

RAPD 技术与桂花品种分类和鉴定

朱 诚

(浙江大学生物科学系, 杭州 310029)

刘非燕

(杭州植物园, 杭州 310013)

S68.1-130-2

摘 要 简介了随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术的原理, 及对桂花品种分类鉴定的必要性, 并建议开展 RAPD 技术在桂花品种分类鉴定的应用研究。

关键词 RAPD 技术; 桂花; 品种; 分类和鉴定

To apply RAPD in classification and differentiation of cultivar of *Osmanthus fragrans* Lour.

Zhu Cheng

(Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Liu Feiyan

(Hangzhou Botanical Garden, Hangzhou 310013)

Abstract In this paper, the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was introduced and the applied possibility in the classification of cultivar of *Osmanthus fragrans* Lour. was analysed. At the sametime, using RAPD technique to classify and differentiate the cultivar of *Osmanthus fragrans* Lour. in China was suggested.

Key words RAPD technique; *Osmanthus fragrans* Lour; cultivar; classification and differentiation

随着分子遗传学的发展, DNA 分析技术的不断改进, 已经极大地提高了我们认识园艺植物在分子水平上的遗传关系。以往对园艺品种的分类、鉴定主要根据形态学、园艺学和生理学特征进行, 但这些特征描述常受到栽培环境、人为判断等因素的限制, 难以作出客观的结论。作为形态学和生理学鉴定方法的改进, 采用同功酶、蛋白质电泳等技术研究园艺植物的遗传关系, 但结果多态性检出率低, 尤其对表型相似的品种缺乏鉴别力, 而且分析结果随环境、发育阶段, 取样部位不同而异。而 DNA 分析技术具有诸多的优点: 结果不受环境、取样部位和发育阶段的影响, 检出的多态位点是无限的, 因此应用高度可靠、鉴别力强、重复性高的 DNA 分析技术已成为园艺品种分类鉴定、品种名称登记注册、专利保护及种子纯度测定的理想方法。

限制性片段多态性 (restriction fragment length polymorphis, RFLP) 技术在了解物种系统发育和演化关系, 评价植物类群的遗传关系等方面已被广泛应用。但是, 由于 RFLP 需要进行多种确切

1997-12-19 收稿

第一作者简介: 朱 诚, 男, 1963 年出生, 副教授, 从事植物发育生理的研究工作。

标记, 种子杂交等, 程序繁琐, 工作量大, 费用高, 且探针需要 ^{32}P 放射性标记, 使其应用受到了很大局限。1990年 Williams 等^[1]和 Welsh 等^[2]两个研究小组同时提出了随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术。与 RFLP 技术相比, 具有快速、简便、成本低廉、多态性检测率更高等优点。它一经提出即得到迅速发展, 已被广泛应用于生物学的各个领域。

1 RAPD 技术简介

1984年美国 Cetus 公司的研究人员成功地发明了一种扩增目标 DNA 片段的离体方法, 即聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)。PCR 反应包括这 3 个步骤: (1) 变性, 使双链 DNA (dsDNA) 在高温下转变为单链 DNA (ssDNA); (2) 退火, 较低温度下促进引物与模板 DNA 片段以碱基配对的原则结合; (3) 引物延伸, 在适宜的高温下通过 DNA 聚合酶的聚合活性, 由引物引导合成互补 DNA 链。通过重复 3 个步骤, 理论上目标 DNA 片段的拷贝数将指数级 ($2^n \cdot n$ —循环次数) 增长, 从而在短时间内获得大量的目标 DNA 片段。

RAPD 技术是在 PCR 反应基础上发展起来的, 是使用单一随机碱基顺序核苷酸作为引物, 需要极微量的基因组 DNA。扩增反应仅需 10 bp 的单寡核苷酸作引物 (核苷 C+G 含量必须达到 50%), 而且预先不必测基因组 DNA 顺序。在耐热聚合酶存在下进行基因组 DNA 体外扩增, 扩增产物通过琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺电泳分离, 经溴乙锭染色来检测扩增 DNA 片段的多态性。

Williams 等^[1]描述的 RAPD 分析技术作为标准的 RAPD 技术。该反应要求 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 50 mmol/L KCl; 2 mmol/L MgCl_2 ; 0.001% 明胶; 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs; 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 单寡核苷酸引物 (长度为 10 bp), 25 ng 基因组 DNA 和 0.5 单位 Taq DNA 聚合酶 (此酶分离自水生嗜热杆菌 *Thermus aquaticus* 的耐热性 DNA 聚合酶, 故称之 Taq DNA 聚合酶)。扩增反应需要 45 个循环, 每个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 中延伸 2 min。反应在基因扩增仪中进行。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分离, 用 0.5 mg/mL 溴乙锭 (EB) 染色, 在紫外灯下观察照像。整个分析仅需要 2 d 即可完成。

2 RAPD 技术与桂花品种分类与鉴定

中国是木犀属 (*Osmanthus* Lour.) 植物世界分布中心, 种质资源十分丰富, 栽培历史源远流长, 特别是桂花, 它是我国特有的名贵花木和香料植物, 是兼有生态效益、社会效益和经济效益的优良园林树种之一, 由于在长期栽培过程中, 通过人工选择和自然杂交, 产生了种内多样性的性状变异, 形成了众多的品种, 而且随着野生桂花资源的不断引种栽培, 杂交育种工作的普遍开展, 桂林栽培品种还将大大增加, 但是桂花同其它传统名花如牡丹、梅花等不同, 由于桂花花型简单, 赖以鉴别品种的花部特征较少, 同时营养器官性状变异显著, 因而桂花分类难度较大, 目前在形态分类和品种区分上存在着不同看法。

牧野富太郎将桂花种下定为银桂 (*O. fragrans* Lour. var *latifolius* Mak.)、金桂 (*O. fragrans* Lour. var *thunbergii* Mak.)、丹桂 (*O. fragrans* Lour. var *aurantiacus* Mak.) 3 个变种^[3], 而 Green^[4]却认为牧野所定的金桂、银桂两变种为桂花的异名, 并将丹桂作为一个变型 (*O. fragrans* f. *aurantiacus* (Lak.) P. -S. Green)。Nakai^[5]则将银桂定名为 *O. asiaticus* Nakai, 也有人将四季桂作为变种 *O. fragrans* var *samperflorens* Hort. 朱长山等^[3]将桂花分为 4 个品种群。刘玉莲^[6]提出了桂花品种分类的五级标准, 根据这五级标准将其分为四季桂类 (有四季桂型) 和秋桂类 (有银桂型、金桂型、丹桂型)。陈建业等^[7]根据过氧化物酶谱聚类分析将其分为 3 个品种群即金桂品种群、丹桂品种群和银桂

品种群。从现状来看,对桂花品种分类还缺乏沟通和统一,品种、杂交种分类鉴定极为困难。因此迫切需要提高桂花品种分类的可靠性和准确性,对较多的不同品种作出较科学的分类;弄清桂花种质资源进化关系和演化变异途径,这样才能不断地发掘和培育新品种。RAPD技术的应用,为这一问题的解决提供了可能性。

使用不同单寡核苷酸作为引物进行PCR反应获得不同长度的DNA片段,将它们作为鉴定不同分类等级的分子性状。对任何使用的引物,扩增的RAPD产物大致可分为2类:即可变类(多态性)和不变类(单态性)。这两类片段均作为不同分类运算单位(OTU)进行统计分析,即根据DNA片段差异计算出遗传距离或相似系数,建立系统学或谱系关系。目前RAPD技术在种类、品种分类与鉴定中已做了许多研究。如在种类鉴定方面有丁香属^[8]、鸢尾属^[9]等研究;在品种分类鉴定方面有葡萄^[10]、番木瓜^[11]、月季^[12]、牡丹^[13]等研究。这些研究证明,RAPD技术不受植物栽培条件、发育阶段、取样部位等影响,能够精确地从混杂的种质中鉴定出相同的无性系或品种,这在桂花的品种分类鉴定中是值得借鉴的,也提供了极大的可能性。RAPD技术整个过程仅需2d时间,所用样品少(只需1cm²叶片组织和0.5g幼芽),一天能抽提数百份样品,是一种理想的分类鉴定手段。

因此,建议桂花研究工作者能够尽早开展这方面的研究,将RAPD技术应用到桂花品种分类鉴定中,为桂花品种杂交育种、名称登记注册、植物专利保护提供重要科学依据。

参 考 文 献

- 1 William JGK *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990, **18**: 6531~6535
- 2 Welsh J, Mc Clelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990, **18**: 7213~7218
- 3 朱长山等. 河南桂花品种的分类研究. *河南农业大学学报*, 1992, **26** (2): 194~201
- 4 Green P S. A monographic revision of *Osmenthus* in Asia and America. *Notes Bot. Gard Edinb.* 1958, **22**: 435~542
- 5 Nakai T. Trees and shrubs indigenous Japan proper. *Bot. Mag. Tokyo.* 1924
- 6 刘玉莲. 桂花品种分类及木犀属种质资源的利用. *中国桂花*, 1992, **1**: 10~14
- 7 陈建业等. 河南桂花品种过氧化物同工酶研究. *园艺学报*, 1995, **22** (2): 176~180
- 8 Marsolais JV *et al.* Analysis of Genetic relationship among lilacs by RAPD. *Taxon.* 1993, **42**: 531~537
- 9 Arnold MI *et al.* Rapid identification of markers linked to a *P. pseudomoues* resistance gene in tomato by using random primers and rear isogenic lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. USS.* 1991, **88**: 1398~1402
- 10 张立平等. 利用RAPD对葡萄属的分类研究. *园艺学报*, 1996, **24** (5): 310~311
- 11 Rowland L J, Levi A. Isolation of DNA from plant high in polyphenolics. *Theor. Appl Genet.* 1994, **87**: 863~868
- 12 Torres AM *et al.* Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. *Hortscience*, 1993, **22**: 333~334