

文章编号: 1000-5692(2002)03-0240-04

锥栗不同品种遗传距离的 RAPD 分析

雷日平¹, 陈 辉², 谢利国³

(1. 浙江林学院 科研处, 浙江 临安 311300; 2. 福建农林大学 作物学院 福建 福州 353000; 3. 浙江省泰顺县乌岩岭自然保护区, 浙江 泰顺 325500)

摘要: 运用 RAPD 法对不同锥栗品种间基于 DNA 基础上的遗传距离进行了研究, 建立了锥栗 PCR 反应的标准程序, 得到的扩增片段大小在 500~2 000 bp 之间, 确定了 10 个品种基于 DNA 分子水平上的相似系数。当相似系数等于 0.74 时, 可把这 10 个品种分为 4 类, 即“油栗仔, 蔓榛, 中尖嘴, 猴嘴榛”“红紫榛, 大尖嘴, 材榛”“仁嘴栗, 乌榛”和“嫁接毛榛”。图 2 表 2 参 6

关键词: 锥栗; 随机扩增多态性 DNA; 遗传距离

中图分类号: S664.2; Q943.2 **文献标识码:** A

锥栗 *Castanea henryi* 是我国南方栽培驯化最早利用最久的经济林树种之一, 坚果营养丰富, 果肉含有大量淀粉、蛋白质、脂肪和水溶性糖, 是优良的食用干果类树种^[1]。福建是锥栗的重要主产区之一, 品种资源丰富, 嫁接栽培历史悠久, 但由于长期沿袭传统经验, 嫁接育苗完全是混合采穗, 这样长期多品种自由授粉, 产生遗传多样性, 类型很多, 良莠不齐, 产量高低悬殊。传统的经济林品种特性分析研究主要从其生物学特性方面入手, 采用植物学及生物学特性描述的方法进行, 对于标准化, 其中又主要以花序、总苞和坚果的形态学为依据。由于锥栗结实周期长, 品种的早期鉴定只能依据形态特征的差异, 难以确切区分和鉴定品种。RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, 即随机扩增多态性 DNA) 技术是 20 世纪 90 年代由 Williams 和 Welsh 等在 PCR (Polymerase Chain Peaction) 的基础上共同发明的一项分子标记技术, 具有简单、快速、准确、灵敏度高和多态性丰富等优点, 现已广泛应用于很多植物种类的遗传图谱构建和基因定位, 特别是遗传多样性检测, 如用于杨、柳等树种取得了很好的效果^[2-5]。本文是用此技术分析锥栗品种间遗传距离的报道。

1 材料和方法

1.1 品种来源

供试的锥栗品种来源于福建省建瓯市水源乡的锥栗采穗圃。采集 10 个锥栗品种的新鲜叶片各 5~10 g, 用冰保存, 使它们保持新鲜状态备用。样品编号和名称如下: 1 为油栗仔, 2 为红紫榛, 3 为蔓榛, 4 为中尖嘴, 5 为仁嘴栗, 6 为大尖嘴, 7 为乌榛, 8 为材榛, 9 为猴嘴榛, 10 为嫁接毛榛。

1.2 基因组 DNA 的提取及纯化

基因组 DNA 的提取及纯化用 SDS 法: ①取 5 g 鲜叶片, 加入 50.0 g·kg⁻¹ 的聚乙烯吡咯烷酮, 液氮磨碎, 转移到 50 mL 的离心管中, 加入 15 mL 经预加热到 65 °C 的 SDS 缓冲液。②经 65 °C 水浴 20~30 min 后加入 5 mL 5mol·L⁻¹ 的醋酸钾溶液, 冰浴 20~30 min, 再加入 5 mL 氯仿, 混匀。③4 °C, 2 500 g 离心 20 min 后, 用 2 层无菌纱布过滤到一新的 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 异丙醇, -20 °C 放置 40 min 沉淀核酸。④4 °C, 2 500 g 离心 10 min, 去上清, 晾干沉淀 5 min, 加入 700 μL 50×TE 缓冲液溶

收稿日期: 2001-03-10; 修回日期: 2002-06-03

解沉淀并转移至一新的 Eppendorf 管中。⑤加入 75 μL Rnase A 酶贮液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 再加入 75 μL 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的醋酸钾, 轻弹混匀, 离心 15 min 沉淀不溶性杂质, 然后将上清转移至装有 500 μL 异丙醇的干净 Eppendorf 管中, 轻轻混匀, 室温下放置 5 min。⑥2 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 分离出沉淀, 加 70% 乙醇清洗沉淀 3 次, 晾干, 加 1 \times TE200 μL 溶解沉淀, 即得 DNA 溶液, 待测定纯度、浓度和质量^[9]。

1.3 PCR 扩增及电泳测定

DNA 扩增在美国 PE 公司生产的 PE-9600 型 PCR 仪上进行。扩增随机引物用上海 Sangon 的 S1~S100 系列引物 100 条。扩增反应用 20 μL 反应体系。其中包含以下的成分: 10 \times PCR buffer 2 μL , 25 mM MgCl_2 1.6 μL , 5 $\text{u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA 聚合酶 0.3 μL (上海 Sangon), dNTP Mix (dATP dGTP dCTP dTTP 10 $\text{m}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 每种) 0.3 μL , 1 μL 模板 (20~50 ng), 1.5 μL 10 碱基随机引物, dd H_2O 13.3 μL 。扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 随后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 进行 38 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min。PCR 结束后, 在扩增产物中加入 4 μL 6 \times 的溴酚蓝上样液, 取 6 μL 产物经含有 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上用 5 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 的电场强度电泳 2.0~2.5 h, 在紫外凝胶扫描仪上观察并照相。

1.4 数据分析

采用 Bio D++ 软件分析品种扩增后 DNA 的多态性。扩增电泳胶 DNA 片段电泳带出现为“1”, 不出现为“0”来划分。特征状态 (出现/不出现) 矩阵用 Nei and Li (也叫 Dice) 相似系数转换, Nei and Li 系数计 2 个样品间共有带的数量:

$$\text{Dice} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)。$$

其中: N_{xy} 为 2 个样品间共有带的数量, n_x 和 n_y 分别为每个样品各自带的数量。

2 结果与分析

2.1 Mg^{2+} 浓度与退火温度的确定

PCR 扩增反应能否成功, 受多方面条件的影响, 其中最主要的因素有 2 个: Mg^{2+} 浓度和退火温度。 Mg^{2+} 浓度与 Taq 酶的活性有很大关系, Mg^{2+} 过高会导致非特异性扩增, 过低则扩增产物太少, 甚至导致失败。退火温度也是扩增成败的重要因素。研究了 Mg^{2+} 与退火温度的交互影响, Mg^{2+} 设 5 个水平, 浓度分别为 1.50, 1.75, 2.25 和 2.50 $\text{m}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, dd H_2O 的成分根据 Mg^{2+} 作相应调整, 其余成分不变。退火温度设 4 个水平, 分别为 34 $^{\circ}\text{C}$, 36 $^{\circ}\text{C}$, 38 $^{\circ}\text{C}$ 和 40 $^{\circ}\text{C}$, 采用完全试验设计。结果表明: 36 $^{\circ}\text{C}$ 退火, 2.0 $\text{m}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mg^{2+} 扩增效果最好。

2.2 引物筛选

研究采用上海 Sangon 生产的 0.2 OD/each primer 共 100 条引物进行初步筛选, 筛选引物应用油栗仔模板, 应用优化后的 PCR 条件进行扩增, 结果 100 条引物中有 27 条可以扩增出条带, 用能扩增出带的引物分别扩增模板, 22 条引物可扩增出良好稳定的 500~2 000 bp 大小的片段。引物名称及序列见表 1。用引物 S74 扩增 10 个品种的电泳图如图 1。引物 S96 扩增得到的扩增片段大小如表 2。

表 1 PCR 扩增出稳定多态性引物名称及序列

Table 2 Primer and sequence of PCR amplified stable polymorphic DNA

名称	序列 5'-3'	名称	序列 5'-3'	名称	序列 5'-3'
S5	TGCGCCCTTC	S17	AGGGAACGAG	S23	AGTCAGCCAC
S28	GTCACGTAGG	S55	CATCCGTGCT	S56	AGGGCGTAAG
S62	GTCAGGCGTC	S64	CCGCATCTAC	S65	GATGACCGCC
S66	GAACGGACTC	S67	GTCCCGACGA	S69	CTCACCCTCC
S70	TGTCCTGGTG	S71	AAAGCTGCCG	S72	TGTCATCCCC
S73	AAGCCTCGTC	S74	TGCGTGCTTG	S90	AGGGCGTCT
S93	CTCTCCGCCA	S96	AGCGTCTCTCC	S97	ACGACCGACA
S98	GGCTCATGTG				

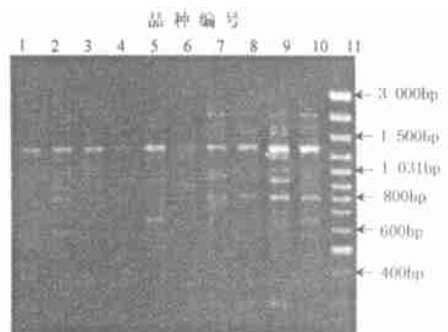


图 1 不同品种 RAPD 扩增图谱 (引物 S74) 1~10 分别为 10 个样品, 11 为 Marker

Figure 1 Electrophoresis figure of DNA 1~10 amplified by primer S74 1~10 Sample, 11 Marker

从表2可以看出,引物 S96 对各个品种扩增出 6~9 个片段,片段大小在 300~1 700 bp 之间,而且各个品种的扩增多态性也比较丰富。本次研究用以标记分类研究的 22 条引物都可以扩增出丰富的多态性。

2.3 相似系数分析

根据 DNA 随机扩增结果的多态性谱型分析数据,用 Bio D++ For Windows 软件包,

计算基于品种间的 Dice 相似系数,结果见相似系数矩阵 X_{ij} 。根据相似系数矩阵构建品种间的 UPGMA 系统分类树,如图 2。

表 2 引物 S96 扩增模板各品种片段大小

Table 2 Fragment size of *Castanea henryi* variances DNA amplified by primer S96 kbp

编号	1	3	3	4	5	6	7	8	9	10	Marker
1	1.136	1.479	1.586	1.168	0.878	1.715	1.819	1.749	1.236	1.719	3.000
2	0.947	1.136	1.168	0.995	0.718	1.272	1.013	1.274	1.031	1.218	2.000
3	0.822	0.959	0.995	0.866	0.633	0.923	0.912	1.007	0.900	0.983	1.500
4	0.680	0.889	0.844	0.700	0.549	0.666	0.758	0.889	0.728	0.878	1.200
5	0.607	0.693	0.709	0.633	0.506	0.575	0.653	0.747	0.646	0.737	1.031
6	0.525	0.613	0.626	0.549	0.420	0.442	0.568	0.653	0.562	0.646	0.900
7	0.400	0.405	0.543	0.420	0.315		0.431	0.568	0.431	0.562	0.800
8		0.307	0.415				0.330	0.431		0.500	0.700
9								0.326		0.426	0.600
10											0.500
11											0.400
12											0.300
13											0.200
14											0.100

$$X_{ij} = \begin{pmatrix} 0.76 & & & & & & & & & & & \\ 0.78 & 0.82 & & & & & & & & & & \\ 0.81 & 0.77 & 0.83 & & & & & & & & & \\ 0.72 & 0.73 & 0.78 & 0.75 & & & & & & & & \\ 0.69 & 0.83 & 0.76 & 0.78 & 0.69 & & & & & & & \\ 0.67 & 0.61 & 0.68 & 0.73 & 0.78 & 0.64 & & & & & & \\ 0.75 & 0.80 & 0.80 & 0.81 & 0.74 & 0.80 & 0.69 & & & & & \\ 0.76 & 0.72 & 0.75 & 0.82 & 0.76 & 0.75 & 0.72 & 0.77 & & & & \\ 0.71 & 0.68 & 0.73 & 0.76 & 0.72 & 0.69 & 0.74 & 0.73 & 0.71 & & & \end{pmatrix}$$

其中: $i=1, 2, \dots, 9; j=2, 3, \dots, 10$ 。

当相似系数 $X=0.74$ 处开始分类,则可以吧 10 个锥栗品种分为 4 类,它们分别为 (1, 3, 4, 9), (2, 6, 8), (5, 7) 和 (10)。

3 讨论

锥栗品种传统分类方法基于植物学特征、生物学特征和经济性状的描述,其中主要以花序、总苞和坚果的形态为依据。由于锥栗结实周期长,一方面,在早期依据形态特征的差异难以确切地区分和鉴定品种;另一方面,相似品种形态特性易受环境条件的影响。运用 RAPD 法对锥栗品种特征进行研究具有快速便捷的特点,其方法和结果对植物种质资源遗传多样性的分析、植物新品种注册、保护、利用和检验具有理论意义和实践价值。

锥栗是重要的经济林树种,经长期的自然选择和人工栽培,已选育出了几十个具有经济性状的品种。但是,针对目前经济价值的栽培品种管理不严的现状,亟待进一步完善我国新品种登记、保护、管理和利用的有关法规,建立相应的技术标准。新品种审定和登记时,不仅审定新品种的植物学性状和经济性状,同时应该审定并建立新品种的 DNA 指纹库。本研究对进行这方面的研究具有很好的参考价值。

RAPD 分析是以基因组 DNA 随机位点的差异为基础的,而品种的具体特性与它的生物学、植物学和生态学特性相联系。本研究仅就福建省建瓯市的主栽锥栗品种进行了分析,由于受供研究锥栗品种

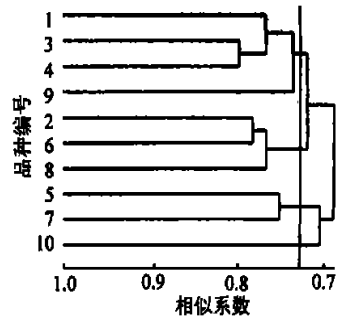


图 2 RAPD 分析各品种的分类树状图

Figure 2 Dendrogram figure of RAPD class

数量的限制, 所以难以对 DNA 的多态性与品种的生长结果的相关性作进一步的分析, 对于品种遗传变异规律及其与品种的优劣特性需进一步研究。

必须指出, 分子生物学方法在物种亲缘关系研究中虽有它独到的优点, 但并不能完全取代形态学分析方法, 尤其是 RAPD 法有它不是十分稳定的不足之处, 容易受多方面条件的影响, 特别是 Taq DNA 聚合酶对它的影响较大, 这方面的不足之处有待进一步克服, 但只要条件比较稳定, 它的重复性还是比较好的。对形态相近的分类单元, 应用分子标记方法分类十分有效。本研究运用 RAPD 法研究锥栗品种之间的差异就取得了满意的结果, 运用筛选的引物完全区分了 10 个品种, 得到了它们的指纹图。对于形态差异明显的分类单元, 采用形态学方法更为简便。

致谢: 本研究实验在福建农林大学甘蔗研究所进行, 得到了他们全体师生的帮助。本文出版得到了浙江林学院科研发展基金资助。谨此致谢。

参考文献:

- [1] 陈辉. 锥栗人工林生态培育[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000. 98—106.
- [2] 梁月荣, 田中淳一, 武田善行. 茶树品种资源遗传多态性 RAPD 分析[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17(2): 215—218.
- [3] 苏晓华. 用 RAPD 技术估测柳树树种及无性系的变异[J]. 林业科学, 1995, 31(3): 211—213.
- [4] 田呈明, 康振生, 李振岐, 等. 落叶松—杨栅锈菌遗传分化的 RAPD 分析[J]. 林业科学[J], 2000, 36(5): 54—58.
- [5] 魏伟, 王洪新, 胡志昂, 等. 毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究: RAPD 证据[J]. 生态学报, 1999, 19(1): 16—22.
- [6] 胡志昂, 恽锐, 钟敏, 等. 检测植物 DNA 扩增多态性方法的比较和改进[J]. 植物学报, 1997, 39(2): 144—148.

Analysis of the genetic distance of *Castanea henryi* with RAPD markers

LEI Ri-ping¹, CHEN Hui², XIE Li-guo³

(1. Science and Technology Office, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Crop Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 353000, Fujian, China; 3. Nature Reserve of Wuyanling, Taishun 325500, Zhejiang, China)

Abstract: The genetic distance of 10 *Castanea henryi* variances is studied by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers in the paper. The RAPD standard procedure is established, too. The length of amplified fragment is between 500~2 000 bp after PCR (Polymerase Chain Reaction); and similar coefficient on the level of DNA molecule is carried out, when the coefficient is 0.74, 10 variances is divided into four classes, that is, "You Lizi, Man Zhen, Zhong Jianzui, Hou Zuizhen", "Hong Zizhen, Da Jianzui, Cai Zhen", "Ren Zuili, Wu Zhen", and "Jiajie Maozhen".

Key words: *Castanea henryi*; random amplified polymorphic DNA; genetic distance