

果桑组培继代过程中的 RAPD 分析

刘健¹, 于元杰² (1. 滨州职业学院, 山东滨州 256624; 2. 山东农业大学, 山东泰安 271000)

摘要 以果桑为材料, 对其进行组织培养, 利用 RAPD 技术对 10 次继代材料进行分析和聚类, 它们的遗传距离在 0.001~0.243, 平均值为 0.122。研究表明, 继代次数越多, 各代之间的遗传差异越大, 且各个群间已经产生了遗传变异。

关键词 果桑; 组织培养; RAPD; 遗传距离; 变异

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)05-01310-02

RAPD Analysis of Fruit Mulberry in Tissue Culture

LIU Jian et al (Binzhou Vocational College, Binzhou, Shandong 256624)

Abstract Tissue culture of fruit mulberry was studied. Plant materials of 10 times subculture were analyzed and clustered by RAPD. Among them, the genetic distance was between 0.001 and 0.243, and the average value was 0.122. Results showed that the more times of subculture, the bigger genetic differences in every generation. And genetic variation appeared in every cluster.

Key words Fruit mulberry; Tissue culture; RAPD; Genetic distance; Variation

1 材料与方法

1.1 材料与取样 材料取自山东省滨州职业学院组培中心。取果桑组培苗的叶片、芽。在连续继代 1~10 次的材料中, 每代随机取样, 叶片均采自中部。每代材料取 2 个样品, 分别编 1~20 号。用去离子水冲洗附着于叶片上的杂质, 用清洁的吸水纸吸干水分后备用。

1.2 DNA 的提取 采用 CTAB 法 (Doyle et al. 1987)。

CTAB 法 DNA 提取液: 浓度 100 mmol/L Tris (pH 8.0), 浓度 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 浓度 1.4 mmol/L NaCl, 浓度 1% CTAB, 浓度 5% 聚乙炔吡咯烷酮 (PVP), 浓度 350 mmol/L β -mercaptoethanol 溶液。具体配制如下: 在 600 ml 水中加入 10 g CTAB, 50 g PVP, 81.816 g NaCl, 7.444 g EDTA, 12.114 g Tris, 调节 pH 至 8.0, 定容至 1 L。使用时加入 27.335 g 巯基乙醇。

由于叶片中多酚类物质及多糖的干扰, 提取时需加入 PVP。将 1 g 左右叶样放入 -20℃ 预冷的研钵中, 迅速加入液氮研磨成粉, 装入加有 2 倍体积已预热至 60℃ 的 CTAB (浓度 2% CTAB, 浓度 1.4 mol/L NaCl, 浓度 0.02 mmol/L EDTA, 浓度 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 值 8.0) 和巯基乙醇 (体积比为 0.296) 的 7 ml 离心管中, 轻轻颠倒混匀。

60℃ 水浴保温 45 min, 加等体积氯仿:异戊醇 (体积比为 24:1), 颠倒混匀, 室温下, 5 000 r/min 离心 8 min, 上清液加 2/3 体积的预冷异丙醇, -20℃ 下放置 2~4 h; 10 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀中加入 TE (浓度 10 mmol/L Tris-HCl, 浓度 1 mmol/L EDTA) 溶解, 再加入 1/10 体积的浓度 3 mol/L 醋酸钠溶液和 3 倍体积的预冷无水乙醇, -20℃ 过夜; 次日, 10 000 r/min 4℃ 离心 10 min; 沉淀用浓度 75% 乙醇洗涤 2 次, 自然干燥, 沉淀溶于适量 TE 溶液中。

取上述总 DNA 粗提取物 10 ml 放入离心管中, 加入 1 μ l RNAase (1 mg/ml) 37℃ 消化 2 h, 再加入等体积酚:氯仿:异戊醇 (体积比为 25:24:1), 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液反复抽提至界面无蛋白质。

上清液用氯仿:异戊醇 (体积比为 24:1) 抽提 2 次, 加入 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 过夜。次日 10 000 r/min 4℃ 离心

10 min, 浓度 75% 乙醇洗涤沉淀, 干燥, 沉淀用适量 TE 溶解。用电泳法测定提取的 DNA 浓度和纯度, 余下的转入 -20℃ 储存备用。

1.3 PCR 扩增 PCR 引物的筛选直接影响分析结果的重复性、可靠性和准确性。因而筛选出有效引物对 RAPD 分析是至关重要的。筛选的引物一般要求: 扩增带型清晰、反应稳定并具有良好的重复性。

供筛选的 RAPD 引物有 100 条, 该试验 RAPD 引物编号 s1~100。筛选条件为: ①条带清晰、不弥散、不模糊; ②所有样品均为质量好的带; ③条带重复性好。最后筛选出 20 个引物进行正式试验分析。

RAPD 扩增反应用薄壁管在 PCR 扩增仪上进行。采用总体积 20 μ l: 25 ng 模板 DNA, 引物 2 μ l (浓度为 50 ng/ μ l), 1 单位 Tag 聚合酶, 10 倍反应缓冲液 2 μ l, dNTP 2 μ l (其中含 dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各 200 μ mol/L), 2 μ l MgCl₂ (终浓度为 2.5 mmol/L), 用纯水补充至 20 μ l。充分混匀后加一滴矿物油即进行扩增反应。

反应程序为: 95℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 40℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 38 个循环后, 72℃ 延伸 8 min, 最后在 4℃ 保存。

1.4 RAPD-PCR 反应产物检测 RAPD-PCR 反应结束后, 扩增产物用含 0.2% 溴化乙锭的 0.8% 琼脂糖凝胶, 以 1xTBE 缓冲液为介质电泳分离。电泳结果用南京 JD 摄像系统在紫外光下照像记录。

1.5 扩增产物分析 为了便于 RAPD 资料的收集及计算分析, 需将 RAPD 标记分析的结果 (即谱带) 转换成数字形式。对于 RAPD 标记, 只记录那些具有多态的谱带。记录时, RAPD 标记利用所用的引物名称加扩增谱带的碱基长度表示。

在进行分离谱带判读时, 有谱带且清晰记录为 "1", 确定无谱带记录为 "0", 模糊不清或无扩增产物即缺失时记录为 "1"。按 Nei 等的方法计算样品间的遗传相似系数 I : $I = 2X_{m_x m_y} / (m_x + m_y)$ 。其中, m_x 、 m_y 为 2 个样品间各自的总扩增带数, m_{xy} 为 2 个样品间共有的扩增条带数。根据 I , 求出样品间的遗传距离 $D = -\ln I$ 。两个亲缘关系越近的居群, 在所有的位点上的等位基因频率越相近, 遗传相似系数越接近 1; 亲缘关系越远的居群, 在所有的位点上所有的等位基因频率差别越大, 遗传相似系数接近于 0。当 $I=1$, $D=0$ 时, 表示 2 个

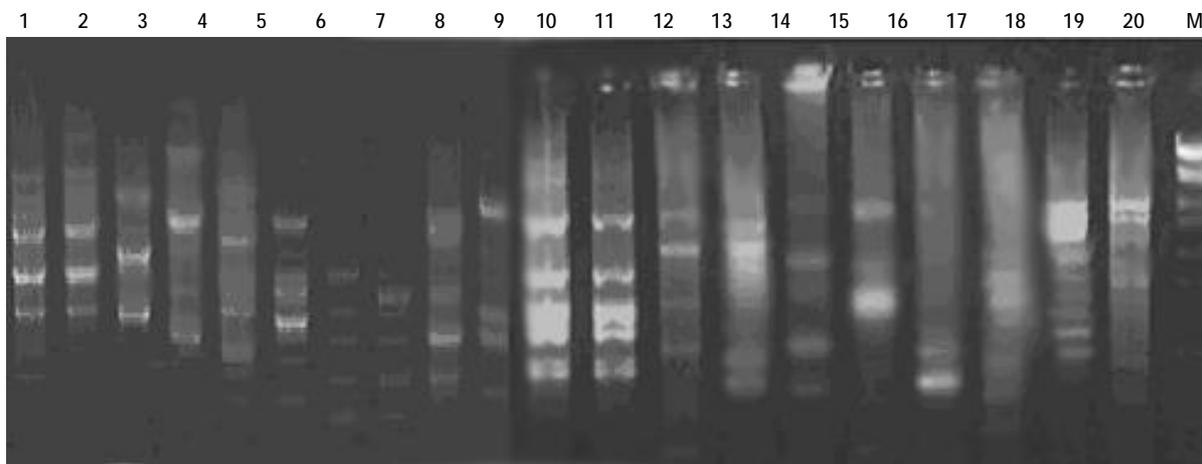
作者简介 刘健 (1973-), 男, 山东邹平人, 硕士, 讲师, 从事植物组织培养、生物技术方面的研究。

收稿日期 2006-11-13

居群间所有的等位基因位点完全一致; $I=1, D=\infty$ 时, 表示 2 个居群间所有检测到的基因位点完全不同。利用 SPSS10.0 软件, 计算出遗传距离, 并进行聚类分析, 绘出亲缘关系树状图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 反应条件的优化和引物筛选 PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、DNA 模板和 dNTP 加入量的反应优化结果见图 1、2。由电泳图可看出 Mg^{2+} 浓度和 DNA 模板的最佳加入量为 $MgCl_2$ 2.5 μ l, 模板 DNA 3 μ l, dNTP 1 μ l。该试验共



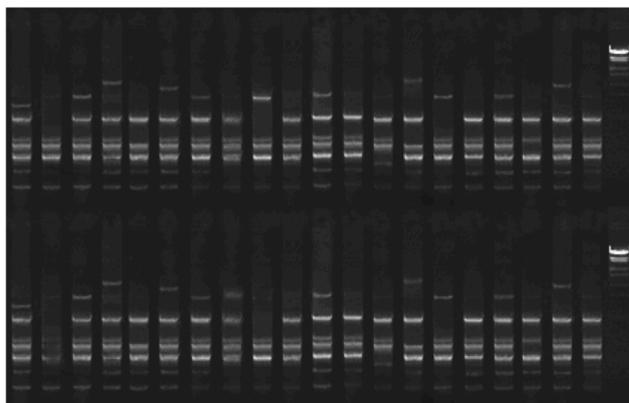
注: 1-10 和 12-21 分别为引物 J11, J12, J13, J14, J21, J22, J25, J26, J27, J30, J44, J45, J46, J47, J48, J49, J50, J75, J76, J79 的结果, M 为 Fragment marker (20kb)。

图 1 随机引物筛选结果

选用了 20 条随机引物进行了 RAPD 反应, 获得清晰的扩增产物。图 1 为引物的筛选结果。

2.2 继代次数与继代材料间变异分析 用产生多态性的 20 条随机引物分别扩增 10 次继代材料, 共 30 个样本

DNA, 根据产生的 RAPD 多态性片段计算不同 DNA 片段的共享度, 做出 10 次继代材料间共有带率及遗传距离指数矩阵 (表 1), 按最短距离法进行聚类分析, 构建亲缘关系树状图 (图 3)。



注: M 代表 marker 20kb。

图 2 部分引物 RAPD 扩增结果

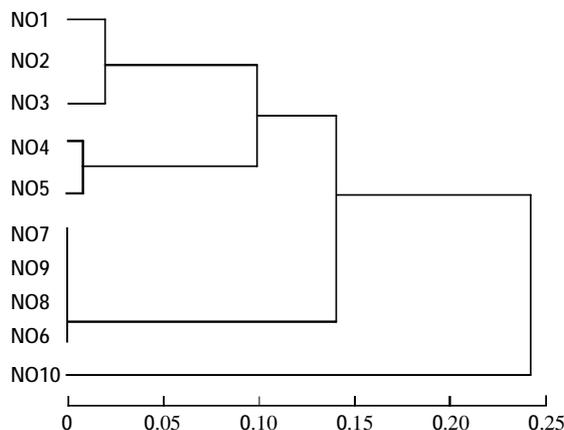


图 3 10 次继代材料间 UPGMA 聚类

表 1 Nei's 遗传一致度 I (表右角) 和遗传距离 D (表左下角)

	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	NO6	NO7	NO8	NO9	NO10
NO1		0.955	0.937	0.824	0.799	0.706	0.729	0.667	0.775	0.734
NO2	0.046		0.930	0.857	0.898	0.750	0.743	0.860	0.833	0.741
NO3	0.065	0.073		0.889	0.852	0.750	0.834	0.885	0.699	0.714
NO4	0.194	0.155	0.118		0.909	0.823	0.772	0.715	0.778	0.859
NO5	0.224	0.108	0.161	0.096		0.769	0.760	0.819	0.860	0.702
NO6	0.349	0.288	0.288	0.195	0.263		0.775	0.780	0.901	0.724
NO7	0.316	0.297	0.182	0.259	0.275	0.255		0.652	0.541	0.661
NO8	0.405	0.151	0.122	0.335	0.200	0.249	0.428		0.797	0.850
NO9	0.255	0.183	0.358	0.251	0.151	0.105	0.615	0.227		0.789
NO10	0.310	0.300	0.337	0.152	0.354	0.333	0.414	0.163	0.237	

从表 1 可看出, 该试验所得到的不同继代材料之间的遗传距离在 0.046~0.615。其中 NO1 和 NO2 之间遗传距离最小, 为 0.046; NO9 与 NO7 之间的遗传距离最大, 为 0.615。

根据 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 法构建聚群遗传关

系聚类图, 见图 3。聚类结果表明, 10 次继代材料间可划为 3 个分支: 1~3 次继代材料, 4~5 次继代材料, 6~10 次继代材料。继代次数越多, 各代之间的遗传差异越大。继代材料各

(下转第 1323 页)

(上接第 1311 页)

个群间已经有了一定的遗传分化,产生了变异,且随着代数的增加,变异增大。

3 讨论

影响 RAPD 重复性的因素很多,如模板的质量,引物的浓度, Taq 酶的质量, Mg²⁺ 的浓度及循环参数等。由于 DNA 质量难以控制,其质量是否影响扩增一直倍受关注。一种意见认为 DNA 质量不合格是影响扩增结果重复性的重要因素;另一种意见认为 DNA 质量对扩增无影响,后者的试验中 DNA 的定量多采用荧光比色等粗略方法。由于室内批内条件的一致性容易控制,故在一定范围内 DNA 对扩增无明显影响。但对室内批间尤其是室间实验,由于引物浓度、Taq 酶质量及 PCR 仪的不同,可能会出现偏差。这些偏差与不合格 DNA 的浓度变化发生互作,则可能产生不同的图谱。该试验由于人力物力所限,对样品的采集量还较少,可能有

一定的误差。

参考文献

- [1] LANDRY B S, HUBERT N. A genetic map for Brassica napus based on RFLP detected with expressed DNA sequences[J]. Genome, 1991 (34): 543.
- [2] 向仲怀. 采用随机扩增多态性 DNA 技术 (RAPD) 在桑属植物系统学研究的应用初报[J]. 蚕业科学, 1995, 21 (4): 203-208.
- [3] 冯丽春. 桑树栽培种的随机扩增 DNA 多态性 (RAPD) 研究[J]. 蚕业科学, 1996, 22 (3): 135-139.
- [4] 冯丽春, 杨光伟, 余茂德, 等. 利用 RAPD 对桑属植物种间亲缘关系的研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30 (1): 52-56.
- [5] 张继益, 董玉深. 早麦草属种质资源的 RAPD 分析[J]. 遗传学报, 1999, 26 (1): 54-60.
- [6] 左开井, 济中. 利用 RAPD 标记评估我国棉花品种遗传多样性[J]. 遗传学报, 2000, 27 (9): 817-823.
- [7] 罗光佐, 施季森, 黄敏仁. 利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸与鹅掌楸种间遗传多样性[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9 (2): 9-13.
- [8] 刘健, 于元杰. 果桑离体组织培养研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34 (16): 3891-3892.