

柱花草 RAPD 反应体系的建立及其 8 个品种遗传多样性分析

蒋昌顺^{1,2}, 葛琴雅¹, 邹冬梅², 梁英彩³, 张义正¹

(1. 四川大学生命科学学院, 四川成都 610064; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南儋州 571737; 3. 广西畜牧研究所, 广西南宁 530001)

摘要: 采用两种不同的方法分别从柱花草嫩叶及种子萌发中提取了高质量的 DNA, 并对柱花草 RAPD 反应中的各组分浓度及热循环因素进行优化, 建立了柱花草 RAPD 反应的最佳条件。在此基础上, 用 20 条随机引物对 8 个柱花草品种进行了 RAPD 扩增, 结果表明, 其多样性达 51.9%, 品种间的遗传相似系数在 0.53~0.88 之间, 根据非加权成对平均数法(UPGMA)进行分类, 获得了品种聚类树形图, 8 个柱花草品种均被明显分开。

关键词: 柱花草; RAPD 反应体系; 遗传多样性

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)03-0243-05

Developing RAPD system for *Stylosanthes* and genetic diversity analysis of eight varieties

JIANG Chang-shun^{1,2}, GE Qin-ya¹, ZOU Dong-mei²,
LIANG Ying-cai³, ZHANG Yi-zheng¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. The Institute of Tropical Crop Germplasm, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Danzhou 571737, China; 3. Guangxi Institute of Animal Science, Nanning 530001, China)

Abstract: High quality DNA was extracted from the young leaves and seedlings of *Stylosanthes* with two different methods, respectively. The RAPD reaction system for *Stylosanthes* was developed after optimizing the concentrations of Mg²⁺, dNTPs, Taq DNA polymerase and template DNA. Eight varieties of *Stylosanthes* spp. were analyzed by RAPD for genetic diversity. RAPD analysis was performed using twenty primers, and a 51.9% level of polymorphism was found. The dendrogram was constructed with UPGMA(unweighted pair group method of averages)based on the RAPD data, and it showed genetic similarity from 53% to 88% among varieties.

Key words: *Stylosanthes*; RAPD reaction system; genetic diversity

柱花草(*Stylosanthes* spp.)又名笔花豆,为豆科柱花草属多年生半直立草本植物,原产中南美洲、热带北美洲、非洲及东南亚(Edey 和 Cameron,

1984)。它们中的许多种是优良的热带豆科牧草,可用于青饲料和干草粉生产、放牧、水土保持、胶园、果园覆盖及绿肥作物等。我国于 50 年代后期开始从

收稿日期: 2003-06-09 修订日期: 2003-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30160046);海南省地方配套基金项目。

作者简介: 蒋昌顺(1967-),男,广西全州人,博士生,副研究员,主要从事植物分子遗传学及基因工程研究。E-mail: changshunj@yahoo.com.cn

东南亚国家引进该牧草,并通过引种选育,先后培育了8个品种(邹冬梅等,2002),现已在广东、广西、海南、福建、云南、四川省攀枝花等地大面积种植并利用(蒋昌顺,1995)。然而,目前对柱花草品种的遗传变异知之甚少,特别是从分子水平鉴别它们的差异更是空白。RAPD(Random amplified polymorphic DNA)技术(Williams等,1990)与其它分子标记如:RFLP、SSR、AFLP等相比,具有操作简单、实验周期短、DNA用量少、检测位点多等优点,已广泛用于品种鉴定、种群基因分析及遗传图谱构建等方面,尤其在植物种质资源多样性和品种鉴定研究中,RAPD技术以其快速、低价和较为理想的结果而受到高度重视。本研究旨在建立柱花草 RAPD 反应

体系并分析我国现已选育的柱花草品种,为今后柱花草品种鉴定、种质资源开发及育种提供分子证据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

我国选育的8个柱花草品种(表1),并分别由育成单位提供种子50g。

1.2 化学试剂

试验所用 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自大连宝生生物工程公司;所用引物(表2)由上海生物工程公司合成;电泳级琼脂糖为西班牙公司产品,其它化学药品均为国内公司生产。

表1 供试柱花草品种
Table 1 *Stylosanthes* varieties used in this study

编号 No.	品种 Varieties	特点 Characteristics	育成单位 Breeding unit
1	热研2号柱花草 <i>S. guianensis</i> cv. Reyan No. 2	早熟、高产 Early mature and high yield	中国热带农业科学院 CATAS
2	热研5号柱花草 <i>S. guianensis</i> cv. Reyan No. 5	早熟、产量中等 Early mature and medium yield	中国热带农业科学院 CATAS
3	热研7号柱花草 <i>S. guianensis</i> cv. Reyan No. 7	晚熟、高产 Later mature and high yield	中国热带农业科学院 CATAS
4	热研10号柱花草 <i>S. guianensis</i> cv. Reyan No. 10	晚熟 Later mature	中国热带农业科学院 CATAS
5	西卡柱花草 <i>S. scabra</i> cv. Seca	抗炭疽病 Anthracnose resistance	中国热带农业科学院 CATAS
6	有钩柱花草 <i>S. hamata</i> cv. Verano	抗炭疽病 Later mature	广东省畜牧局 Guangdong Provincial Animal Bureau
7	格拉姆柱花草 <i>S. guianensis</i> cv. Graham	早熟、易感病 Early mature and susceptible	广西畜牧研究所 Guangxi Institute of Animal Science
8	907 柱花草 <i>S. guianensis</i> cv. 907	抗病、高产 Anthracnose resistance and high yield	广西畜牧研究所 Guangxi Institute of Animal Science

1.3 DNA 提取方法

1.3.1 柱花草嫩叶总 DNA 提取法 根据 Weeks 等(1986)建立的 CTAB 法,并略作修改,具体方法如下:从10株盆栽的柱花草植株上采集嫩叶约0.40g并在液氮中研磨成细粉末;将研磨后的细粉末转至1.5 mL 的离心管中;加入600 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 DNA 抽提缓冲液(2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 0.2% β -巯基乙醇),混匀后,在65 $^{\circ}$ C 水浴中放置30 min;分别用600 μ L 的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)抽提;离心收集上清液至无菌的 eppendorf 管中;用等体积的异丙醇和1/10 体积的3 mol/L 醋酸钠(pH5.2)沉淀 DNA;离心收集 DNA,并在室温下凉干;加入200 μ L 的 TE 缓冲溶液(pH8.0)直至完全溶解 DNA;加入10 μ L RNase(10 μ g/ μ L),并于37 $^{\circ}$ C 水浴中保温1 h;用紫

表2 试验所用引物
Table 2 Primers used in this study

引物编号 Primer No.	序列(5'-3') Sequence	引物编号 Primer No.	序列(5'-3') Sequence
1	CTGCTGGGAC	11	AGCCAGCGAA
2	GTTGCGATCC	12	TGAGTGGGTG
3	CAGCACCCAC	13	CTGACCAGCC
4	CCGAATTCGC	14	ACGCACAACC
5	ACTTCGCCAC	15	TGGAGAGCAG
6	GGTGCGGGAA	16	TGCCCAGCCT
7	TCTCAGCTGG	17	ACGCACAACC
8	GTAACCTGCT	18	TCGGACGTGA
9	CCGAATCCC	19	GACGCCACAC
10	CTGGGGACTT	20	CTACTGCCGT

外分光光度计测定 DNA 的含量;然后用0.8%的琼脂糖电泳,检测 DNA 的质量,-20 $^{\circ}$ C 条件下保存 DNA。

1.3.2 柱花草种子萌发 DNA 提取法 根据 SDS 法(Liu 和 Musial, 1997), 并略作修改。具体方法如下: 取 20 粒柱花草种子先用浓硫酸处理 1 min, 蒸馏水冲洗后凉干, 然后分别用 3.0% 次氯酸钠、70% 酒精进行表面灭菌 15 min, 再用无菌蒸馏水冲洗 3~4 次, 并将种子放在含有湿润滤纸的培养皿中发芽生长 5~6 d; 取约 10 棵种子萌发在液氮中研磨成细粉末; 将研磨后的细粉末转至 1.5 mL 的离心管中; 加入 600 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 DNA 抽提缓冲液(2% SDS, 0.1 mol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)) 并混匀, 后续的 DNA 抽提、溶解、检测和保存与嫩叶总 DNA 提取方法相同。

1.4 RAPD 扩增反应

(1) 扩增反应在 0.5 mL 离心管中进行, 25 μ L 的反应体系中含有: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 0.2 μ mol/L 碱基引物 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 1.2 U, DNA 模板 25 ng, 其余体积以无菌超纯水补足。利用 MJ RESEARCH 公司的 PTC-100™ Programmable Thermal Controller 扩增仪进行扩增。

(2) 扩增反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 39 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

(3) 电泳及照相: 取 18 μ L 的 PCR 扩增产物与 2 μ L 10 \times 的加样缓冲液混匀, 在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 5 V/cm 的条件下电泳 2 h。电泳结束后, 用 0.5% 溴化乙锭染色, 然后用凝胶成像系统(GDS)照相。

1.5 RAPD 反应条件优化

确定最佳反应条件时, 对反应体系的因素设立不同的梯度水平: Mg²⁺ 浓度分别设置为 1、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 mmol/L; 模板 DNA 量分别用 25、50、75、100 ng; Taq DNA 聚合酶用量分别为 0.8、1.0、1.2、1.5 U; dNTPs 浓度分别为 200、250、300 μ mol/L; 退火温度分别设置为 37、38、39、40 $^{\circ}$ C; 72 $^{\circ}$ C 延伸时间分别为 30、60、90、120 s; 热循环数分别为 30、35、40。在整个反应过程中, 除对上述因素进行梯度设置而变动外, 其余参数和反应条件不变, 并相应地调整无菌的超纯水量以保证反应体系为 25 μ L。

1.6 RAPD 数据分析

分析 20 对引物对 8 个柱花草品种所产生的

RAPD 标记, 并将每个标记定为独立的性状, 有带的记为 1, 没有带的记为 0。按照以下公式计算品种间的遗传相似系数: $G_s = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 G_s 代表两个品种间的遗传相似系数, N_{xy} 代表两个品种共有的带谱数, N_x 与 N_y 分别代表每个品种总的带谱数; 品种间的遗传距离 $D = 1 - G_s$ 。利用 NTSYS-pc 软件(Version 2.0)(Rohlf, 1994) 进行品种相似性分析, 选用其中的 DICE 功能计算相似系数, 按照 UPGMA 分类法进行聚类, 通过软件中的 TREE 功能显示出聚类树形图。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取方法

本试验所改进的柱花草嫩叶 DNA 提取法和种子萌发 DNA 提取法所提取的 DNA 具有纯度高、质量好、产率高等优点; 其 DNA 的 A260/A280 值分别为 1.82、1.85; 且 DNA 没有降解(图版 I: 图 1); 上述两种 DNA 提取方法的产率分别为 190、210 μ g。说明这两种 DNA 提取方法是切实可行的。

2.2 RAPD 反应条件比较

RAPD 反应条件, 主要包括反应体系和热循环。由于 RAPD 对反应体系要求严格, 扩增反应中各成分的变化都可能影响扩增结果。因此, 对影响 RAPD 反应结果的主要因素: 模板 DNA 量、Taq DNA 聚合酶用量、Mg²⁺ 浓度、dNTP 浓度等进行比较试验, 确定最优的反应体系。在热循环条件中, 主要探索了退火温度、延伸时间和热循环数。至于延伸温度, 是由于 Taq DNA 聚合酶本身的特性所决定的, 一般不需要调整。

2.2.1 Mg²⁺ 浓度 Mg²⁺ 是 RAPD 反应中的一个重要因素, Mg²⁺ 为 Taq DNA 聚合酶的激活剂, 其浓度不仅影响酶的活性及合成的可靠性, 而且还影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成。在实验中共设定了 6 个 Mg²⁺ 梯度, 从图版 I: 图 2-A 的扩增结果可知, Mg²⁺ 浓度在 1.5~2.0 mM 时, 能产生较多的清晰带型, 其它 Mg²⁺ 浓度则出现非特异性扩增。因此, 对于柱花草 PCR 扩增, 选择 1.5~2.0 mM 的 Mg²⁺ 浓度, 可获得最佳的扩增效果。

2.2.2 Taq DNA 聚合酶浓度 Taq DNA 聚合酶浓度是扩增反应的关键因素, 改变 Taq DNA 聚合酶浓度, 从低到高共设置 4 个 Taq DNA 聚合酶浓度

梯度。由图版 I :图 2-B 可见,在 25 μ L 的反应体系中,使用 1.2 U 的 Taq DNA 聚合酶浓度最经济有效,扩增效果最佳。

2.2.3 DNA 模板浓度 不同植物 PCR 反应中其 DNA 模板浓度有差异,在本试验 25 μ L 的 RAPD 反应中进行了 4 种模板浓度的比较(图版 I :图 2-C),使用 25 ng 的模板 DNA 所扩增的带最清晰,模板 DNA 量过高,会出现弥散不清的带型。

2.2.4 dNTP 浓度 三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)作为 PCR 反应的原料,其浓度的大小直接影响产物的

产量、特异性及合成的可靠性。实验中共设置 4 个梯度。结果表明,dNTP 的浓度在 0.2~0.25 mM 时,产生条带多且清晰;当其浓度达到 0.3 mM 时,出现的条带较少(图版 I :图 2-D)。当 dNTP 浓度过高时,容易与 Mg^{2+} 结合而降低游离 Mg^{2+} 浓度,从而影响 Taq DNA 聚合酶的活性。

2.2.5 热循环优化 实验结果表明:PCR 扩增时,94 $^{\circ}$ C 先预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,39 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 S,共 35 个循环,扩增效果最好(图略)。

表 3 八个柱花草品种间的遗传距离

Table 3 Genetic distance among 8 *Stylosanthes* varieties

品种 Varieties	格拉姆 Graham	热研 10 号 No. 10	热研 5 号 No. 5	907907	热研 7 号 No. 7	热研 2 号 No. 2	西卡 Seca	有钩 Verano
格拉姆 Graham	0							
热研 10 号 No. 10	0.407 4	0						
热研 5 号 No. 5	0.367 4	0.222 2	0					
907	0.411 8	0.203 8	0.142 9	0				
热研 7 号 No. 7	0.518 6	0.315 8	0.269 2	0.250 0	0			
热研 2 号 No. 2	0.411 8	0.236 4	0.250 0	0.122 4	0.314 8	0		
西卡 Seca	0.463 0	0.453 2	0.450 0	0.459 0	0.523 8	0.433 3	0	
有钩 Verano	0.532 3	0.426 5	0.470 0	0.454 4	0.492 6	0.430 8	0.375 0	0

2.3 8 个品种的 RAPD 分析

2.3.1 多态性分析 用 20 条随机引物对 8 个柱花草品种进行了 RAPD 扩增,建立了 DNA 指纹图,所获得的带型清晰明显。图 3 表示的是以引物 1 和引物 4 对 8 个柱花草品种扩增产物电泳结果。每条引物扩增的条带数在 11~14 的范围,条带的大小为 300~2500 bp。共获得 241 条带,其中特异性带 105 条,平均多态性为 51.9%。

2.3.2 遗传距离 对 8 个柱花草品种间的遗传距离分析表明,有钩柱花草与格拉姆柱花草间的距离最大,达 0.532 3,其次为西卡柱花草与热研 7 号柱花草,距离为 0.523 8,热研 2 号柱花草与 907 柱花草的距离最小,为 0.122 4(表 3)。

2.3.3 聚类分析 按照 UPGMA 法(非加权平均平均数)对 8 个柱花草品种进行聚类分析,获得了的聚类树形图(图 1),8 个品种被明显分开。它们的遗传相似系数在 0.53~0.88 之间;西卡与有钩柱花草的关系密切,聚为一支,其它圭亚那种(格拉姆、热研 10 号、热研 5 号、907、热研 2 号、热研 7 号)构成另一分支。热研 10 号与热研 5 号、907、热研 2 号的关系较近,其中热研 2 号与 907 柱花草的关系最近,两

者的相似系数高达 0.88。

3 结论与讨论

本试验改进了柱花草嫩叶及其种子萌发芽的 DNA 提取方法,建立了柱花草的 RAPD 反应体系并对其条件进行了优化,同时用该技术分析了 8 个柱花草品种的遗传多态性,如:多态性水平、遗传距离及其聚类。以 20 条随机引物对 8 个柱花草品种分析结果表明:它们的平均多态性为 51.9%,遗传相似系数在 0.53~0.88 之间,热研 2 号柱花草与 907 柱花草遗传相似系数最大,为 0.88;通过聚类分析,8 个柱花草品种被明显分开。西卡与有钩关系密切,聚为一支,其它圭亚那种(格拉姆、热研 2 号、热研 5 号、907、热研 7 号、热研 10 号柱花草)构成另一分支。907 柱花草是以热研 2 号为材料经辐射育种所得(梁英彩等,1998),本试验结果也与此相吻合。柱花草是一类重要的热带豆科牧草,本试验所建立的 RAPD 反应条件及其 8 个柱花草品种的 DNA 指纹图,对于柱花草品种以及其它柱花草种质的鉴定有重要意义。

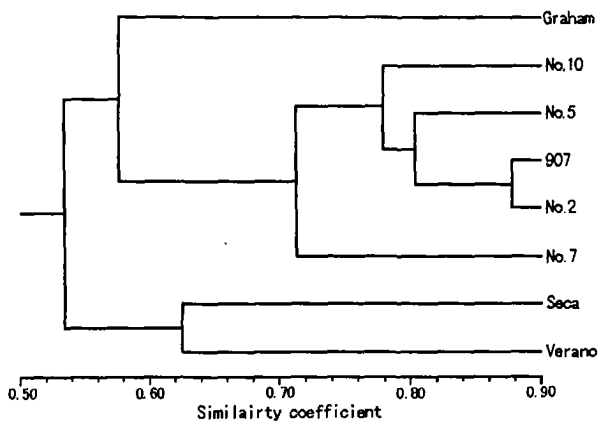


图 1 八个柱花草品种的聚类树形图

Fig. 1 Dendrogram obtained from RAPD data of eight *Stylosanthes* varieties by UPGMA

参考文献:

- Edye LA, Cameron DF. 1984. Prospects for *Stylosanthes* improvement and utilization[A]. In: Stace HM, Edye LA. The biology and agronomy of *Stylosanthes*[C]. North Ryde, NSW, Australia: Academic Press, 571-587.
- Jiang CS(蒋昌顺). 1995. Utilization and studies of *Stylosanthes* in China(我国对柱花草属不同种的研究与利用)[J]. *Tropical Crops Research* (热带作物研究), 61(3): 64-70.
- Liang YC(梁英彩), Lai ZQ(赖志强), Teng SH(腾少花), et al. 1998. Studies on breeding of stylo 907(柱花草的选育研究)[J]. *Pratacultural Science* (草业科学), 15(2): 27-29.
- Liu CJ, Musial JM. 1997. *Stylosanthes* sp. Aff. *S. scabra*: a putative diploid progenitor of *Stylosanthes scabra*(Fabaceae)[J]. *Plant Syst Evol*, 208: 99-105.
- Rohlf HJ. 1994. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. New York: Applied Biostatistica Inc., 1994.
- Weeks DP, Beerman N, Griffith OM. 1986. A small-scale 5-h procedure for isolating multiple samples of CsCl-purified DNA: applications to isolations from mammalian, insect, higher plant, algal, yeast, and bacterial sources[J]. *Anal Biochem*, 152: 376-385.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak J, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acid Res*, 18: 6 531-6 535.
- Zou DM(邹冬梅), Jiang CS(蒋昌顺). 2002. The Present Status and Prospect of Tropical Forages Breeding in China (我国热带牧草育种的现状与前景)[J]. *Grassland of China* (中国草地), 24(5): 65-68.
- Srivastava V, Ow DW. 2001. Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase-expressing contrast[J]. *Plant Mol Biol*, 46: 561-566.
- Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, et al. 2000. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency[J]. *Plant J*, 22: 461-469.
- Zubko E, Scutt C, Meyer P. 2000. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes[J]. *Nat Biotechnol*, 18: 442-445.
- Zuo J, Chua NH. 2000. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 11: 146-151.
- Zuo J, Niu QW, Moller SG, et al. 2001. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants [J]. *Nat Biotechnol*, 19: 157-161.

(上接第 274 页 Continue from page 274)

-5 051.

蒋昌顺, 等:

JIANG Chang-shun, *et al.*: Developing RAPD system for *Stylosanthes* and genetic diversity analysis of eight varieties

图版 I
Plate I



图 1 两种不同提取方法的柱花草 DNA 电泳。
Fig. 1 *Stylosanthes* DNA extracted with two methods separated on 0.8% agarose gel.

M; DNA 标准分子量; 1. 嫩片 DNA 提取法;
2. 种子萌芽 DNA 提取法。
M; λ DNA/Hind III marker (Sizes shown); 1. Young leaves DNA isolated with CTAB; 2. Seedling DNA isolated with SDS.

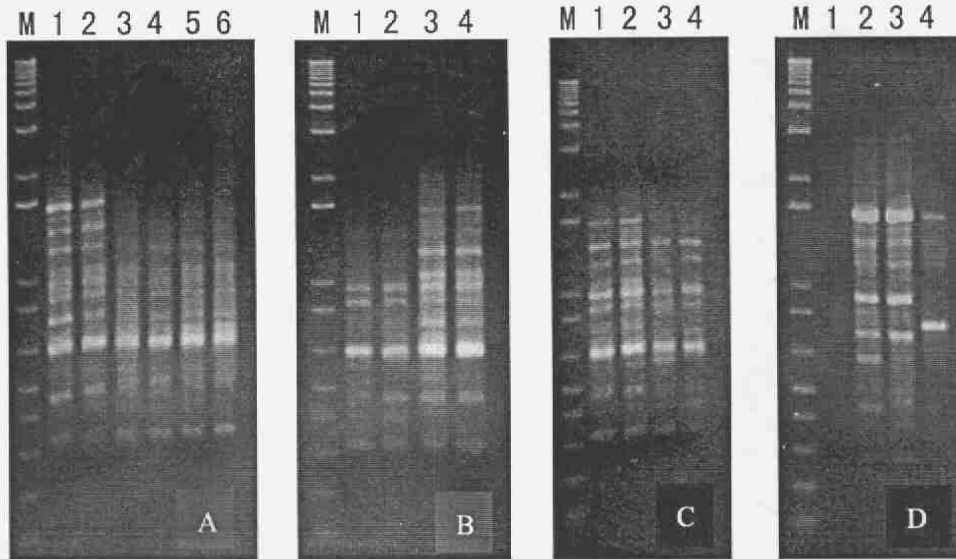


图 2 柱花草 RAPD 反应体系的建立

Fig. 2 Developing RAPD reaction system for *Stylosanthes*

A. 不同镁离子浓度条件下的扩增产物电泳 Electrophoresis of RAPD products with different Mg^{2+} concentrations (M; 1 Kb ladder; 1; 1.5 mM; 2; 2.0 mM; 3; 2.5 mM; 4; 3.0 mM; 5; 3.5 mM; 6; 4.0 mM); B. 不同酶浓度条件下的扩增产物电泳 Electrophoresis of RAPD products with different Taq DNA polymerase unit (M; 1 Kb ladder; 1; 0.8 U; 2; 1 U; 3; 1.2 U; 4; 1.5 U); C. 不同 DNA 模板浓度条件下的扩增产物电泳 Electrophoresis of RAPD products with different DNA concentrations (M; DNA Marker; 1; 25 ng; 2; 50 ng; 3; 75 ng; 4; 100 ng); D. 不同 dNTPs 浓度条件下的扩增产物电泳 Electrophoresis of RAPD products with different dNTP concentrations (M; 1 Kb ladder; 1; 0 mM; 2; 0.2 mM; 3; 0.25 mM; 4; 0.30 mM).

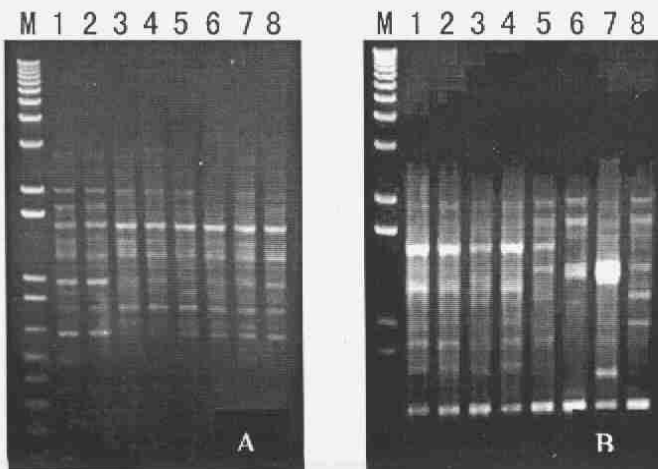


图 3 引物 1(A)和引物 4(B)对八个柱花草品种扩增的 RAPD 指纹图

Fig. 3 RAPD fingerprinting of eight *Stylosanthes* varieties

品种编号见表 1, M 为 1 Kb ladder.
A. Amplified products with primer 1; B. Amplified products with primer 4; The number of varieties is the same as that in the table 1 and M is 1 Kb ladder.

1004