

## 石榴 RAPD 反应体系优化及亲缘关系研究

刘素霞 洪达 高武军 邓传良 卢龙斗\* (河南师范大学, 河南新乡 453007)

**摘要** 利用正交试验设计, 从  $Mg^{2+}$ 、dNIP、引物、酶4 种因素3 个水平上对石榴 RAPD 反应体系进行优化, 确立了适合石榴 RAPD 反应体系: 在 25  $\mu$ l 反应体系中, 含 1  $\times$  PCR buffer, 2.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ mol/L dNIP, 0.2  $\mu$ mol/L 引物, 50 ng 模板 DNA, 0.5 U Taq DNA 聚合酶。通过梯度 PCR 测验, 确定了适宜的退火温度 37  $^{\circ}$ C。利用优化的 RAPD 反应体系对 11 个石榴品种进行亲缘关系分析, 结果表明, 11 个品种之间的多态性比较高, 变异大。聚类图结果表明, 11 个品种被明显分为临选 1 号、净皮甜、新大甜、临选 14 号; 大粒三白甜、大青皮酸、小红皮酸、白花、江石榴、薄皮糙、玉石籽两个类群。因此, 这一优化体系适合于石榴品种间的亲缘关系鉴定。

**关键词** 石榴; RAPD; 正交设计; 梯度 PCR

中图分类号 S665.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)36-11775-03

Study on Optimization for RAPD Reaction System and Genetic Relationship in *Punica granatum*

LIU Suxia et al (Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007)

**Abstract** In this study, orthogonal design was used to optimize RAPD amplification system on pomegranate of four factors:  $Mg^{2+}$ , dNIP, primers and Taq DNA polymerase in three levels respectively. A suitable RAPD reaction system was established, namely, 25  $\mu$ l reaction system containing 1  $\times$  PCR buffer, 2.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ mol/L dNIP, 0.2  $\mu$ mol/L primer, 50 ng DNA template and 0.5 U Taq DNA polymerase. The optimal annealing temperature for RAPD PCR reaction system was proposed by gradient PCR. On the basis of this optimal reaction system, the systematic classification of 11 cultivars of pomegranate was studied. It was revealed that the polymorphism of RAPD mark in the 11 cultivars was very high, and the variance was large. The result of clustering also showed that 11 cultivars could be classified into two groups: Linxuan No. 1, Jingpitian, Xindatian, Linxuan No. 14; Dalisanbaitian, Daqingpisan, Xiaohongpisan, Baihua, Jiangshiliu, Baopizao and Yushizi. So this optimal reaction adapted to the RAPD reaction.

**Key words** *Punica granatum*; RAPD; Orthogonal design; Gradient PCR

石榴 (*Punica granatum* L.) 是我国古老的栽培果树之一, 具有较高的食用、药用及观赏价值<sup>[1]</sup>。近 40 年来对于石榴的研究论文较少<sup>[2]</sup>, 大都集中在化学成分研究、丰产栽培技术和组织培养等方面。对于石榴品种的鉴定和分类研究主要集中在形态方面。续九如等<sup>[3]</sup> 根据果皮颜色和口感, 把陕西临潼的石榴品种分为食用型和观赏型。徐迎碧等<sup>[4]</sup> 和熊红等<sup>[5]</sup> 将同工酶应用到个别的品种分类中。关于分子标记用于石榴的报道更少<sup>[6-7]</sup>。显然, 目前对于石榴品种的鉴定和亲缘关系的研究多选择形态学的指标, 且所用材料多局限在某一区域的石榴品种, 可供比较研究的品种数量少。石榴的分类到目前仍没有统一的分类标准, 以至出现了许多同名异物或同物异名的现象。因此, 通过建立科学、标准的分类方法将为石榴新品种的培育以及进一步开发利用提供依据。

植物品种鉴定与分类<sup>[8]</sup>、遗传作图<sup>[9]</sup>、进化及遗传多样性<sup>[10]</sup>、基因定位<sup>[11-12]</sup> 等方面的研究已广泛使用 RAPD 标记技术。随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术是一种运用随机引物扩增基因组寻找多态性 DNA 片段作为分子标记的新技术。由于它是基于 PCR 的一种分子标记, 所以其反应条件易受许多因素的干扰, 如模板 DNA、Taq DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$ 、dNIP、引物等浓度都能影响 RAPD PCR 的扩增结果。若仅以单因素试验, 难免顾此失彼, 忽视其互作效应, 而正交试验设计具有均衡分散、综合可比及可伸可缩、效应明确的特性, 了解各因素之间的内在规律, 较快地找到最优的水平组合<sup>[13]</sup>。

该研究利用正交试验设计, 从  $Mg^{2+}$ 、dNIP、引物、Taq 酶 4 种因素 3 个水平上, 对石榴 RAPD 反应体系进行优化分析, 并对 PCR 反应程序中的退火温度进行梯度测验, 建立适合于石榴的 RAPD 反应体系, 同时, 对 11 个石榴品种进行了 RAPD

扩增, 分析其亲缘关系。为今后从分子水平上进一步确定石榴种质资源品种、变种之间的亲缘关系奠定基础<sup>[14]</sup>。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料 石榴品种由黄山学院提供(表 1)。

表 1 石榴品种和来源

编号	品种名称	来源	编号	品种名称	来源
1	大青皮酸	蒙自市	7	白花	蒙自市
2	临选 1 号	临潼市	8	小红皮酸	蒙自市
3	净皮甜	蒙自市	9	江石榴	蒙自市
4	新大甜	临潼市	10	薄皮糙	蒙自市
5	临选 14 号	临潼市	11	玉石籽	蒙自市
6	大粒三白甜	蒙自市			

## 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取和检测。** CTAB 法提取基因组 DNA<sup>[15]</sup>。分别用琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计检测 DNA 质量及浓度。

**1.2.2 PCR 正交试验设计。** 采用  $L_9(3^4)$  正交表设计, 由 Taq 酶、dNIP、引物和  $Mg^{2+}$  4 因素各 3 个水平组成(表 2)。

表 2 正交试验因素水平

水平	因素			
	引物 $\mu$ mol/L	dNIP $\mu$ mol/L	$Mg^{2+}$ mmol/L	酶 2.5 U $\mu$ l
1	0.2	0.2	1.5	0.25
2	0.4	0.4	2.0	0.35
3	0.6	0.6	2.5	0.50

设计的 PCR 各反应成分的正交试验设计见表 3。设 9 个处理, 每个重复 2 次, 共 18 个反应, 按表 2 加样。反应体系总体积为 25  $\mu$ l, 除上述变化因素外, 每管中还含有 1  $\times$  PCR buffer, 50 ng 模板 DNA、灭菌水。反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 37  $^{\circ}$ C 退火 45 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 40 次, 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 2.5 h (80 V 电压) 后, 在紫外投射反射仪下观察、照相并分析。

基金项目 河南省自然科学基金项目(0611030300)。

作者简介 刘素霞(1978-), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物种质资源。\* 通讯作者, E-mail: lld5910@yahoo.com.cn。

收稿日期 2007-09-12

表3 PCR 正交试验设计

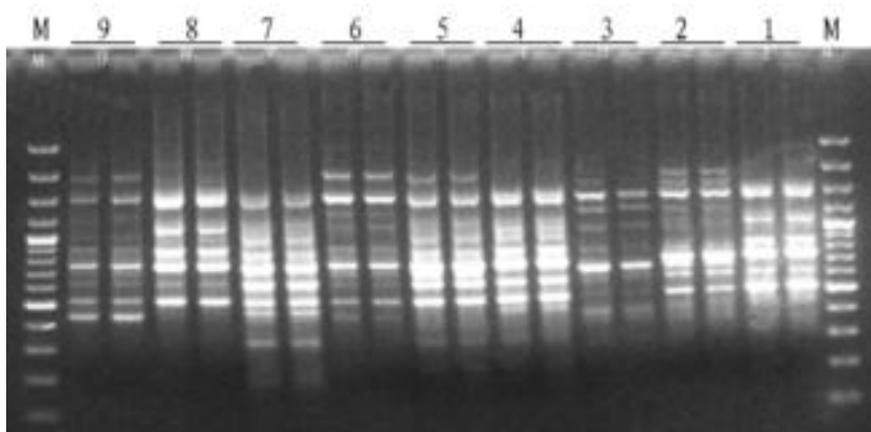
编号	因素			
	Mg <sup>2+</sup>	dNIP	引物	酶
1	0	0.5	0.5	0.10
2	0	1.0	1.0	0.15
3	0	1.5	1.5	0.20
4	0.5	0.5	1.0	0.20
5	0.5	1.0	1.5	0.10
6	0.5	1.5	0.5	0.15
7	1.0	0.5	1.5	0.15
8	1.0	1.0	0.5	0.20
9	1.0	1.5	1.0	0.10

**1.2.3 退火温度的确定。**根据正交试验结果及相关资料<sup>[6-7,16]</sup>,设定退火温度:33、34、35、36、37、38、39 进行 RAPD 扩增(反应程序同“1.2.2”)。

**1.2.4 11 个石榴品种的 RAPD 扩增。**应用筛选出的最佳反应体系和扩增程序对 11 个石榴品种的 DNA 进行 RAPD PCR 扩增验证。以 11 个石榴品种的一个(1 号)作为模板,对 15 条 RAPD 引物(上海生工)进行选择,从中选出条带清晰、背景清晰、重复性好的 6 条引物进行扩增。PCR 扩增体系和退火温度参照“1.2.2”和“1.2.3”。对扩增结果进行统计,有带记为 1,无带记为 0,获得 0、1 二元数据列。用 TPGA 软件计算 11 个石榴品种间的 Nei 遗传距离,并用加拿大 Alberta 大学开发的 UPGMA 法构建聚类图。

## 2 结果与分析

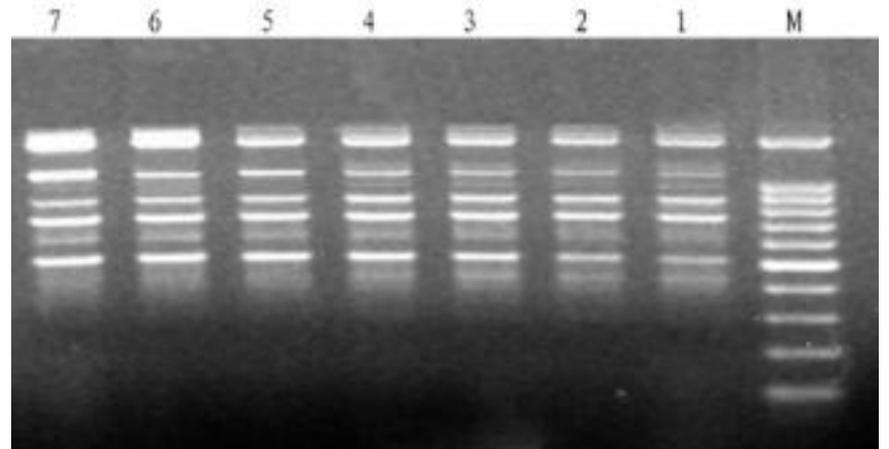
**2.1 PCR 正交试验设计结果分析** 对 PCR 扩增结果进行电泳,依据琼脂糖电泳条带的强弱及杂带的多少进行直观分析<sup>[17]</sup>。从图 1 可见,1~3 号处理中,dNIP 的用量是依次增多,它们的条带是逐渐减弱。4~9 号处理的结果和前者一样。dNIP 的用量为 1.5 μ 时,条带较弱;dNIP 的用量为 0.5 μ 时条带亮,杂带多,不清楚;dNIP 的用量为 0.1 μ 时清晰度和亮度最好。由此可知,dNIP 为反应的重要影响因素。4 和 5 号处理,Mg<sup>2+</sup> 为 2.0 mol/L,扩增的条带多,但模糊不清;2 号处理,产物相对较少,主带和副带不明显;8 号处理,产生条带多且清晰,亮度高为最佳组合。实际上,PCR 扩增的结果是由多个因素综合影响的,根据谱带数、特异性及经济性的原则,确定 8 号处理最佳,因此得出,石榴 RAPD PCR 反应体系的最佳组合,即在 25 μ 反应体系中,含 1 × PCR buffer 2.5 μ、MgCl<sub>2</sub> 2.5 mmol/L、dNIP 200 μmol/L、引物 0.2 μmol/L、模板 DNA 50 ng、TaqDNA 聚合酶 0.5 U。



注:1~9 为处理代号,参见表 1,引物为 S2154。

图 1 RAPD PCR 正交试验设计结果

**2.2 退火温度的确定** 根据正交试验设计结果,以 8 号处理组合进行退火温度的梯度测验。由图 2 可见,虽然扩增条带没什么变化,但退火温度较低时,有杂带,背景不清(33~35);随着退火温度升高(33~39),扩增结果的特异性结合增强,杂带减少。由于条带太亮或太弱不清楚都不利于统计与分析,故 RAPD 反应的退火温度选为 37。利用其他引物进行梯度 PCR 扩增,亦得到了相似结果。



注:1~7 对应温度为 33、34、35、36、37、38、39,引物为 S2154。

图 2 退火温度对 RAPD 反应的影响

**2.3 11 个石榴品种的 RAPD 结果分析** 应用上述最佳反应体系和扩增程序,对 11 个石榴品种进行扩增。15 个引物用于 RAPD 分析其中 6 个引物能产生清晰的扩增产物(表 4),部分引物的扩增结果见图 3。从表 4 可以看出,6 个引物共产生 63 个位点,其中多态性位点 51 个,多态性比例平均达到 80.9%。说明 RAPD 标记能够反映出石榴品种间的多态性,可以用来进行石榴品种间的系统分类研究。

表 4 RAPD 引物序列及扩增结果

引物	引物碱基序列	位点总数(N)	多态性位点数(N <sub>i</sub> )	多态性比例 %
S66	5 GAACGGACTG3	13	11	84.6
S1309	5 ACTGGGTCGG3	9	5	55.6
S1440	5 ACGGAAGTGG3	10	10	100
S1510	5 ACTGCCCGAC3	11	10	90.9
S2154	5 ACTGCCCGAC3	12	10	83.3
S2085	5 GGAACGCTAC3	8	5	62.5
总计		63	51	
平均		10.5	8.5	80.9

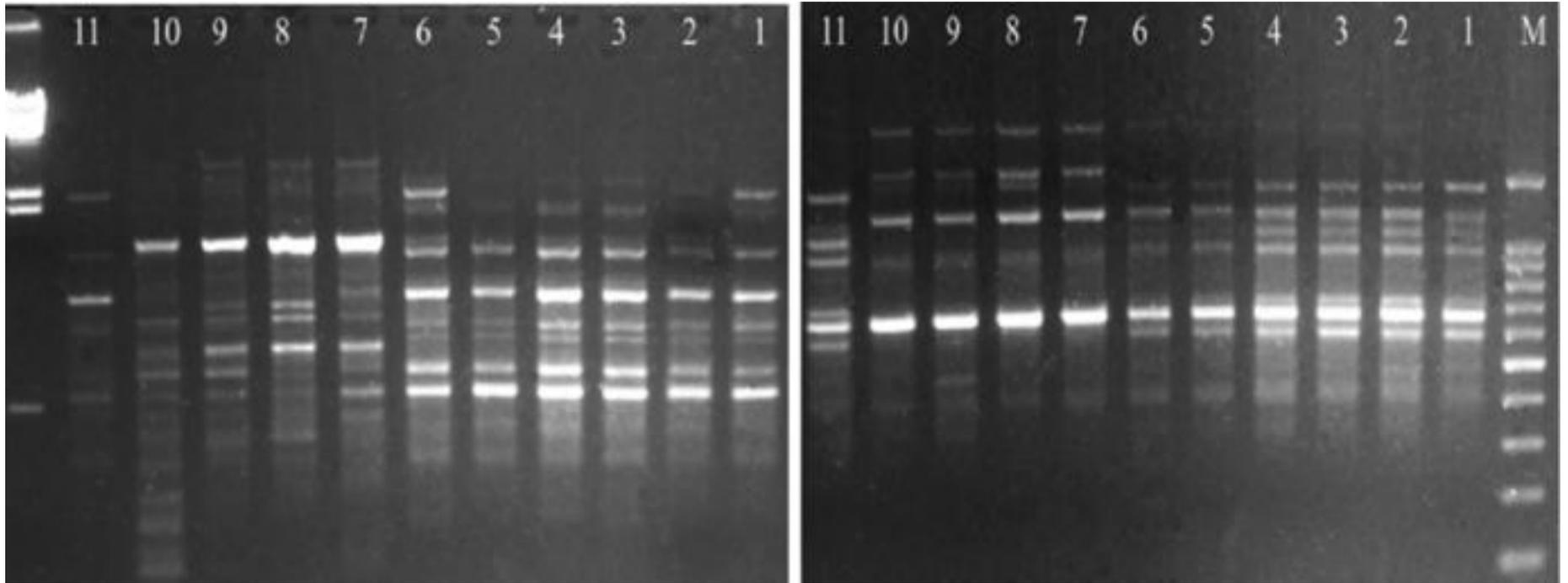
根据遗传距离远近,对 RAPD 扩增产物所得位点进行分析,获得 11 个石榴品种间的遗传距离和遗传一致性结果。并在此基础上利用非加权配对算术平均法(UPGMA)得到石榴 11 个品种间的聚类图(图 4)。可以看出 11 个石榴品种可以分为两类,其中临选 1 号、净皮甜、新大甜、临选 14 号为一类;大青皮酸、大粒三白甜、玉石籽、白花、小红皮酸、薄皮糙和江石榴为二类。

## 3 讨论

RAPD 分子标记技术是一项相对不稳定的标记技术,容易受到许多因素的影响<sup>[18-19]</sup>。在该试验中不同的组分浓度对条带数以及亮度的影响是不同的。经综合比较后,酶、Mg<sup>2+</sup> 和 dNIP 显著地影响了条带数;酶和 Mg<sup>2+</sup> 影响了条带的亮度,这些与单因素试验结果<sup>[20]</sup> 相一致。Taq DNA 聚合酶对该试验的影响相对较大,浓度太高,产生大量弥散性带,使电泳背景过深;浓度太低,则无扩增产物或产物较弱。这两种情况均不利于多态性分析,因此,酶量取 0.5 U。综合前人研

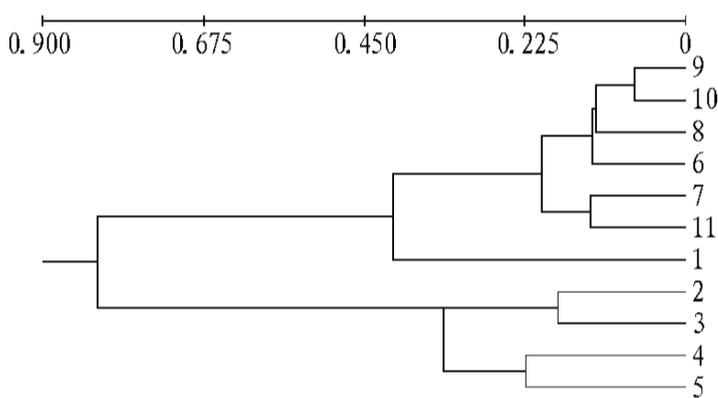
究,该试验25  $\mu$  的反应体系中模板DNA 为50 ng。与以往的单因素PCR 优化设计相比,利用正交试验直观分析的方法,虽然能够对多因素水平进行考察,并且能够迅速获得较为理想的试验结果,但该方法亦存在一定的局限性。如对试验结

果本身优劣的判断依据带有主观成分,不能很好地估计试验误差,说明各个试验条件之间的相互作用等,如果能够对PCR 扩增条件及结果建立一种新的优化PCR 反应体系的试验方法和分析方法<sup>[17]</sup>,无疑将极大地促进PCR 技术的发展。



注:1~11 为样品编号,M 为分子量 marker。

图3 引物RAPD66(左)和引物RAPD309(右)的扩增结果



注:1~11 为样品编号。

图4 石榴11 个品种基于RAPD 数据的UPGMA 聚类

中国石榴品种繁多,品种分类的研究大都集中在形态学和园艺学方面。该试验从分子水平上依据UPGMA 聚类图可将该研究中的11 个石榴品种成一支分为两类。其中临选1 号、净皮甜、新大甜、临选14 号为第一类,它们的花型都是单瓣、果味甜、花色红、果皮颜色红,从形态上看这4 个品种比较接近,该试验也证实了这一结果,它们聚在了一起;大青皮酸、大粒三白甜、玉石籽、白花、小红皮酸、薄皮糙和江石榴为第二类,花型也是单瓣,第二类中的白花和大粒三白甜的花色为白色,果味为甜,但是试验中两者没有聚在一起。江石榴、小红皮酸和薄皮糙的花色都为红色,果皮也是红色,但味道不同,前两者味酸后者味甜,却聚在了一起。从该试验看,分子水平上的分类与形态分类有一些冲突,但基本上与将花型作为形态分类标准<sup>[20]</sup>相一致。运用选出的优化体系对11 个石榴品种进行RAPD 扩增,共扩增了63 条带,其中多态性条带51 条,多态性比率达到81%,说明RAPD 是鉴定石榴亲缘关系的有效手段,同时也说明笔者选出的体系适合于石榴品种分类的研究。从结果看,支持以瓣形作为形态分类的标准,更证明了正交设计所得到的体系的准确性和可靠性,为以后运用RAPD 标记技术研究石榴品种分类提供了一个新途径。

#### 参考文献

[1] 张建成,屈红征,张晓伟.中国石榴的研究进展[J].河北林果研究,2005,20(3):265-267.

- [2] 周光洁,袁永勇,曾凡哲,等.中国石榴生产的现状及发展前景[J].西南农业学报,1995,8(1):111-115.
- [3] 续九如,赵秉伦,王生民.临潼石榴遗传资源的研究[J].经济林研究,1993,11(1):13-17.
- [4] 徐迎碧,周先锋,殷彪,等.4 种不同石榴品种同工酶分析[J].防护林科技,2006,71(2):17-19.
- [5] 熊红,张旭东,彭世逞.石榴品种酯酶同工酶分析[J].西昌师范高等专科学校学报,2001,13(3):25-26.
- [6] SARKHOSH A,ZAMAN Z,FATAH R,et al.RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes[J]. Scientia Horticulturae,2006,111:24-29.
- [7] TALEBI BADDAF M,SHARIFI NEHA B,BAHAR M Analysis of genetic diversity in pomegranate cultivars of Iran,using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers[C]// Proceedings of the Third National Congress of Biotechnology Iran:[s.n.],2003:343-345.
- [8] 郭先锋,王莲英.芍药品种的RAPD 标记[C]// 中国观赏园艺研究进展(2004) 全国观赏植物多样性及其应用研讨会论文集.北京:中国林业出版社,2004:101-104.
- [9] DULLEMANN F,KAHNAU R,STANE I. Analysis of complex leaf and flower characters in *Rhododendron* using molecular linkage map[J]. Theor Appl Genet,1999,98(6/7):1146-1155.
- [10] 崔成日,徐启江,崔崇士,等.洋葱RAPD 遗传多样性分析[J].园艺学报,2006,33(4):863-865.
- [11] WILLIAMS J G K,RUBELIKA R,IIVAK K J,et al.DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers[J]. Nucleic Acid Res,1990,18:6513-6535.
- [12] BIANCHI M,LI J M,LI Z X.Effect of BSA on random amplified polymorphic DNA (RAPD) in plants[J]. Hereditas,2002,24(3):279-281.
- [13] 盖钧镒.试验统计方法[M].北京:中国农业出版社,2000:286-287.
- [14] 杨荣萍,李文祥,武绍波,等.石榴种质资源研究概况[J].福建果树,2004(129):16-19.
- [15] 杨荣萍,李文祥,龙雯虹,等.石榴DNA 提取方法的比较及抗氧化剂对DNA 质量的影响[J].云南农业大学学报,2005,20(5):624-626.
- [16] 汪小全,邹喻萃,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.
- [17] 何正文,刘运生,陈立华,等.正交设计直观分析法优化PCR 条件[J].湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.
- [18] 奥斯伯F M,金斯顿 R E,赛德曼 J G,等.精编分子生物学实验指南[M].4 版.北京:科学出版社,2005:652.
- [19] 聂珍素,赖钟雄,潘东明,等.橄榄基因组DNA 提取及RAPD 扩增条件优化[J].亚热带农业研究,2005,1(2):6-8.
- [20] 汪小飞,向其柏,尤传楷,等.石榴品种分类研究[J].南京林业大学学报:自然科学版,2006,30(4):81-84.