

文章编号: 1000-3142(2000)04-0313-06

S666-3024

柚类种质资源 RAPD 标记研究的引物筛选

张太平, 李丹, 彭少麟, 凌定厚, 陶丽珍

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要: 利用 100 个 10 碱基随机引物, 对柚类 4 个品种酸柚、沙田柚、文旦柚和泰国柚进行了 RAPD 标记的引物筛选研究, 结果为无扩增产物的引物 18 个, 在 1、2、3 个和所有 4 个样品中有扩增产物的引物数分别为 20、13、25 和 24 个; 读取了 12 个在所有 4 个样品中都有扩增产物的引物的 RAPD 带, 计算了样品间 RAPD 多态性位点的百分率为 60.6%; 计算了样品间的相似系数和遗传距离, 并对遗传距离进行了 UPGMA 聚类分析, 论证了利用所筛选出的引物对柚类进行 RAPD 标记研究的可行性和可靠性。

关键词: 柚类; RAPD 标记; 引物; 筛选

种质资源

中图分类号: Q949.752.703 文献标识码: A

Primers screening for the study on pummelo germplasm with RAPD markers

ZHANG Tai-ping, LI Dan, PENG Shao-lin, LING Ding-hou, TAO Li-zhen

(South China Institute of Botany, CAS, Guangzhou 510650, China)

Abstract: One hundred arbitrary 10-base primers were used here for screening for the study on pummelo germplasm with RAPD markers. Four samples of pomelo cultivars Suanyou, Shatanyou, Wendanyou (3cultivars from China) and Taiguoyou (a cultivar from Thailand) were used for analysis. The results showed that 18 primers didn't produce any RAPD products within all 4 samples; while 24 primers produced variable RAPD products in all 4 samples. The rate of polymorphic loci among 4 samples was 60.6% according to the data maintained from 12 primers out of above 24. Similarity indices and genetic distance were calculated among 4 samples. The UPGMA cluster was conducted on the base of matrix of genetic distance. The result coincided with the pedigree of pummelo.

Key words: Pummelo; RAPD markers; primers; screening

收稿日期: 1999-05-25

作者简介: 张太平 (1967-), 男, 生态学专业, 在读博士, 主要从事污染生态学与分子生态学研究。现通讯地址: 华南理工大学资源与环境工程系 (510640)。

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (39899370)、中日美国际合作项目 (1998 年度)、中国科学院广州分院广东省科学院科技计划项目 (99B05902X) 资助

自 60 年代利用同工酶作为遗传标记以来,分子标记技术迅速发展。特别是 PCR 技术的出现,使得基于 DNA 的分子标记技术变得便捷而可靠。近年来迅速发展起来的分子标记技术包括 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)、VNTR (Variable Number Tandem Repeats)、ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats)、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 等。RAPD 标记技术是由 Williams 等 (1990) 和 Welsh (1990) 等创立起来的^[1],由于其成本低、快速、灵敏,所需 DNA 的量微少,不需放射性同位素标记而用溴化乙锭染色后直接观察记录,因而倍受生物学家的青睐^[2]。近年来 RAPD 分子标记技术已迅速用于物种起源的遗传分析^[3]、遗传育种的品种鉴定^[4]、遗传工程的基因定位^[5]等方面的研究。RAPD 在果树种质资源的研究中也迅速用于品种鉴定与分类^[6]、系谱分析^[7]、特异性状的基因标记^[8]等各个方面。由于 RAPD 标记技术应用随机引物,当对大量实验材料进行研究时,往往首先要对引物进行筛选^[9]。

柚 (*Citrus grandis* Osbeck) 为柑桔属常绿果树,广泛分布于中国及东南亚的亚热带地区,种质资源非常丰富。我国为柚类遗传多样性分布中心之一,据初步统计,我国现有栽培品种(系) 120 个以上。为进一步开发利用柚类种质资源,必须对其遗传多样性进行深入研究。国内外利用同工酶^[10]、ISSR^[11]等标记技术对柑桔属其他果树及柚类的部分品种进行过研究,但还未见利用 RAPD 标记技术对柚类种质资源进行系统研究的报道。为便于更有效地利用 RAPD 技术对柚类种质资源进行遗传分析,本实验利用 4 个柚类品种为材料,通过 RAPD 标记技术对 100 个 10 碱基的随机引物进行筛选,并对结果进行了 UPGMA 聚类分析。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验所用的材料为半野生的酸柚,国内常见栽培品种沙田柚、文旦柚,以及泰国引种的栽培品种(品种名未知,暂叫泰国柚)。取幼叶作为提取基因组 DNA 的实验材料。由于本实验的主要目的是对柚类种质资源 RAPD 分析所需引物进行筛选,所以所选实验材料尽量代表不同的遗传背景。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用 Charles J. Simson 等的方法^[12],并参照 N. F. Weeden 讲义(分子生物学技术培训班资料)稍作修改。分别取酸柚、沙田柚、文旦柚与泰国柚新鲜幼嫩叶片 1 cm²左右,置于研钵中,加入 1 mL CTAB 提取缓冲液(2% W/V CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.4% V/V 巯基乙醇),研磨成匀浆,转入 2 mL 离心管中,加入 100 μ L 氯仿-异戊醇(24:1),65 $^{\circ}$ C 加热 20~30 min,然后冷却至室温,再加入足够的氯仿-异戊醇,充满整个试管,反复摇动至形成乳浊液,10 000 \times g 离心约 10 min 左右使其形成分离相。将上层水相(约 0.5~0.8 mL)转移至 2 mL 离心管中,加入等体积冰冻酒精使 DNA 沉淀,将 DNA 挑出来用 70%酒精冲洗,真空干燥后溶于 100 μ L TE 中备用。

1.3 PCR 反应及其产物电泳

扩增反应在 Biometra 的 UNO-Thermerblock 上进行。25 μ l 反应液中包括 10 mM Tris-HCl (pH9.0, 25 $^{\circ}$ C), 50 mM KCl, 0.01% tritonX-10, 1.9 mM MgCl₂, 0.1 mM 4 \times dNTP, 0.2 μ M 10 碱基随机引物,1 单位 Taq DNA 聚合酶,10~50 ng 模板 DNA。反应液上加 20 μ l 矿物油防止反应过程的水分蒸发。反应过程共 45 个循环,除第一个循环经 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,每

一个循环都包括 92 °C 变性 1 min, 35 °C 引物与模板结合 1 min, 72 °C 引物延伸 2 min, 最后一次循环还包括 72 °C 保温 5 min, 降温至 4 °C 等候取出或直接取出样品在冰箱中 4 °C 保存。灭菌重蒸水作为对照。扩增产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 以 Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (100~3 000 bp) 为分子标记, 溴化乙锭染色, 结果用 Polaroid 667 照相记录。

表 1 实验所用的引物及其序列

Table 1 Primers used in the study and their sequences

引物 Primer No.	序列 (5'~3') Sequence						
S1	GTTTCGCTCC	S26	GGTCCCTGAC	S51	AGGCGCATTG	S76	CACACTCCAG
S2	TGATCCCTGG	S27	GAAACGGGGTG	S52	CACCGTATCC	S77	TTCCCCCCAG
S3	CATCCCTCTG	S28	GTGACGTAGG	S53	GGGGTGACGA	S78	TGAGTGGGTG
S4	GGACTGGAGT	S29	GGGTAACGCC	S54	CTTCCCA?	S79	GTTGCCGGCC
S5	TGCGCCCTTC	S30	GTGATCGCAG	S55	CATCCGTGCT	S80	ACTTCGCCAC
S6	JGCTCTGCCC	S31	CAA1CGCCGT	S56	AGGGCGTAAG	S81	CTACGGAGGA
S7	GGTGACGCAG	S32	TCGGCGATAG	S57	TTTCCACGG	S82	GGCACTGAGG
S8	GTCACACGG	S33	CAGCACCCAC	S58	GAGAGCCAAC	S83	GAGCCCTCCA
S9	TGGGGGACTC	S34	TCTGTGCTGG	S59	CTGGGGACTT	S84	AGCGTGCTG
S10	CTGCTGGGAC	S35	TTCCGAACCC	S60	ACCCGGTCAC	S85	CTGAGAOGGA
S11	GTAGACCCGT	S36	AGCCAGCGAA	S61	TTGAGCCAG	S86	GTGCCTAACC
S12	OCTTGAOCGA	S37	GAOCCTTGT	S62	GJGAGGCGTC	S87	GAACCTGGCG
S13	JTCCCCCGCT	S38	AGGTGACCGT	S63	GGGGGTCTTJ	S88	JCACCTCCAC
S14	JCCGCTCTGG	S39	CAAAVGTCCG	S64	CCGCATCTAC	S89	CTGACGTCAC
S15	GGAGGGTGTT	S40	GTTGCGATCC	S65	GATGACCGCC	S90	AGGGCCGTCT
S16	TTTGCCCGGA	S41	ACCCGGAAGG	S66	GAACGGACTC	S91	JGCCCGTGT
S17	AGGGAACGAG	S42	GGACCCAACC	S67	GTCCCGACGA	S92	CAGCTCACGA
S18	CCACAGCAGT	S43	GTCGCOGTCA	S68	TGGACCGGTG	S93	CTCTCCGCCA
S19	ACCCCGAAG	S44	TCTGGTGAGG	S69	CTCACCGTCC	S94	GGATGAGACC
S20	GGACCCCTAC	S45	JGAGCGGACA	S70	TGJCTGGGTG	S95	ACTGGGACTC
S21	CAGGCCCTTC	S46	ACCTGAACGG	S71	AAAGCTGCGG	S96	AGCGTCTTCC
S22	TGCGGAGCTG	S47	TTGGCACGGG	S72	TGTCATCCCC	S97	ACGACCGACA
S23	AGTCAGCCAC	S48	GTGTGCCCCA	S73	AAGCTCGTC	S98	GGCTCATGTG
S24	AATCGGGCTG	S49	CTCTGGAGAC	S74	TGCGTGCTTG	S99	GTCAGGGCAA
S25	AGGGGTCTTG	S50	GGTCTACACC	S75	GACGGATCAG	S100	TCTCCCTCAG

1.4 RAPD 标记的数据获得与处理

根据照相记录, 首先确定不同引物的扩增结果, 统计在所有 4 个样品中无扩增带的引物, 分别在 1、2、3 个及所有 4 个样品中都有扩增带的引物。筛选出清晰且可重复的在所有 4 个样品中都扩增带的引物, 在样品间对 RAPD 的扩增带进行比较, 确定清晰可重复的 DNA 带作为一个位点, 若某个 DNA 带在一个材料中出现记为“1”, 未出现记为“0”, 根据公式 $F = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 计算不同材料间的相似系数, N_{ij} 为样品 i 和样品 j 共有的分子量相同 DNA 带, N_i 为样品 i 的 DNA 扩增带数, N_j 为样品 j 的 DNA 扩增带数。各样品间的遗传距离 $P = 1 - F$ 。根据样品间的遗传距离矩阵利用 Statsoft 软件进行各样品间 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记的引物筛选结果

本实验所用 100 个引物 (S1-S100) 为加拿大 Sangon 公司的产品, 引物及其序列见表 1。用 100 个引物对 4 个样品进行随机扩增, 以筛选出适合于对所有柚类品种进行 RAPD 分析的

引物。100个引物在所有4个样品中无扩增产物(100 bp-3 000 bp, 下同)的有18个(18%),

表2 四个样品12个随机引物的扩增结果

Table 2 RAPD pattern obtained from 4 pummelo samples with 12 primers

引物 primers	RAPD 带 bands	样品 ¹⁾ samples				引物 primers	RAPD 带 bands	样品 ¹⁾ samples			
		1	2	3	4			1	2	3	4
S16	1	1	1	1	1	S90	1	0	1	1	0
	2	0	0	1	0		2	0	1	1	0
	3	0	0	1	0		3	0	1	1	1
	4	1	1	1	1		4	0	1	1	1
	5	1	1	1	1		5	0	-	1	1
	6	0	0	0	1		6	1	1	1	1
	7	0	1	1	1		7	0	0	1	0
	8	0	1	1	-		8	1	1	1	-
	9	1	1	1	-		9	1	0	0	0
S17	1	1	1	1	1	S91	1	0	1	1	-
	2	0	1	1	1		2	0	0	1	0
	3	0	1	1	1		3	0	1	-	1
	4	1	1	1	1		4	1	0	0	1
	5	1	1	1	1		5	1	1	1	1
	6	1	1	1	1		6	1	1	1	1
	7	0	1	1	1		7	1	1	1	1
S73	1	0	1	1	1	S92	8	0	1	0	0
	2	0	1	1	1		9	1	1	1	1
	3	0	1	1	1		10	1	1	0	0
	4	1	1	1	1		1	0	1	1	-
	5	1	1	1	1		2	0	1	1	1
S75	1	1	1	1	1	3	1	0	0	1	
	2	1	1	1	1	4	1	1	0	0	
	3	1	1	1	1	5	0	1	0	0	
	4	1	1	1	1	6	1	0	0	0	
	5	1	0	0	0	7	0	1	1	1	
	6	1	1	1	0	8	1	1	0	1	
	7	1	1	1	1	9	1	1	1	1	
	8	1	0	0	0	10	1	0	0	0	
S79	1	0	0	0	1	11	0	1	0	0	
	2	0	1	1	0	12	0	1	0	0	
	3	0	0	0	1	13	-	1	1	1	
	4	1	0	0	0	14	1	1	0	0	
	5	1	1	1	1	S94	1	0	1	0	0
	6	1	1	1	1		2	0	0	1	1
	7	1	1	1	1		3	1	1	1	1
	8	1	1	1	1		4	0	1	1	1
	9	0	1	1	1		5	0	1	1	1
	S80	10	0	1	0	0	6	1	1	1	1
1		1	1	1	1	7	0	1	1	1	
2		0	1	1	1	S96	1	0	1	1	1
3		1	1	1	1		2	0	1	1	1
4		1	1	1	1		3	0	1	1	1
5		1	1	1	1		4	1	1	1	1
6		1	1	1	1		5	0	0	1	1
7		0	1	1	1		6	0	1	1	0
8		0	1	1	1		7	0	1	1	1
9		0	1	0	0		8	-	1	1	1
S88	1	1	1	1	1		9	1	1	1	1
	2	1	1	1	1		10	1	1	1	1
	3	1	1	1	1		11	0	1	1	1
	4	1	1	0	1		12	1	0	0	0

¹⁾ 1 酸柚; 2 沙田柚; 3 文旦柚; 4 泰国柚。1, 2, 3, 4 represents Suanyou, Shatanyou, Wendanyou, and Taiguoyou respectively.

分别为 S3、S9、S26、S31、S35、S46、S50、S54、S55、S57、S59、S60、S62、S63、S66、S67、S81、S100；在 1 个样品中有扩增产物的引物有 20 个 (20%)，分别为 S4、S12、S13、S14、S16、S19、S22、S29、S34、S36、S38、S40、S49、S61、S64、S65、S77、S86、S87、S95；在 2 个样品中有扩增产物的引物有 13 个 (13%)，分别为 S7、S11、S15、S17、S28、S30、S32、S37、S68、S70、S71、S74、S98；在 3 个样品中有扩增产物的引物有 25 个 (25%)，分别为 S1、S2、S5、S6、S18、S21、S23、S24、S27、S43、S44、S45、S51、S52、S53、S56、S58、S69、S78、S82、S83、S85、S89、S93、S99；在全部 4 个样品中都有扩增产物的引物有 24 个 (24%)，分别为 S8、S10、S20、S25、S33、S39、S41、S42、S47、S48、S72、S73、S75、S76、S79、S80、S84、S88、S90、S91、S92、S94、S96、S97。

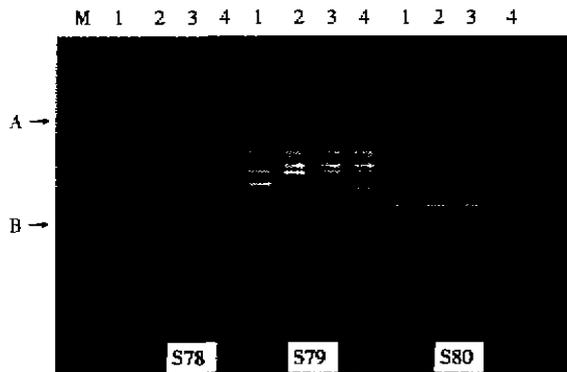


图 1 引物 S78、S79、S80 的 RAPD 电泳结果
Fig. 1 RAPD products of primers S78、S79、S80
1、2、3、4 同表 2。M 为标记 DNA。A 为 3 000 bp。
B 为 500 bp。1、2、3、4 like table。
A=3 000 bp、B=500 bp.

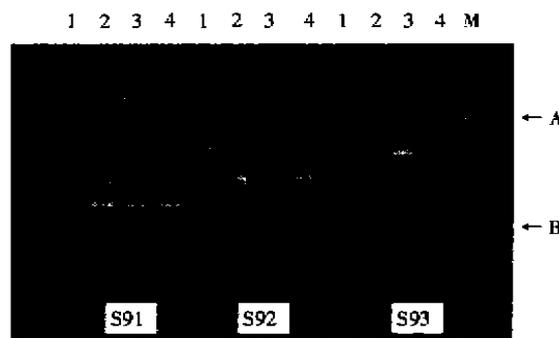


图 2 引物 S91、S92、S93 的 RAPD 电泳结果
Fig. 2 RAPD products of primers S91、S92、S93
1、2、3、4 同表 2。M 为标记 DNA。A 为 3 000 bp。
B 为 500 bp。1、2、3、4 like table。
A=3 000 bp、B=500 bp.

一般来说，在大部分样品中不能产生 DNA 扩增带的引物，说明与该类种质基因组 DNA 的同源性较低，在对种质资源的 RAPD 研究中不宜用作合适的引物，而通常筛选出能在所有样品中产生清晰、可重复的 DNA 扩增带的引物用于正式的种质资源大规模材料的 RAPD 标记研究。

2.2 RAPD 标记的数据分析

选取在所有 4 个样品中都有扩增产物的引物 12 个，它们为 S10、S47、S73、S75、

S79、S80、S88、S90、S91、S92、S94、S96，根据照片记录，如图 1、2 为部分引物的 RAPD 图谱。读取每个引物的扩增产物 RAPD 带，如表 2。

由表可知，12 个随机引物在 4 个柚类样品中共扩增出 104 条带，即检测到 104 个柚类 RAPD 位点，其中 63 个位点为多态性位点，多态性位点百分率为 60.6%。

表 3 4 个柚类样品间的相似系数和遗传距离
Table 3 Similarity index and genetic distance of 4 samples of pummelo

样品 samples	1	2	3	4
1	—	0.667	0.607	0.621
2	0.333	—	0.878	0.857
3	0.393	0.122	—	0.865
4	0.379	0.143	0.135	—

在“—”上方的数据为相似系数，下方为遗传距离。
the data above “—” are similarity indices and below are genetic distance.

根据以上公式计算各样品间的相似性系数和遗传距离,结果如表 3。通过对遗传距离的 UPGMA 聚类分析,结果如图 3

从 4 个柚类样品的 UPGMA 聚类分析图可以清楚地看出,处于半野生状态的酸柚与其他 3 个栽培品种差别明显,单独归为一类;3 个栽培品种之间遗传距离较小,归为一类,而来自国内的 2 个品种首先聚在一起,与来自泰国的样品分离,与柚类系谱关系相符。

综上所述,通过筛选合适的引物,利用 RAPD 标记技术能够对柚类种质资源进行快速、准确的遗传分析。利用 RAPD 标记技术对柚类大量样品的系统分析,对柚类遗传多样性、柚类品种间的亲源关系将有进一步的认识,为果树的品种鉴定、遗传育种及种质资源的保护与利用提供依据和背景资料。

感谢梅州市农科所惠存实验材料。

参考文献:

- [1] 戴思兰,陈俊愉,李文彬. 菊花起源的 RAPD 分析 [J]. 植物学报, 1998, 40 (11): 1 053~1 059
- [2] 方德秋,章文才,肖顺元. 应用同工酶进行柑橘分类和进化研究 [J]. 植物分类学报, 1993, 31 (4): 329~352
- [3] 梁红健,刘敏,钟志宇等. 中国部分兰花品种的 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 1996, 23 (4): 365~370
- [4] 卢江. 随机放大多态性 DNA (RAPD) —— 一种新的分子遗传标记技术 [J]. 植物学报, 1993, 35 (增刊): 119~127
- [5] 孟祥栋,马红,张卫华. RAPD 技术对蕙属品种遗传关系的分析 [J]. 生物多样性, 1998, 6 (1): 37~41
- [6] 邱丽娟, Randall L Nelson, Lila O Vodkin 等. 利用 RAPD 标记鉴定大豆种质 [J]. 作物学报, 1997, 23 (4): 408~417
- [7] 王振山,陈洪,朱立煌等. 中国普通野生稻遗传分析的 RAPD 研究 [J]. 植物学报, 1996, 38 (9): 749~752
- [8] 朱立煌,徐吉臣,陈英等. 用分子标记定位一个未知的抗稻瘟病基因 [J]. 中国科学 (B 辑), 1994, 24 (10): 1 049~1 052
- [9] Charles J Simon, Fred J Muehlbauer. A quick and versatile method for plant DNA extraction from small amounts of tissue [J]. 1990
- [10] Fang DQ, RR Krueger, ML Roose. Phylogenetic relationships among selected Citrus Germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *J. Amer. Hort. Sci.* 1998, 123 (4): 612~617
- [11] Weining S, P Langridge. Identification and mapping of polymorphism in cereals based on the polymorase chain reaction [J]. *Theor. Appl. Gen.*, 1991, 82: 209~216
- [12] Williams J G K, A R Kubelik, K J Livak, J A Rafaski, S V Tingey. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18: 6 531~6 535

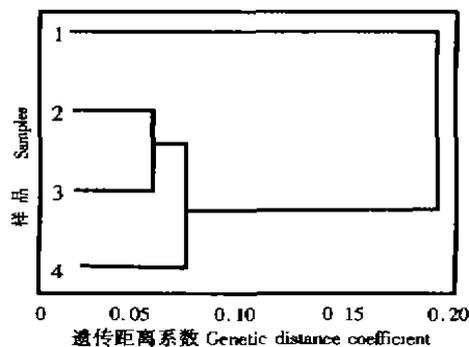


图 3 四个柚类样品的 UPGMA 聚类图
Fig. 3 Tree diagram of four samples of Pummelo from UPGMA cluster