

四种花色一串红 RAPD 分析

胡国富, 李凤兰, 袁 强, 胡宝忠

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要:以 4 种花色一串红为试材进行了 RAPD 研究, 筛选出的 RAPD 最佳反应体系为: 采用 25 μ L 的反应体系, 其中含有 2 μ L 的 10 \times buffer, 0.45 mmol \cdot L⁻¹ 的 dNTPs, 2.0 mmol \cdot L⁻¹ 的 Mg²⁺, 2U 的 TaqDNA 聚合酶, 0.30 μ mol \cdot L⁻¹ 的引物, 40 ng 的模版。共筛选出 12 个特异引物, 扩增出 84 条带, 具有特异性的谱带为 28 条, 占总带数的 33%, 在聚类图分析中, 把 4 种花色一串红划分为两大类: 首先是红色和红白双色聚为一类, 然后和紫色聚在一起, 白色单独为一类。

关键词:一串红; 花色; RAPD

中图分类号: S 681.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2007)05-0065-03

RAPD Analysis in the Four Kinds of Color flowered *Salvia splendens* Ker Gawl

HU Guo fu, LI Feng lan, YUAN Qiang HU Bao zhong

(Life Science College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: Four kinds of Color flowered *Salvia splendens* Ker Gawl were analyzed using RAPD. The results showed that the optimal RAPD reaction conditions were as follows: The optimal reaction mixture (25 μ L total volume) contained 2.0 μ L 10 \times buffer, 0.45 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 2.0 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 2U Taq DNA polymerase, 0.30 μ mol \cdot L⁻¹ primer and 40 ng genomic DNA. 84 bands were amplified from 12 primers used, the differential bands had 28 bands, which account for 33% of total bands. In cluster group analysis, the four kinds of color flowered were divided into 2 styles: at the first, the red color and red white color were grouped together, then they grouped with purple color in to one cluster and the white color was single.

Key words: *Salvia splendens* Ker Gawl; kinds of color flowered; RAPD

一串红(*Salvia splendens* Ker Gawl)是唇形科(Labiatae), 鼠尾草属(*Salvia* L.)的植物。原产于南美巴西, 是重要的观赏花卉, 花期长达几个月。一串红花期都在 6~10 月之间, 花期较长, 尤其是常用的红色品种, 其花萼、花冠的红艳, 色泽纯正、花序比较大, 表现极为突出。但其花色比较单一, 只有红色系、白色系和紫色系等较少的花色, 因此, 花色改良及确定其亲缘关系对于育种方面重要的性状改良研究是十分必要的。

RAPD 技术是 Willams J 与 Welsh J 两个研究小组于 1990 年同时提出的一项 DNA 多态性分析

技术^[1]。这种方法以 PCR 技术为基础, 无须预先了解 DNA 序列的信息, 具有分析速度快, DNA 样品用量少, 操作简便, 随机引物合成方便等优点。因此, RAPD 技术广泛应用于鉴定植物种间和种内的亲缘关系领域的研究中。本实验通过 RAPD 对 4 种花色一串红进行遗传分析, 来探讨不同花色一串红的亲缘关系, 为花色及其他改良提供新依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验以美国进口品种太阳神系列中的 4 种花色一串红: 红色、紫色、红白相间、白色为试材。

收稿日期: 2006-12-11

第一作者简介: 胡国富(1974-), 男, 哈尔滨人, 博士, 讲师, 从事植物分子生物学研究。E-mail: guofuh2003@yahoo.com.cn.

通讯作者: 胡宝忠(1962-), 男, 教授, 博士, 博士生导师。

1.2 实验方法

1.2.1 随机引物 本实验共采用 60 个随机引物, 分别为 L01 - L20、O01 - O10 和 F01 - F10、A01 - A10、P01 - P10 共 60 个, 为北京赛百盛公司产品。

1.2.2 DNA 的提取及凝胶检测 采用改良后的 SDS 法进行 DNA 提取, 对提取的 DNA 进行紫外吸收和凝胶电泳检测。

1.2.3 RAPD 实验体系的建立 RAPD 反应条件参照 Williams^[1] 推荐的反应条件, 以 4 种花色混合 DNA 为模板建立实验体系, 筛选最佳反应体系。

1.2.4 电泳结果数字化记录与多态性判断 DNA 模板经 PCR 扩增, 反应条件为 94℃变性 4 min; 45 个循环: 94℃变性 90 s, 34℃退火 1 min, 72℃延伸 105 s; 72℃延伸 7 min, 反应终止, 对重复性好且条带清晰的图片作数据统计。对同一引物不同模板的电泳结果, 迁移率相同的带为分子量相同的 RAPD 带, 所有模板都具有的带为公共带, 表示无多态性, 其余为特异带, 表示有多态性。有带记为 1, 无带记为 0, 得出二态数据矩阵。

1.2.5 RAPD 扩增带分析 对 4 种花色 RAPD 条带进行统计和比较, 计算多态性位点百分率并寻找品种特异带及特有带。并利用软件 SPSS12.0 进行聚类分析, 构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 DNA 的最优提取方法

通过对改良的 SDS 法所提取的 DNA 颜色为透明色, A_{260}/A_{280} 的比值在 1.61 ~ 1.88。且电泳谱带清晰, 无降解, 说明利用该方法提取的 DNA 较纯, 可以用于一串红 RAPD 分析的要求。

2.2 RAPD 反应的优化

2.2.1 DNA 模板浓度对 RAPD 扩增的影响 为了确定一串红 RAPD 分析的 DNA 浓度, 在 25 μL 反应体系中进行了 4 个不同浓度梯度(15、20、30、40 ng)的比较实验。当模板浓度在 30、40 ng 时有扩增带出现, 其它浓度扩增的带型模糊或无明显的扩增带。所以初步认为在 25 μL 反应体系中用 30 ng 或 40 ng 的模板 DNA 比较适宜。

2.2.2 dNTPs 浓度对 RAPD 扩增的影响 dNTPs 是 RAPD 反应的底物, 当 dNTPs 不足时扩增过程会过早终止, 导致产物减少, 但浓度过高时, 会增加碱基的错配率, 并且与 TaqDNA 聚合酶竞争 Mg^{2+} , 影响 TaqDNA 聚合酶的活性。本实验设计

了不同的 dNTPs 浓度(0.15、0.25、0.35、0.45 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)进行比较研究。结果表明, dNTPs 浓度为 0.15、0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增谱带不明显, 当 dNTPs 浓度为 0.35 和 0.45 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增产物条带清晰。

2.2.3 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 扩增的影响 反应体系中的离子强度, 尤其是 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 反应的特异性和扩增效率都有影响。在其他反应条件一定的情况下, 设计了 Mg^{2+} 浓度为 0.5、1.0、1.5 和 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个梯度。结果表明, 当 Mg^{2+} 浓度小于 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增条带减少, 而 Mg^{2+} 浓度为 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 得到理想的扩增产物, 即条带清晰。

2.2.4 引物浓度对 RAPD 扩增的影响 引物浓度过低时, 与模板的结合几率降低, 扩增到的片断数量少, 在琼脂糖凝胶电泳上无法检测到, 引物浓度过高时, 引起错配和非特异性扩增, 并且可增加引物之间形成二聚体或多聚体的机会, 使其特异性表达下降。为此设计了 0.15、0.25、0.30 和 0.35 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个浓度梯度的引物浓度。结果表明: 在 0.30、0.35 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间都可扩增出条带, 且带型清晰, 但引物浓度较小(小于 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, 出现弥散现象; 所以引物浓度 0.30、0.35 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜。

最后综合考虑各个因素对 RAPD 反应的影响, 确定为如下方案: 采用 25 μL 的反应体系: 2 μL 的 10 \times buffer; 0.45 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTPs; 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Mg^{2+} ; 2U 的 TagDNA 聚合酶(TaKaRa); 0.30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物(上海生工); 40 ng 的模版。由于反应体系的一致性对于 RAPD 来说极为重要, 一旦反应体系确定了就不要轻易改变, 否则可能造成某些非特异性 DNA 扩增。

2.3 不同花色的 RAPD 扩增结果

通过 60 个随机引物对供试材料进行的 PCR 扩增, 共筛选出 12 个引物, 对 4 个不同花色的一串红进行 RAPD 分析, 得到了稳定性好、条带清晰、具有多态性的谱带, 扩增片段的大小在 150 ~ 2 000 bp 之间。12 个引物的序列及有关扩增情况见表 1。

由表 1 可以看出, 12 个特异引物对 4 个花色扩增出 84 条带, 平均每个引物可获得扩增带 7 条, 最少的也可扩增 5 条带, 最多的达 10 条, 具有特异性的谱带为 28 条, 占总带数的 33%。其中引物 L1 的扩增结果见图 1。

表 1 RAPD 分析所用的引物序列及扩增谱带			
引物	引物序列	每个引物 扩增带数	具有多态 性的带数
L01	5'-GGCATGACCT-3'	8	3
L04	5'-GACTGCACAC-3'	6	4
L07	5'-AGGCGGGAAC-3'	8	4
L11	5'-ACGATGAGCC-3'	7	2
L12	5'-GGGCGGTACT-3'	6	4
L13	5'-ACCGCCTGCT-3'	5	2
L14	5'-GTGACAGGCT-3'	8	1
O02	5'-ACGTAGCGTC-3'	6	3
F3	5'-CCTGATCACC-3'	10	3
A05	5'-AGGGTCTTG-3'	8	2
P1	5'-GTAGCACTCC-3'	7	0
G4	5'-AGCGTGTCTG-3'	5	0
总计		84	28

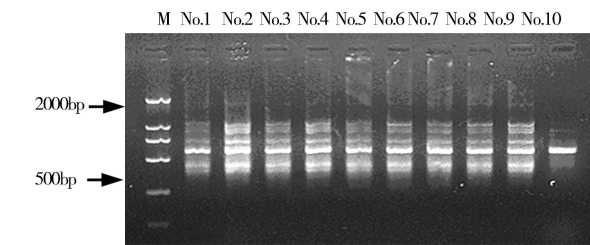


图 1 引物 L1 对白色一串红 10 个个体的扩增结果
M 是 Marker(DL2000)

2.4 数据的聚类结果

用 12 个引物对 4 种花色的一串红材料基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增的结果转化成 1、0 数据,采用欧几里德统计量(见表 2),通过 SPSS 软件数据处理系统,进行聚类分析,得到树状聚类图(见图 2)。

颜色	欧几里德距离			
	紫色	红色	红白相间	白色
紫色	0			
红色	7.105	0		
红白相间	7.496	6.61	0	
白色	11.912	12.640	9.878	0

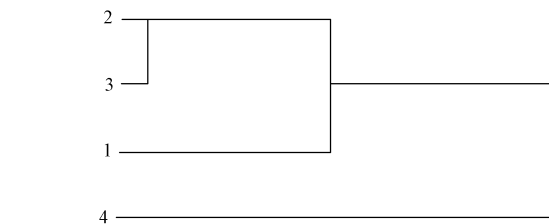


图 2 根据欧几里德距离做的 4 种花色一串红聚类图
1. 紫色一串红; 2. 红色一串红; 3. 红白相间一串红; 4. 白色一串红

从一串红 4 种花色聚类图(见图 2)分析可知,可把 4 种花色一串红划分为两大类:首先是红色和红白双色聚为一类,然后和紫色聚在一起。白色单独为一类。从这种划分中我们可以看出,红色和红

白双色亲缘关系较近,紫色距离红色亲缘关系较近,而白色一串红和其他花色关系较远,但与红白双色的距离较近。

3 讨论

RAPD 可鉴别形态学上难以区分的品种乃至株系,更有利于生物种以下分类单元的鉴定区分,以科学地阐明其遗传进化关系。在观赏植物方面,戴思兰等^[2]对菊属,陈新露等^[3]对丁香,梁红健等^[4]对兰花,赵祥云等^[5]对百合的遗传关系进行了分析。汪小全等^[6]用 RAPD 方法研究了乌头属、升麻属与类叶升麻属植物的亲缘关系,结果与经典分类学结果基本吻合。此外,陈向明等^[7]用 RAPD-PCR 技术对 7 个花色 35 个牡丹品种,曹雅男等^[8]对正品龙胆遗传多样性等都作了相关分析,并得到较好的效果。以上说明, RAPD 技术已广泛应用于种内不同种群间亲缘关系的研究,且其聚类结果与经典分类学方法基本吻合;在种间或近缘属间关系的研究中已显示一定的潜力。

在一串红的 RAPD 的研究中,通过聚类图可把 4 种花色一串红划分为两大类:首先是红色和红白双色聚为一类,然后和紫色聚在一起。白色单独为一类。从这种划分中我们可以看出,红色和红白双色亲缘关系较近,紫色距离红色亲缘关系较近,而白色一串红和其他花色关系较远,但与红白双色的距离较近。花色上 RAPD 的聚类结果与孢粉学分类结果大致相同(另有报道),因此 RAPD 和孢粉学结合起来可作为一串红亲缘关系鉴定的一种有效手段。

参考文献:

[1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. 18 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acid res. 1990; 65:1 6534.

[2] 戴思兰, 李文彬. DNA 提纯方法对 9 种菊属植物 RAPD 的影响[J]. 园艺学报, 1996, 23(2): 169 174.

[3] 陈新露, 赵祥云. 应用 RAPD 技术评价丁香品种间遗传关系[J]. 园艺学报, 1995(4): 235 239.

[4] 梁红健, 李文彬. 中国部分兰花品种 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 1996, 23(4): 265 370.

[5] 赵祥云, 张云芳. 用 RAPD 标记评价百合品种间的遗传关系[J]. 北京农学院学报, 1995, 10(2): 58 63.

[6] 汪小茎, 邹喻平, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954 962.

[7] 陈向明, 郑国生, 孟丽. 不同花色牡丹品种亲缘关系的 RAPD-PCR 分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(5): 546 555.

[8] 曹雅男, 李庆章, 孙岳, 等. 正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析[J]. 中草药, 2005, 36(1): 100 103.