

云南茶树 DNA 提取和 RAPD 分子标记初探*

高峻 蔡新 许明辉

(云南农业大学农业科学技术学院,昆明 650201)

摘要:以宜良宝洪茶、莽水大叶原头茶、波上金苔、云抗 10 号 4 个云南茶树品种为材料,对其 DNA 提取和 RAPD 分子标记方法进行了研究。结果表明:所采用的经改进的 CTAB DNA 微量提取法,可以得到高质量的茶树 DNA,分子量大于 21 kb,可满足 RAPD 扩增;用 18 个不同的随机引物对所提取的 4 个品种基因组 DNA 进行了 RAPD 分子标记分析,其中 3 个(占 16.67%)引物在茶树品种间可扩增出多态性产物。建立了云南茶树 DNA 微量、快速提取和 RAPD 标记的分析程序,为 RAPD 分析应用于云南茶树遗传研究打下了良好的基础。

关键词:茶树;DNA 提取;RAPD

中图分类号: S 571.1.035.3(274)

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X(2000)02-0126-03

云南是茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze]的原产地,茶树种质资源的数量和质量在世界上占有绝对优势。对于茶树种质资源的研究,多年来前人已经在属、种、品种的分类、定名以及在细胞遗传学^[1]等方面做了许多的工作。但由于茶树为多年生异花授粉作物,栽培变异性大,而常规的遗传研究又主要依据植物学性状、生理生化性状分析,这种常规的研究方法周期长,工作量大,选择和分析位点有限、准确性低、可信度小,说服力不强。致使在云南茶树种质资源的研究上,难免存在一些混淆的问题,限制了云南丰富茶树种质资源的开发和利用。近年来,随着分子生物学的发展,分子标记技术已被广泛应用于作物遗传研究。其中 RAPD 分子标记由于检测涉及整个基因组,位点多,且简便、快捷、灵敏,不受取材和环境条件的影响、成本低等特点,而被广泛用于生命科学的遗传研究领域。RAPD 技术在茶树遗传多样性、亲缘关系分析已有一些报道^[2,3,4,5,6,7],表明了该技术在茶树遗传研究上的应用潜力。但至今尚未见以云南茶树品种为材料,用 RAPD 对其遗传多样性等方面进行研究的报道。因此,为进一步研究和开发利用云南丰富的茶树种质资源,探索微量、快速

且适用于大批量样品提取茶树 DNA 的方法,并检验提取 DNA 进行 RAPD 分析的可行性,为开展云南茶树种质资源的遗传多样性研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为云南 4 个茶树品种:宜良宝洪茶、莽水大叶原头茶、波上原苔、云抗 10 号,取其夏梢上新鲜的嫩叶、嫩茎用于 DNA 的提取。

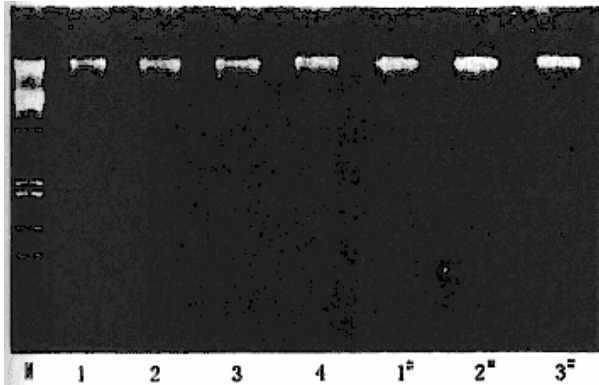
1.2 DNA 的提取

基因组 DNA 提取参考 CTAB 法并加以改进,试剂均为国产分析纯。取 0.1 g 茶树夏梢上的嫩叶或嫩茎,置于 1.5 mL 离心管中用小手术剪尽量剪碎,加 0.7 mL 55℃ 预热的 DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA-Na₂, 100 mmol/L NaCl, 2% 巯基乙醇, 2% CTAB)在 55℃ 培养箱中温育 2 h,其间颠倒数次,加入 0.7 mL 饱和酚,在自制的混匀器(1~2 r/min)上混匀抽提 2 h, 5 000 r/min 下离心 7 min,将上清液转至另一新管中,加 0.35 mL 饱和酚和 0.35 mL 氯仿-异戊醇(24:1)抽提 2 h, 5 000 r/min 下离心 7 min,将上清液转至另一新管中,加 0.7 mL 氯仿-异戊醇(24:

* 收稿日期: 1999-12-05

作者简介:高峻(1968-),男,云南勐海人,实验师,主要从事茶树生理生态及良种繁育的研究。

1)抽提 30 min, 5 000 r/min 下离心 7 min, 取上清液加入 0.7 mL 3 mol/L NaAc 和 0.63 mL 异丙醇, 室温下沉淀 DNA, 60 min 后在 3 000 r/min 离心 5 min, 弃除上清液, 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2~3 次, 37℃ 培养箱中干燥, 用 100 μ L TE 溶解。用 1.2% 琼脂糖电泳检测。



M 分子量标记; 1 宜良宝洪茶; 2 莽木大叶原头茶; 3 波上金苔; 4 云抗 10 号, # 表示以嫩茎为材料

图 1 基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Fig. 1 Analysis of DNAs by agarose gel electrophoresis

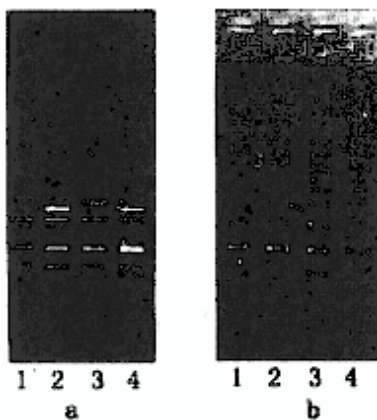


图 2 基因组 DNA 的随机扩增图谱

a 引物 OPB-14; b 引物 OPC-16 样品

Fig. 2 Random Amplified Polymorphic DNAs

1.3 DNA 扩增及琼脂糖电泳

DNA 扩增在美国 PE 公司生产的 480 型 DNA 扩增仪上进行。所用十聚体引物由 OPERON 公司生产, Taq 酶和其余试剂为华美生物工程公司生产。反应液体积 25 μ L, 其中包含 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L 的每种 dNTP, 4 mg/mL BSA, 25 ng 的基因组 DNA, 2.5 单位 Taq 酶, 反应液用适量石蜡油覆盖。每个反应 35 个循环, 每个循环 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 进入循环前

94℃ 预变性 3 min, 循环结束后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物在 0.5 \times TBE 缓冲系统下用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 电泳完毕溴化乙锭染色后在紫外台上照像。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

研究所用 DNA 提取法取样量少, 不用液氮、不需研磨, 只用小手术剪在离心管中剪碎样品即可, 但均可以得到质量较高的 DNA (如图 1)。图 1 中每个样品 (嫩叶或嫩茎) 基因组 DNA 带仅一条, 分子量大于 21 kb。

2.2 RAPD 标记

用 18 个不同的随机引物对 4 个茶树基因组进行了扩增试验, 发现所有引物都能扩增出产物, 其中 3 个 (占 16.67%) 引物的扩增产物在品种间具有多态性 (如图 2), 且重复性好。可见, 采用改进的微量快速 DNA 提取法提取的 DNA 符合 RAPD 分析的要求, 此分析程序可用作茶树遗传多样性、品种鉴定、亲缘关系与系统发育等方面研究。

3 讨论

与提取其它作物基因组 DNA 相比, 茶树的幼嫩新梢中由于含有大量的茶多酚等次生物 (尤其在夏梢中的含量最高), 会严重影响提取 DNA 的质量, 因此为了获得高质量的茶树基因组 DNA, 满足对其遗传多样性研究的需要, 需对茶树基因组 DNA 的提取方法进行研究。试验所采用的提取法, 实践证明可以获得高质量的 DNA, 完全可以满足 RAPD 分析的要求。并且此提取茶树 DNA 的方法与其他学者进行茶树 DNA 提取法相比具有如下特点: (1) 取样简单且量少; (2) 不用液氮、不需研磨, 只用小手术剪剪碎样品即可, 该样品处理方法既简化了分析程序, 又避免了研磨样品交叉污染现象; (3) 适于大批量样品 DNA 的快速提取。

在通过反复试验而建立的 RAPD 反应系统中, 用的 Operon 公司的 18 个不同随机引物均可以对云南茶树品种基因组进行扩增, 其中 3 个 (占 16.67%) 可以扩增出多态性产物, 这为 RAPD 技术应用于云南茶树遗传研究提供了可行性。

参 考 文 献

1 云南省茶科所资源课题组. 云南茶树优质资源综合性状

- 评价[J]. 云南茶叶, 1996, (3~4): 25~29
- 2 李善河. Identification of Korean wild tea plants and Japanese green tea cultivars using RAPD markers [J]. J. kor. Tea soc, 1995, 1(1): 129-148
- 3 田中淳一. 用 RAPD 法鉴定茶树品种亲子关系[J]. 野菜·茶研究报告, 1996, 13(9): 31~36
- 4 Wachira F N. Genetic diversity in tea revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers [J]. Tea, 1996, 12(2): 60-68
- 5 陈亮. 茶树基因组 DNA 提纯与鉴定 [J]. 茶叶科学, 1997, 17(2): 177~181
- 6 陈亮. 茶树 RAPD 反应系统和扩增程序优化 [J]. 茶叶科学, 1998, 18(1): 16~20
- 7 陈亮. 15 个茶树品种遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 茶叶科学, 1998, 18(1): 21~27

Tea Plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] from Yunnan

Gao Jun Cai Xin Xu Minghui

(Faculty of Agricultural Science and Technology, Y A U, Kunming 650201)

Abstract In this paper, a method of isolating DNA and RAPD was studied by 4 tea cultivars from Yunnan. The results showed that the good quality DNA of tea plant was gained by the isolating method and the length of DNA fragment was more than 21 kb. The isolated DNA could be used for RAPD analyses; RAPD markers with 18 random primers examined 4 tea cultivars from Yunnan, and 3 of 18 primers reveal polymorphisms among tea cultivars. This RAPD analysis procedure in this experiment lays a good foundation for application of RAPD in tea plant genetic research in Yunnan.

Key words Tea plant; DNA isolation; RAPD

=====

(上接第 121 页)

Original Report on Effect of Applications of Cucumber with Plant Foliar Nutrient Solution AMC and ARC

Wu Hua Lin Jiabao Sheng Mingquan Wang Yueding

(Shanghai Jiao Tong University Agricultural College, Shanghai 201101)

Abstract A comparative study was done by spraying various kinds of foliar nutrient solutions, including AMC and ARC prepared by Shanghai Jiao Tong University Agricultural College, on cucumbers. The results proved that all those foliar nutrient solutions had improved cucumbers vegetation and enhanced their fruit-bearing, meanwhile raising their yield and increasing their Vc content. Interms of total effects those foliar nutrient solutions used in the experiment can be arranged like this: AMC > 2003 > ARC > F. G > TianYuan.

Key words Foliar nutrient solution; AMC; ARC; Yield; Quality