和 *Khapli* / 8* *Chancellor* 间扩增的产物相同, 但有 4 个引物在这对近等基因系间表现出扩增片段的多态性, 其中 2 个引物的扩增产物 OPV03-1950 和 OPV03-1150 只出现在抗病的近等基因系 *Khapli* / 8* *Chancellor* 中, 表明它们来自供体亲本 *Khapli* 的 DNA, 很可能与抗性基因连锁; 而另外 2 个引物扩增的多态产物 OPW15-1600 和 OPX05-2700 则仅出现于 *Chancellor* 中, 表明它们来自被供体 DNA 所置换的一段序列。引物 OPV17 扩增的 0.8Kb 片段在这对近等基因系间表现扩增片段数量的差异性, 这也可能是近等基因系间 DNA 差异的结果。

在植物的遗传研究和育种实践中, 鉴定出与重要性状紧密连锁的分子标记具有非常重要的意义。一方面通过对分子标记的间接选择可以迅速转移和组合目的基因, 从而能更有效的培育出优良品种; 另一方面, 利用与靶基因连锁的分子标记为起点, 为染色体步查 (Chromosome walking) 和跳查 (Chromosome jumping) 进行基因分离打下基础。在过去十年间, 大多数的研究主要集中于用 RFLP 进行遗传图谱的构建, 目前已在玉米、水稻、大豆、蕃茄、莴苣及马铃薯等作物建立了具有一定密度的 RFLP 图谱^[8, 10, 14]。并借助 RFLP 图筛选出了与性状连锁的分子标记^[13]。然而, 在小麦上, 由于含有三个部分同源的染色体组, 且品种间的遗传差异较小, 使其 RFLP 图谱的构建远远落后于其它作物。目前, 除了几条染色体具有较多标记外, 其它染色体上的分子标记很稀少^[2], 因此很难借助 RFLP 进行重要性状的遗传分析。最近, 由 Williams 等发展的 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 技术为真核生物的遗传作图和重要性状的分子标记

^①本研究在中国科学院遗传所完成

提供了另一快速简便的方法。它利用随机引物和 PCR 扩增基因组 DNA 片段, 然后经过电泳分离和溴化乙锭染色, 在紫外灯下直接检测出扩增 DNA 片段的多态性。由于它省去了 RFLP 分析中许多繁琐的步骤 (如同位素标记, Southern 转移和分子杂交等), 且多态性检测效率高, 因而很快得到广泛应用^[3, 4, 6, 7, 11, 15]。

大量近等基因系的建立, 为目标基因的分子标记奠定了基础^[12], Martin 等^[11]利用 144 个引物对一对蕃茄近等基因系进行筛选, 找到 3 个 RAPD 标记与基因连锁。其他研究人员用同样的方法分别对水稻、莴苣、蚕豆及蕃茄的抗性近等基因系进行 RAPD 分析, 均检测出与抗病基因连锁的 RAPD 标记^[5, 9, 15]。本研究以一对小麦抗白粉病近等基因系为材料进行 RAPD 分析, 旨在获得与抗白粉病基因连锁的分子标记。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所使用的材料为一对小麦抗白粉病的近等基因系: Chancellor 和 Khapli / 8 * Chancellor (含抗白粉病基因 Pm4a)。Khapli / 8 * Chancellor 是 Briggles^[1]利用抗白粉病的四倍体小麦 Khapli 与感病的普通小麦品种杂交, 再经七代回交和最后一代自交培育而成的, 其 Pm4a 基因已被定位于 2A 染色体的长臂上^[1]。

1.2 DNA 的提取

采用 Sharp 等的方法从 Chancellor 和 Khapli / 8 * Chancellor 的黄花苗中提取基因组 DNA。

1.3 引物

本试验所用引物由美国 Operon 公司出品, 该公司现已出品 25 个随机引物试剂盒, 标号为 A 至 Y, 每个试剂盒含 20 个引物, 长度均为 10 个核苷酸。我们从 A、B、V、W、X 和 Y 试剂盒中随机选择了 100 个引物进行扩增。

1.4 PCR 反应条件

扩增反应的总体积为 50 μ l, 其中含 10mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 45ng 引物, 50-100ng 基因组 DNA, 2 单位 Tag 多聚酶。反应对复盖一层石蜡油。反应在 PCR 仪 (Perkin-Elmer / Cetus DNA Thermal Cycler) 上进行, 共 40 个循环, 前 3 个循环 97 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 35 $^{\circ}$ C 复性 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟, 后 37 个循环变为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 36 $^{\circ}$ C 复性 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟, 最后在 72 $^{\circ}$ C 下保温 5 分钟, 扩增产物在 1.4% 琼脂凝胶中电泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果并照相。

2 结果

本研究随机选用的 100 个引物均可在近等基因系中扩增出特异的 DNA 片段。每个引物扩增的片段数目不尽相同, 少的只有 1 条, 多的达 9 条, 平均每个引物产生 4 条扩增片段, 大小在 0.3Kb 到 5.0Kb 之间。大多数引物 (95%) 在 Chancellor 和 Khapli / 8 * Chancellor 这对近等基因系扩增的产物相同。但有 4 个产物 (4%) 表现出扩增片段的多态性, 经三次重复试验, 均得到相同的结果。这 4 个引物是 OPV03

(CTCCCTGCAA)、OPV06 (ACGCCCAGGT)、OPW15 (ACACCGGAAC) 和 OPX05 (CCTTTCCCTC)。现将它们的扩增产物描述如下:

OPV03: 在 Chancellor 中只扩增出一条带, 而在 Khapli / 8 * Chancellor 中扩增出两条带, 其中一条与 Chancellor 相同, 多出的一条带分子量为 1.95Kb, 命名为 OPV03-1950。

OPV06: 在 Khapli / 8 * Chancellor 中, 除了一条 1.15Kb 的带外, 其它 6 条带与 Chancellor 相同, 这条多态 DNA 命名为 OPV06-1150。

OPW15: 在 Khapli / 8 * Chancellor 中只扩增出 3 条带, 而在 Chancellor 中除了这 3 条带外, 还有一条 1.6Kb 的带, 命名为 OPW15-1600。

OPX05: 在 Khapli / 8 * Chancellor 中有 3 条带, 而在 Chancellor 中, 除了这 3 条带外, 还多出一条 2.7Kb 的带, 命名为 OPX05-2700。

另外, 在用引物 OPV17 (ACCGGCTTGT) 进行扩增时, 我们发现, 尽管在 Chancellor 和 Khapli / 8 * Chancellor 中产生的扩增带数相同, 但有一条 0.8Kb 的扩增片段显示出染色强度的差异性。

3 讨 论

在一对近等基因系中, 相对其中一个近等基因系 (轮回亲本) 而言, 另一近等基因系 (含目的基因) 实际上是 DNA 插入和缺失的结果, 因为在近等基因系的培育过程中, 供体亲本中目的基因及其邻近区域的引入必然会伴随轮回亲本相应基因组区域的缺失。因此, 如果引物的扩增发生在这些区域内, 就很可能产生多态性。OPV03-1950 和 OPV06-1150 只出现在 Khapli / 8 * chancellor 中, 表明它们是从供体亲本 Khapli 的 DNA 扩增出来的产物, 很可能与抗性基因有连锁关系, 而 OPW15-1600 和 OPX05-2700 只出现于 Chancellor 中, 表明它们来自被供体 DNA 置换的一段序列。理论上, 在一对等位基因系中, 除目标基因及其侧翼顺序外, 其它部分应是完全一致的, 因此, 在等位基因系间检测出来的多态 DNA 标记必定与目标基因连锁。然而, 我们使用的材料是仅通过 7 代回交而获得的近等基因系, 其中除目的基因及连锁的供体 DNA 外, 还可能存在着与轮回亲本遗传背景的一些微小差异, 这些与抗病基因非连锁的 DNA 也可能使扩增产物出现多态性 (Martin 等, 1991)。因此仍有必要对 Chancellor × khapli / 8 * Chancellor 杂种的 F₂ 群体进行单株抗病性鉴定和 RAPD 对应分析, 以证实本研究筛选出来的多态 DNA 标记与抗性基因的连锁关系。

在本研究中, 引物 OPV17 在 Khapli / 8 * Chancellor 上扩增的 0.8Kb 片段数明显要比在 Chancellor 中多 (即带强)。

Echt 等^[4]在研究苜蓿的 RAPD 遗传分离及 Crowhurst 等^[3]用 RAPD 进行真菌分类时, 也发现了类似现象, 这很可能是由引物结合位点的顺序同源程度不同造成的。因为在用随机引物的 PCR 中, 由于复性温度较低, 引物与模板 DNA 上具部分同源的顺序也可能结合, 从而扩增出 DNA 片段, 但其扩增效率很可能不及完全同源结合时那么高。因此, 如果与引物结合的顺序的核苷酸有差异, 很可能就出现扩增带的强度有差异。这种带强度的变异性是否也可作为遗传标记还有待于进一步研究。