

金华佛手遗传多态性的 RAPD 分析与品种的分子鉴定

马伯军, 章斌轶, 陈 鏢, 陈秉初*

(浙江师范大学生命与环境科学学院, 浙江 金华 321004)

摘要:目的 通过对佛手 RAPD反应的优化,分析其遗传多态性,并对 3个品种作出了分子水平上的鉴定。方法 RAPD反应在以下条件下进行: 10~100 ng μ L 模板 DNA, 3.0~5.0 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 0.2 μ mol/L 10-mer Primer, 1 unit Taq Polymerase/25 μ L 反应体积。结果 从 38个引物中挑出 12个有效稳定的引物。用距离系数 UPGMA法聚类分析产生了树状图。根据 RAPD分析及形态学观察,品种白花青皮与白花白皮的亲缘关系较近。不同的品种 RAPD反应有各自独特的扩增带型。结论 本方法简单、高效,适宜用于中药佛手的遗传多态性和品种分子鉴定。

关键词: 佛手; RAPD; 遗传多态性; 分子鉴定

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)05-0460-03

RAPD analysis of genetic polymorphism and molecular identification of *Citrus medica* cv. *sarcodactylis* from Jinhua

MA Bo-jun, ZHANG Bin-yi, CHEN Biao, CHEN Bing-ehu

(Academy of Life and Environment Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang 321004, China)

Abstract Object To analyse genetic polymorphism in DNA level of three species and determine them in molecular level by using of the optimization of *Citrus medica* cv. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle RAPD reaction. **Methods** RAPD reactions were performed under the following conditions: template DNA 10~100 ng μ L, 3.0~5.0 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 0.2 μ mol/L 10-mer Primer, 1 unit Taq Polymerase/25 μ L reaction volume. **Results** Twelve efficient and stable primers were selected from 38 primers. Phenograms were constructed by using genetic distance UPGMA method. Based on the results of the RAPD analysis and on a review of morphological characteristic, *C. medica* cv. *sarcodactylis* species BAIHU AQINGPI could be used as BAIHU ABAIPI in three species, there were some special amplified bands in every RAPD reactions from different species. **Conclusion** This method could serve as an easy and highly efficient method for *C. medica* cv. *sarcodactylis* genetic polymorphism and molecular identification of species.

Key words *Citrus medica* cv. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle; RAPD; genetic polymorphism; molecular markers

佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle 又名佛手柑、五指柑和金佛手。为芸香科柑橘属常绿小乔木或灌木,是原产印度的原种枸橼在我国久经栽培产生变异而来的新类型。佛手在我国许多地方都有栽培,浙江金华佛手无论在栽培面积、产量还是质量上都占首位。金华的佛手按引入地区有南京种、福建种,按花朵颜色有白花、红花,按果形有大种与小种。但是长期以来都没有一个固定的品种分类方法,导致佛手产业不能发挥应有的经济效益。随着特色农业、花卉产业的兴起,越来越需要对佛手进行品种间的分类和鉴定。在植物鉴

定中,根据植物叶、花、茎、果实的形态和颜色等感官特征来区分品种,已把金华佛手分为红花、白花青皮、白花白皮 3个品种,但根据感官特征的分类往往受到发育时间、环境等因素的影响,而从 DNA 分子水平入手进行鉴定具有明显的稳定性与高效性,且不受时间、环境等因素的影响。当今 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 技术的出现,因其不需要预先知道基因组的序列信息,无需使用同位素或其他非放射性标记,在生物种属的鉴定、种资源的遗传多样性分析等方面得到了迅速而广泛的运用,笔者通过 RAPD 分析,发现了佛手品种间

* 收稿日期: 2001-07-11

基金项目: 浙江省自然科学基金项目资助 (301026); 浙江省大型仪器测试基金项目资助 (00070)

作者简介: 马伯军 (1965-),男,浙江省嵊州人,副教授,硕士,主要从事植物分子生物学研究。E-mail: jhmbjun@mail.jhptt.zj.cn

DNA 分子水平差异,揭示佛手种质资源存在明显的遗传多样性,为佛手品种鉴别提供 DNA 分子水平的重要依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料:采自浙江森禾种业金华分公司的佛手基地,主要有 3 个品种,分别是白花青皮、白花白皮、红花。采用的药品 Taq 酶、dNTP 与引物都购自上海生物工程公司,引物为 S 序列引物 (S1-S35 S222 S227 S228,共 38 种)。

1.2 DNA 提取:参照胡春根的方法^[1]并经过改良如下:摘取植株顶端幼嫩叶片经冷藏后使用。取样 0.25 g,液氮下研磨后置灭过菌的 1.5 mL 离心管中;加入 700 μ L 的提取缓冲液 [100 mmol/L 的 Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L 的 Na₂EDTA (pH 8.0), 500 mmol/L 的 NaCl, 100 mmol/L 的 β -巯基乙醇 (BME), 3% 的十二烷基磺酸钠 (SDS)] Vit C 0.1 g/g 鲜样,搅匀;于 65 $^{\circ}$ C 水浴中保温 20~30 min,离心 (12 000 r/min, 2 min);将上清液转入干净离心管中,加入等体积苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1),缓慢混匀,离心 (12 000 r/min, 5 min),上清液再以氯仿-异戊醇 (24:1) 抽取后离心 (12 000 r/min, 5 min);收集上清液,加入 10 μ L 5 mol/L 醋酸钠和 0.6 倍体积异丙醇,摇匀;在 -20 $^{\circ}$ C 下静置 10 min,离心 (12 000 r/min, 2 min),倾去上清液,沉淀物用 75% 酒精浸泡,无水酒精漂洗,用吹风机干燥;最后加入 100 μ L 无菌水溶解,即为 DNA 粗提液。

由于佛手 DNA 的提取至今未见报道,而 RAPD 分析对模板 DNA 质量有一定要求,我们从样品量、研磨条件、样品状态以及 Vit C 的添加量等方面进行多次试验,以求找出一种合适的提取方法,使提取出的 DNA 能用于 RAPD 分析。

1.3 RAPD 扩增及产物检测:为了获得稳定、有效的扩增结果,我们设计了不同梯度的模板 DNA 浓度、MgCl₂浓度、引物浓度、Taq 酶用量等,对扩增条件进行了优化。PCR 扩增仪为 Biometra-PC20 型。PCR 扩增程序为:93 $^{\circ}$ C 2 min;然后 93 $^{\circ}$ C 1 min, 35 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min,进行 42 个扩增循环;之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳后在紫外透射仪上观察拍照。

1.4 多态性数据分析及品种的鉴定:所得电泳的结果,根据 Nei 氏公式^[2]计算个体之间的遗传相似度 $F = 2m_{xy} / (m_x + m_y)$, m_x 为一个样品的总扩增带数,

m_y 为另一个样品的总扩增带数, m_{xy} 为两个样品共有的扩增带数, F 为两个样品之间的相似性系数。距离系数 (D) 采用公式 $D = 1 - F$ 进行计算,用 UPGMA 法对分类群彼此之间的距离系数进行聚类分析。

在品种鉴定上,按照不同品种 DNA 的稳定的特异对应的扩增带型,作为在 DNA 水平上的鉴定依据。

2 结果与分析

2.1 基于 RAPD 用佛手 DNA 的提取:RAPD 具有操作方便、灵敏快捷的优点,但存在扩增重复性较差的问题。而 DNA 的提取质量直接影响 RAPD 的重复性、稳定性,综合我们的佛手 DNA 提取结果,样品取量以每 eppendorf 管 (即 1.5 mL 离心管) 700 μ L 提取液中加 0.1~0.25 g 鲜样品较为适宜,这与胡春根等人^[1]的用量是相符的;在加提取液前最好用液氮研磨,研磨时尽量细且均匀;并且可以加少量的抗氧化剂 Vit C (0.1 g/g 鲜样),这样能够得到色泽较好的 DNA 粗提物;若是采样地离实验室较远,也可以使用干燥剂干燥制成干叶后再使用,不会影响 DNA 的提取效果。实验所得的 DNA 通过 7520 型紫外分光光度计检测, A_{260} / A_{280} 均在 1.8~2.0 之间,说明 DNA 的纯度较高,符合 RAPD 的扩增要求。

2.2 佛手 RAPD 扩增体系的优化:由于佛手 DNA 的 RAPD 扩增未见报道,对于一个新类群的 RAPD 分析,确定最适模板 DNA 的扩增浓度是关键,不同的类群有不同的最佳范围^[3]。除 DNA 的纯度与浓度,引物浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTP 浓度、Taq 来源和用量、扩增程序与循环周期以及所用的 PCR 扩增仪型号均能影响 RAPD 反应的扩增结果^[4],这些条件稍有变化,就容易产生假扩增带,结果完全不一样,影响实验的稳定性、重复性。我们对以上各影响因素通过梯度分析,进行优化。对于佛手 RAPD 来说,在本实验室的 PCR 扩增仪型号和 RAPD 扩增程序与循环周期下 (见 1.3),使用 10~100 ng/25 μ L 模板 DNA, 3.0~5.0 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 0.2 μ mol/L 10-mer Primer, unit Taq Polymerase 的 RAPD 扩增条件,在扩增带型和清晰度上均获得很好的重复。为佛手 DNA 水平的遗传多态性分析和品种分子水平上的鉴定提供了科学依据。

2.3 佛手 DNA 水平多态性分析:通过优化确定理想的扩增条件后,本实验共采用了 38 种引物对佛

手的 3 个品种: 白花青皮 (品种 A)、白花白皮 (品种 B)、红花 (品种 C) 进行了 RAPD 扩增, 其中有 12 种引物能够扩增出清晰的带谱, 其扩增出 DNA 扩增带数见表 1

表 1 所用引物及其扩增带数

引物名	5'-3' 序列	扩增带数
S1	5' GTTTCGCTCC3'	8-10
S6	5' TGCTCTGCCC3'	3-05
S18	5' CCACAGCAGT3'	5-12
S20	5' GGACCCTTAC3'	4-07
S22	5' TGCCGAGCTG3'	2-05
S25	5' AGGGGTCTTC3'	4-08
S26	5' GGTCCCTGAC3'	7-09
S28	5' GTGATCGCAG3'	1-03
S34	5' TCTGTGCTGG3'	3-06
S222	5' AGTCACTCC3'	2-03
S227	5' GAAGCCAGCC3'	8-11
S228	5' GGACGGCCTT3'	5-08

通用 Nei 的公式^[2]计算出 3 种佛手的遗传相似性系数和距离系数, 结果, 品种 A (白花青皮) 与品种 B (白花白皮) 之间的距离系数比品种 B 与品种 C (红花) 之间及品种 A 与 C 之间的距离系数要小, 表明分类群彼此间相似性程度越高。根据计算所得的距离系数进行聚类分析, 由此我们可以得出 3 种佛手的树状图 (图 1)。这说明品种 A 与 B 之间的亲缘关系近, 而与品种 C 之间亲缘关系较远些。这与形态解剖学上的观点是相符的。

尽管由于实验条件的限制, 使用的引物数、品种数有限, 但从使用 S1 S18 S227 的图 1 中仍能发现

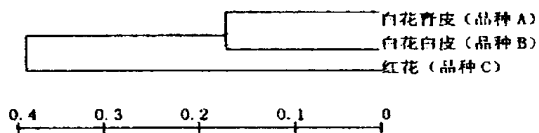


图 1 用距离系数 UPGMA 法聚类分析产生的树状图

不同佛手 DNA 的 RAPD 扩增产物存在明显的差异。品种 A B C 3 个品种之间有相同的带谱, 也有不相同的带谱, 说明 3 个品种之间具有一定的遗传多态性。

2.4 佛手品种的分子鉴定: 从金华佛手 RAPD 扩增带谱中, 我们发现 3 个品种的佛手都有自己的特有位点。如图 2 所示, 泳道 4-6 使用的 S18 引物, 泳道 4 品种 C (红花) 有 1 条明显的 2.3 Kb 特异带, 泳道 6 品种 A (白花青皮) 在 400~700 bp 之间有 4 条特异带型, 而泳道 5 品种 B (白花白皮) 则没有 A C 相关的特异带型。这些结果得到了很好的重复, 其特有位点能够将这 3 种金华佛手完全区分开, 说明 RAPD 分析方法在佛手品种的鉴定完全切实可行。



M: DNA/HindIII; 1-3 引物 S227; 4-6 引物 S18; 7-9 引物 S1; 1, 4, 7 品种 C; 2, 5, 8 品种 B; 3, 6, 9 品种 A

图 2 不同品种的佛手 RAPD 扩增结果

参考文献:

- [1] 胡春根, 郝玉, 邓秀新, 等. RAPD 分析用的梨 DNA 提取方法 [J]. 遗传, 1998, 20 (4): 31-33.
- [2] Nei M, Li W H. Mathematical modal for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [3] 邹喻苹, 蔡美琳, 王子平, 等. 古代太子莲及现代红化中国莲种质资源的 RAPD 分析 [J]. 植物学报, 1998, 40 (2): 163-168.
- [4] 汪小全, 邹喻苹, 张大全. RAPD 应用于遗传多样性和系统学中的问题 [J]. 植物学报, 1996, 38 (12): 954-962.

欢迎订阅《中草药》杂志 1998 年增刊

1998 年第 29 卷增刊刊载论文 80 篇, 共 160 页 (约 30 万字)。并以当今国际研究的热点“银杏叶”为专论重点, 包括“银杏叶”的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面的科研论文 20 篇, 充分反映了国内外“银杏叶开发研究”方面的新成果、新进展和新动态。定价 55 元, 另加包装费、邮费 5 元。凡订阅者请向我部索取订单: 300193 天津市南开区鞍山西道 308 号《中草药》杂志编辑部, Tel: 022-27474913 Fax: 022-23006821