

南瓜属植物 RAPD-PCR 反应体系的建立与应用

庄东红¹, 黄秀丽¹, 吴奕瑞¹, 林奕韩², 郑汉藩²

(1. 汕头大学生物系, 广东汕头 515063; 2. 汕头市白沙蔬菜原种研究所, 广东汕头 515800)

摘要: 采用混合 DNA 样品池, 利用正交法对南瓜属植物 RAPD 反应条件进行了探讨, 并利用建立起来的优化体系, 从 35 条引物中筛选出 7 条引物, 对供试中国南瓜、印度南瓜和黑籽南瓜 3 个栽培种的 7 个品种进行了 RAPD 分析, 结果均获得了较多的多态性位点。RAPD-PCR 反应扩增结果还显示, 日本南瓜兼有中国南瓜和印度南瓜的特征带, 聚类分析的结果则表明, 它与中国南瓜的亲缘关系更近。

关键词: 南瓜属; RAPD-PCR; 混合 DNA 样品池; 聚类分析

中图分类号: Q949.782; Q346

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)05-0422-05

Optimization and Application of RAPD-PCR System for *Cucurbita*

ZHUANG Dong-Hong¹, HUANG Xiu-Li¹, WU Yi-Rui¹, LIN Yi-Han², ZHENG Han-Pan²

(1. Department of Biology, Shantou University, Shantou, Guangdong 515063, China;

2. Shantou Baisha Vegetable Original Seed Research Institute, Shantou, Guangdong 515800, China)

Abstract: Using DNA pooling, we established RAPD optimal conditions for *Cucurbita* through the orthogonal optimization method. With the founded system, 7 primers were selected from 35 primers to analyze 7 cultivars of *C. moschata* Duch, *C. maxima* Duch and *C. ficifolia* Bouche. The results showed that there were many polymorphic sites among the cultivars. The cultivar Riben Nangua had the distinct bands of *C. moschata* and *C. maxima* at the same time, and the results of cluster analysis showed it was near with *C. moschata*.

Key words: *Cucurbita*; RAPD-PCR; DNA pooling; Cluster analysis

RAPD (random amplified polymorphisimic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 是 1990 年由美国科学家 Williams 和 Welsh 几乎同时采用 PCR 技术发展起来的一种 DNA 分子标记技术^[1,2]。因其操作简便、实验成本低、灵敏度高、通用性强, 且在了解物种基因组相关分子生物学信息下就可进行等优点而得到广泛应用。但该方法对反应条件非常敏感, 具有稳定性和重复性差的缺点, 因此必须建立起一个稳定的、最佳的反应体系来克服这一缺点^[3]。

近年来, 已有研究者应用 RAPD 技术对芸薹属蔬菜和黄瓜中遗传多样性和物种亲缘关系进行了研究^[4], 但对南瓜属的研究国内少见报道。笔者参考万海伟等^[3]的方法, 利用正交优化法建立了一个适合对南瓜属 (*Cucurbita*) 植物进行 RAPD 分析的反应体系, 并对该属 3 个栽培种的 7 个品种进行了 RAPD 亲缘关系聚类分析, 为 RAPD 应用于南瓜属

植物品种鉴定、亲缘关系探讨和种质资源诸多方面的研究提供方法依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为蜜Ⅲ(a)、云南黑籽南瓜(b)、白籽南瓜(c)、日本南瓜(d)、翡翠南瓜(e)、蜜本南瓜(f)、02A(g) 7 个品种, 其中 a、f、g 为中国南瓜 (*C. moschata* Duch), b 为黑籽南瓜 (*C. ficifolia* Bouche), c、e 为印度南瓜 (*C. maxima* Duch), d 的归属尚未明确。a、f、g 由广东省汕头市白沙蔬菜原种研究所提供, b 购于云南京滇种业有限公司, c、d 购于内蒙古种星种业有限公司, e 由广东省农科院蔬菜研究所提供。

1.2 试剂

实验所用试剂均为上海申能博采生物科技有限公司产品, 10×PCR buffer 中含有 20 mmol/L

收稿日期: 2005-03-22, 修回日期: 2005-06-24。

基金项目: 广东省科技计划项目 (2002A2070602)。

作者简介: 庄东红 (1955—), 女, 博士, 教授, 从事植物遗传学教学和研究工作。

MgSO₄。引物为上海生物工程公司产品。

1.3 RAPD-PCR 优化反应体系及反应程序的建立

1.3.1 模板 DNA 的提取 以供试品种第一片真叶为试材,采用±CTAB 法提取基因组 DNA^[5]。

1.3.2 DNA 池的建立 参考文献[3],用分光光度计检测供试 7 个品种 DNA 的浓度,取等量 DNA (300 ng)混成 DNA 池,终浓度为 412 ng/μL。

1.3.3 正交优化法建立 RAPD-PCR 最佳反应体系 本实验在 Mg²⁺ 2 mmol/L 不变的情况下,根据正交法设计了模板、引物、dNTPs、Taq 酶以及退火温度 5 个因素 4 个水平实验(见表 1),实验方案见表 2。该实验所用的引物为 S26,其碱基序列为

表 1 因素水平
Table 1 Factors and levels

水平 Levels	因素 Factors				
	A* (μmol/L)	B (ng/μL)	C (ng/μL)	D (U)	E (°C)
1	100	0.66	16.48	0.5	34
2	150	0.99	24.72	1.0	35
3	200	1.32	32.96	1.5	36
4	250	1.65	41.20	2.0	37

* A. dNTPs 浓度; B. 引物浓度; C. 模板浓度; D. Taq 酶用量; E. 退火温度。下表同。

* A. dNTPs concentration; B. Primer concentration; C. Template concentration; D. Taq polymerase; E. Annealing. The same for the follows.

表 2 L₁₆(4⁵)正交实验方案
Table 2 L₁₆(4⁵) orthogonal experiment projects

因素 Factors	实验组号 Experimental sequence numbers															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4
B	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C	1	2	3	4	2	1	4	3	3	4	1	2	4	3	2	1
D	1	2	3	4	3	4	1	2	4	3	2	1	2	1	4	3
E	1	2	3	4	4	3	2	1	2	1	4	3	3	4	1	2

5'GGTCCCTGAC 3'。表 2 中各实验反应总体积为 20 μL,于 Whatman Biometra 公司生产的 Tpersonal PCR 扩增仪上进行。热循环参数为:95℃预变性 2 min,37℃退火 1 min,72℃延伸 2 min;94℃变性 1 min,35℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,循环 40 次;94℃变性 1 min,36℃退火 1 min,72℃延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,以 SE Perfect 1kb DNA ladder(上海申能博采生物科技有限公司产品)为相对分子量标记。电压为 5 V/cm,电泳 1~2 h 后在凝胶成像系统上检测结果并拍照。

1.4 供试 7 个品种的 RAPD 分析

1.4.1 引物筛选 以第 16 号组合为 RAPD-PCR 反应体系(见表 3),利用 34 条引物对 DNA 样品池进行反应扩增。从中筛选出扩增条带多、清晰且重复

表 3 引物筛选及南瓜属基因组 DNA RAPD 反应扩增体系(20 μL)

Table 3 The reaction system of RAPD for primers selection and genome DNA amplification of *Cucurbita* L. (20 μL)

反应体系成分 Elements of PCR reaction	10×Buffer (含 Mg ²⁺) (μL)	A (μmol/L)	B (ng/μL)	C (ng/μL)	D (U)	双蒸水 ddH ₂ O (μL)
成分含量 Concentrations for each element	2	250	1.65	16.48	1.5	15.4

注:退火温度为 35℃。

Note: Annealing is 35℃.

性好,适于 RAPD 分析的引物。

1.4.2 RAPD 分析 利用上一步实验筛选出来的 6 条引物及 S26,对供试各品种的基因组 DNA 进行 RAPD-PCR 反应扩增(反应程序同引物筛选)。PCR 产物电泳拍照后,统计各品种间的相似系数。相似系数计算公式为: $s = [2M_{xy} / (M_x + M_y)] \times 100\%$ (s 表示相似系数, M_{xy} 表示品种 x 、 y 共有片段总和, M_x 表示 x 品种片段数, M_y 表示 y 品种片段数),利用 MEGA2 软件根据品种间的相似系数 s 进行 UPGMA 聚类分析^[6]。

以上实验均进行 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 RAPD-PCR 反应体系的建立

电泳结果(见图 1)显示:1~16 号实验均可得到扩增条带;1,3,4,5,7,8,9,11,12,13,14 号实验条带较少(3~7 条)且重复性差,尤其以 11,12,13,14 号效果更差;2,6,10 号条带(7 条)清晰,但重复性稍差;15,16 号实验扩增条带多(8 条)、清晰且重复性好。

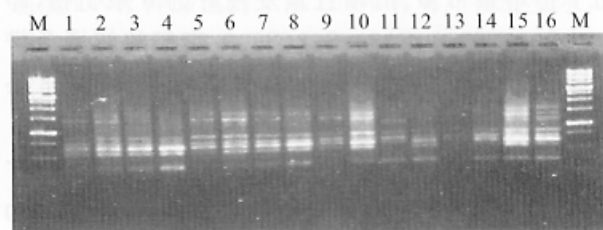


图 1 16 个实验组合 RAPD-PCR 反应扩增结果(引物 S26)

Fig. 1 The electrophoresis result of RAPD-PCR reaction of 16 groups (Primer S26)

参照文献[7]的方法,对电泳条带进行统计,计算各因素列(表 2)中相同水平所对应的指标(K)、平均值(k)及级差(R),结果见表 4。R 值的大小反映了该因素对结果影响的大小,从表 4 中可以看出,在 Mg²⁺ 浓度不变的情况下,以 Taq 聚合酶和退火温度

影响最大,其次为模板浓度、引物浓度、dNTPs 浓度,这 3 个因子对扩增反应的影响均较小。从反应体系来看,第 11,12,13,14 组实验的 Taq 酶用量较少、退火温度较高,对实验结果产生较大的影响,扩增效果不好。第 15、16 号实验 Taq 酶用量较高、退火温度较低,获得了较好的扩增效果。因此,可认为本实验的 5 个因子中,Taq 聚合酶用量和退火温度是主要因子。

表 4 正交实验结果

Table 4 The results of the orthogonal experiment					
水平 Levels	因 素 Factors				
	A ($\mu\text{mol/L}$)	B ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	C ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	D (U)	E ($^{\circ}\text{C}$)
K ₁	26	23	26	23	28
K ₂	28	26	27	22	29
K ₃	24	27	26	29	22
K ₄	24	26	23	28	23
k ₁	6.50	5.75	6.50	5.75	7.00
k ₂	7.00	6.50	6.75	5.50	7.25
k ₃	6.00	6.75	6.50	7.25	5.50
k ₄	6.00	6.50	5.75	7.00	5.75
R	1.00	1.00	1.00	1.75	1.75

综合比较认为,南瓜 RAPD-PCR 反应的优化条件为:在 Mg^{2+} 2 mmol/L 不变情况下,dNTPs 250 $\mu\text{mol/L}$,引物 0.99~1.65 $\text{ng}/\mu\text{L}$,模板 DNA 16.48~24.72 $\text{ng}/\mu\text{L}$,Taq 聚合酶 1.5~2.0 U,退火温度 34 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 7 个品种的 RAPD 分析

2.2.1 引物筛选 在 34 条引物中,30 条引物能够扩增出 DNA 条带。30 条引物共扩增出 216 条带,每条引物扩增条带 5~10 条,平均为 7.2 条。从中挑选出了扩增条带多、清晰且重复性好的 6 条引物,即 S27、S305、S304、S276、S22、S308,它们的扩增条带数分别为 7 条、7 条、8 条、7 条、8 条、7 条。将这 6 条引物以及 S26 用于 RAPD 分析。

2.2.2 RAPD 分析 7 条引物 RAPD-PCR 反应扩增,共得到 105 条带,每条引物扩增条带为 12~20 条,平均为 15 条,其中样品间具有多态性的扩增条带有 96 条,占总扩增条带数的 91.4%。每条引物扩增 DNA 条带数及多态性统计见表 5。利用扩增的 105 条 DNA 条带,对 3 个栽培种 7 个品种间的亲缘关系进行了 UPGMA 聚类分析,绘制了系统树状图(图 2)。在相似系数大于 0.8 时,7 个品种可分为 3 个小组,第一组为中国南瓜的 3 个品种及日本南瓜,第二组为印度南瓜的 2 个品种,第三组为黑籽南瓜。当相似系数小于 0.7 时,7 个品种分为 2 个大组,黑

表 5 7 条引物扩增结果统计

Table 5 The amplified results of 7 primers

引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5' to 3'	总带数 Total band number	多态性带数 Num. of polymorphic bands	多态性比率 (%) Percentage of polymor- phic bands
S27	GAAACGGGTG	12	10	83.0
S305	CCTTTCCTC	14	13	93.0
S304	CCGCTACCGA	14	14	100.0
S276	CAGCCTACCA	17	17	100.0
S22	TGCCGAGCTG	12	8	67.0
S308	CAGGGGTGGA	16	16	100.0
S26	GGTCCCTGAC	20	18	90.0
总计 Total		105	96	91.4

籽南瓜归入第一小组。就种内品种间的亲缘关系来看,密Ⅲ与蜜本南瓜亲缘关系最近,它们与 02A 亲缘关系则稍远;白籽南瓜与翡翠南瓜亲缘较近,两者与日本南瓜亲缘关系均较远。就 3 个栽培种间的亲缘关系来看,中国南瓜与黑籽南瓜亲缘关系较近,与印度南瓜较远。另外,引物 S27、S304 在蜜Ⅲ、蜜本南瓜与 02A 中扩增出长度为 700~500 bp 的多态性片段,引物 S305、S22、S308、S26 在印度南瓜 3 个品种间扩增出多态性片段,这些片段均可以作为品种间的特异分子标记。

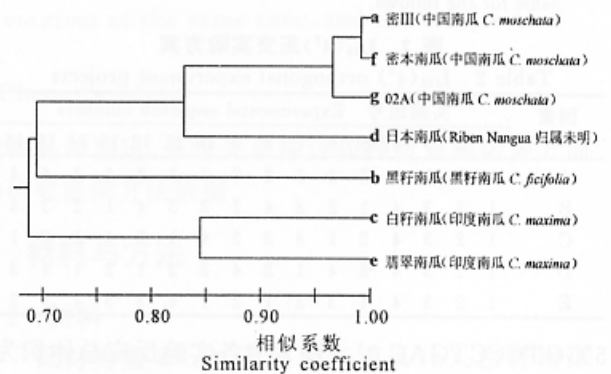


图 2 南瓜属 7 个品种 RAPD 分析的聚类图 (UPGMA 法,相似系数)

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of 7 cultivars in *Cucurbita* based on RAPD (UPGMA method, similarity coefficient)

7 条引物 RAPD-PCR 反应扩增的结果均显示,栽培品种日本南瓜兼有中国南瓜和印度南瓜的特征带。如引物 S27 的扩增结果,中国南瓜的 3 个品种具有条带 A1 和 A5,印度南瓜的 2 个品种具有条带 A2、A3 和 A4,日本南瓜则同时具有这 5 条条带(图 3: I)。引物 S276 进行扩增时(图 3: II),中国南瓜的 3 个品种具有条带 B1、B2 和 B3,印度南瓜的 2 个品种具有条带 B4 和 B5,日本南瓜也同时具有这 5 条条带。可

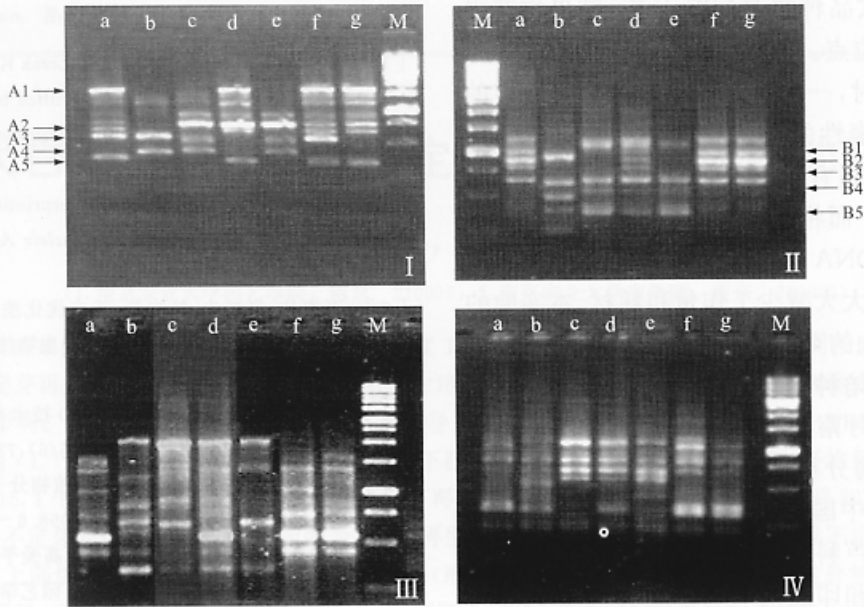


图 3 引物 S27(Ⅰ)、S276(Ⅱ)、S308(Ⅲ)、S22(Ⅳ)对南瓜属 7 个品种 RAPD 扩增的结果
Fig. 3 The results of RAPD-PCR reaction with primer S27(Ⅰ), S276(Ⅱ), S308(Ⅲ), S22(Ⅳ) on 7 cultivars in *Cucurbita*

见日本南瓜与中国南瓜、印度南瓜 2 个栽培种都有关系;而聚类分析时,日本南瓜与中国南瓜的 3 个品种聚在了一起,表明它与中国南瓜的关系更近。

3 讨论

3.1 正交法用于 RAPD-PCR 反应体系的优化

传统的 RAPD-PCR 最佳反应条件的优化一般采用单因子实验进行,这样做不仅耗时耗力耗材,更主要的是没有考虑到各个反应物在反应过程中的动态相互作用,正交实验正好可克服这一缺点^[8]。本研究利用正交法进行实验设计,对 RAPD-PCR 反应体系中的 5 个重要因素即模板浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、Taq 酶用量以及退火温度,从 4 个水平共 16 个组合进行了探讨,结果通过一次实验取得了理想的结果,即节省时间又减少耗材,降低了实验成本。

3.2 混合 DNA 样品池用于 RAPD-PCR 反应体系的优化

混合 DNA 样品池是将具有某一共同特征群体的部分个体 DNA 提取后经过定量和稀释成一定浓度后,按比例或等量混合构成一个池^[9]。混合 DNA 扩增技术最早报道见于 1989 年,20 世纪 90 年代中期研究较多。在植物中,混合 DNA 样品池主要利用于寻找与某些特异性状相连锁的分子标记。如邵刚

等^[10]利用 DNA 样品池对马铃薯抗、感青枯病品种进行了 RAPD、AFLP、SSR 分析,找到了抗病相关的分子标记。陈其军等^[11]利用 DNA 池 RAPD 技术对大麻雄性或雌性(10 株雄性或雌性的单株 DNA 样品等量混合)进行了分析,找到了 3 个与性别相连锁的分子标记。杨青川等^[12]对 1 个耐盐和 2 个敏盐苜蓿的 DNA 样品池进行了 RAPD 多态性研究,找到了与耐盐性状相连锁的分子标记。

以上研究多是针对某一特异性状来的,所以对组成 DNA 样品池的个体 DNA 有着严格的要求,即要求个体间遗传背景非常接近,通常为具有相同性状的同一品种不同个体或者 F₂ 个体。本实验中,将 7 个品种的基因组 DNA 等量混合组成 DNA 样品池,用于 RAPD-PCR 反应体系的优化,取得了很好的实验结果。与上述研究所不同的是,组成样品池的个体遗传背景相差较大,分属于 3 个不同种。

结合本实验结果,笔者认为:使用混合 DNA 样品,特别是由差异较大的品种组成的样品进行 RAPD 反应扩增时,基因型更丰富,多态性位点也较多,更利于比较分析。另外,混合 DNA 样品对 RAPD 反应条件的变化会更敏感,更能准确地反映出反应过程中各因素间的动态相互作用。

3.3 混合 DNA 样品池用于 RAPD 引物筛选

利用混合 DNA 样品池,从 35 条引物筛选出了

7 条引物用于供试品种的 RAPD 分析,结果均获得了较多的多态性位点。以往,应用 RAPD 技术进行遗传多样性分析时,一般利用大量的引物对所有的或者是部分有代表性的供试品种进行 RAPD 反应扩增,进而找到较适合的引物,即耗时又费力,同时增加了实验成本。而将供试各品种或者部分有代表性的品种基因组 DNA 等量混合组成 DNA 样品池,用于引物筛选,则大大减少工作量和耗材。本实验的结果证明了该方法的可行性。

3.4 南瓜属 3 栽培种间亲缘关系聚类分析

漆小泉等^[13]对南瓜属 3 栽培种进行了过氧化物酶和酯酶同工酶分析,认为印度南瓜与美洲南瓜关系较远,两者与中国南瓜关系较近。催辉梅等^[14]利用 RAPD 对葫芦科作物属种间进行多态性分析时,认为黑籽南瓜和印度南瓜亲缘关系较近,两者与美洲南瓜的亲缘关系较远。本实验的 RAPD 分析结果显示,中国南瓜与黑籽南瓜亲缘关系较近,与印度南瓜次之,而黑籽南瓜与印度南瓜关系较远。南瓜属 4 栽培种中国南瓜、美洲南瓜、印度南瓜和黑籽南瓜之间的亲缘关系尚需进一步探讨。

日本南瓜作为一个栽培品种,有的研究将其归于中国南瓜(*C. moschata* Duch)^[15],有的则归为印度南瓜(*C. maxima* Duch)^[14]。从本研究 7 个引物 RAPD 扩增的结果可见,日本南瓜同时具有中国南瓜和印度南瓜的特征条带,聚类分析时它与中国南瓜的 3 个品种聚在了一起,与中国南瓜之间相似系数比与印度南瓜之间的大,这些结果更支持将其归属于中国南瓜。据文献报道,印度南瓜与中国南瓜易于杂交,且已培育出不少商用品种^[16],我们推测日本南瓜可能就是中国南瓜和印度南瓜的种间杂种。由此可见,RAPD 技术可用于南瓜属植物种间杂交种的鉴定。

致谢:本研究得到了广东省农科院蔬菜研究所在实验材料上的帮助和支持,特致谢忱。

参考文献:

- [1] Willimas J C K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6 531 - 6 535.
- [2] Welsh J, Mc Clelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 7 213 - 7 218.
- [3] 万海伟, 张传生, 杜立新. 正交优化法建立奶牛基因组 DNA RAPD-PCR 最佳反应体系[J]. *生物技术通报*, 2004(3): 45 - 47.
- [4] 梁美霞, 李景富, 许向阳. RAPD 技术在蔬菜遗传育种上的应用[J]. *分子植物育种*, 2003, 1(5/6): 737 - 740.
- [5] Clark M S 主编, 顾红雅主译. 植物分子生物学——实验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998. 6 - 7.
- [6] 陈业渊, 邓穗生, 张欣, 魏守兴, 高爱平, 王家保, 周斌. 海南部分荔枝种质的 RAPD 分析[J]. *园艺学报*, 2004, 31(2): 224 - 226.
- [7] 普晓兰, 李鹏, 杜凡. 巨龙竹基因组 DNA 的提取及 RAPD 反应条件的优化[J]. *昆明理工大学学报(理工版)*, 2003, 28(1): 127 - 131.
- [8] 俞渭江. 生物统计附试验设计[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 97 - 99.
- [9] 童大跃. 混合 DNA 样品池应用的研究[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2000, 21(2): 59 - 62.
- [10] 邵刚, 屈冬玉, 连勇, 金黎平, 冯兰香. 马铃薯青枯病抗性的分子标记[J]. *园艺学报*, 2000, 27(1): 37 - 41.
- [11] 陈其军, 韩玉珍, 傅永福, 赵德刚, 国风利, 孟繁静, 刘卫平. 大麻性别的 RAPD 和 SCAR 分子标记[J]. *植物生理学报*, 2001, 27(2): 173 - 178.
- [12] 杨青川, 孙杰, 韩国栋. 耐盐苜蓿与敏盐苜蓿 RAPD 多态性研究[J]. *草地学报*, 2001, 9(2): 83 - 86.
- [13] 漆小泉, 东惠茹, 胡是林. 南瓜属三个种过氧化物酶和酯酶同工酶分析[J]. *园艺学报*, 1989, 16(4): 299 - 304.
- [14] 催辉梅, 莘建华, 乐锦华. 葫芦科作物属种间 RAPD 多态性分析[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 1999, 3(1): 1 - 6.
- [15] 郭勤平, 毛玉荣, 杨广东. 日本南瓜果实发育与营养吸收的初步研究[J]. *陕西农学科学*, 2001, 29(1): 67 - 69.
- [16] 清水茂. 野菜园艺大事典[M]. 东京: 养贤堂, 1988. 850.