

# 不同花色金盏菊的 RAPD 分析

许燕, 李建粤, 葛继林

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

**摘要:** 利用 RAPD 分析技术, 选取13个具有10个碱基长度的随机引物, 对开淡黄色花和橙色花的金盏菊进行了扩增反应. 在对扩增产物进行琼脂糖电泳后显示: 有9个随机引物扩增出条带, 一共扩增出条带89条, 平均每个随机引物扩增约10条; 在9个随机引物中, 有3个引物扩增的条带在两种不同花色金盏菊中有差异. 此项研究结果将为分析控制淡黄色和橙色花色有关的基因提供一点新的思路.

**关键词:** RAPD 分析; 随机引物; 金盏菊

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2001)02-0072-05

## 0 引言

自然界中不同种类的花卉, 颜色繁多, 但就每一种花卉而言, 颜色有限, 如玫瑰、康乃馨、郁金香等缺乏蓝色和紫色. 随着经济发展和社会进步, 人们对于花卉尤其是在花色上有新特点的品种需求越来越强烈, 因此, 花色改良一直是育种工作者的重要目标. 郑志亮等<sup>[1,2]</sup>认为花色是花瓣所含色素为主体呈现出来的. 色素可分为3大族群: 黄酮类色素(Flavonoids), 胡萝卜素类色素(Carote)及甜菜色素(Betalains), 有人<sup>[3]</sup>认为这3大类色素的合成均涉及到多个代谢步骤, 多种酶催化, 与之相关的结构基因及调控基因也可能较多, 它们的作用机理十分复杂, 缺乏相应基因会导致花某些颜色的缺失或改变.

近年来植物分子生物学的迅猛发展和基因工程的实用化, 为花卉性状改良提供了全新思路. 花卉基因工程已成为花卉育种最有前途的新技术. 改变花色的转基因花卉是基因工程中改良工作最多的方面<sup>[2-5]</sup>. MEYER<sup>[6]</sup>等(1987)首次将一个源于玉米的基因导入矮牵牛, 创造出新的花色. 还有人应用反义 RNA 技术抑制色素合成酶基因的表达, 达到修饰花色的目的, 并在矮牵牛上应用获得成功<sup>[2]</sup>. 基因工程进行花色改良首先需要获得目的基因, 有关花色素代谢相关基因的分离和研究一直是研究热点. 目前, 一大批调控植物花色的结构基因与调节基因已被分离和克隆<sup>[5,7]</sup>. 利用外源基因导入, 反义基因及共抑制原理已培育出了新色系观赏植物品种, 因此利用花色素代谢的有关基因, 对观赏植物的色彩改良具有十分广泛的前景.

90年代兴起的遗传标记技术——RAPD(Random amplified polymorphic DNAs, 随机扩增多态性 DNA), 具有简单、快速、灵敏度高且花费低、又不受环境条件和发育状况的影响等优点, 为基因

收稿日期: 2000-11-20

作者简介: 许燕(1962-), 女, 上海师范大学生命与环境科学学院副教授; 李建粤(1958-), 女, 上海师范大学生命与环境科学学院副教授.

定位和分离提供了十分有用的遗传工具. 目前 RAPD 用于基因定位和分离在植物上特别是在农作物上的进展较快<sup>[8]</sup>, RAPD 技术在园艺作物品种鉴定及系统分类上的应用也已有报道<sup>[9]</sup>. 然而 RAPD 分析这一新兴技术在花色基因的定位和分离方面的运用还很少, 怎样利用 RAPD 技术研究控制花色有关基因的筛选和定位问题还未见报道. 本研究以两种金盏菊为实验材料, 两者间除花色分别为淡黄色和橙色外, 别的性状皆一致. 经 RAPD 分析技术, 寻找它们之间可能存在的遗传差异, 并分析比较这些遗传差异与金盏菊控制不同花色形成的有关基因之间的联系, 为基因工程在花卉育种上的应用提供新的思路.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本试验材料有两个: 淡黄色和橙黄色金盏菊 (*Calendula officinalis L.*), 取自上海师范大学校园内.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 模板 DNA 制备

参照陈永强和 BENDICH 等人<sup>[10,11]</sup>的快速提取植物组织 DNA 的方法制备金盏菊总 DNA, 被提取的金盏菊 DNA 最终溶解在  $1 \times$  Tris-EDTA (TE) 中, 经紫外光谱测定浓度后置  $-20^{\circ}\text{C}$  备用.

#### 1.2.2 RAPD 分析

##### 1.2.2.1 引物

所有随机引物为上海生工生物工程有限公司产品, 每一随机引物为 10 个碱基的寡聚核苷酸, 实验使用 13 个引物的编号及其序列见表 1.

表 1 RAPD 扩增引物编号及其序列

编号	序列 (5'→3')	编号	序列 (5'→3')
S <sub>1</sub>	GTFTCGCTCC	S <sub>8</sub>	GTCCCAUACG
S <sub>2</sub>	TGATCCC TGG	S <sub>9</sub>	TGCGGGACTC
S <sub>3</sub>	CATCCCCCTG	S <sub>10</sub>	CTGCTGGGAC
S <sub>4</sub>	GGACTGGAGT	S <sub>12</sub>	CCTTGACGCA
S <sub>5</sub>	TGCGCCCTTC	S <sub>11</sub>	TCCGCTCTGG
S <sub>6</sub>	TGCTCTGCC	S <sub>13</sub>	TTTGCCCGGA
S <sub>7</sub>	GGTGACGCAG		

##### 1.2.2.2 基因组 DNA 扩增和电泳检测

RAPD 分析中所用药品及 DNA 标准分子量  $\lambda$ DNA/EcoR 1 + Hind III 也购自生工生物工程公司. DNA 扩增反应<sup>[12]</sup>在  $2.5 \times 10^{-5}$  L 混合液中进行, 其中  $10 \times$  缓冲液  $2.5 \times 10^{-6}$  L,  $\text{MgCl}_2$   $2.0 \text{ mmol/L}$ , 随机引物  $15 \text{ ng}$ , 模板 DNA  $40 \text{ ng}$ , 各种 dNTP  $200 \text{ umol/L}$ , Tag 酶  $1.0 \text{ U}$ , 用无菌去离子水补充至总体积  $2.5 \times 10^{-5}$  L, 再加  $2.0 \times 10^{-5}$  L 石蜡油覆盖.

PCR 循环系统:  $92^{\circ}\text{C}$  预变性  $10 \text{ min}$ ;  $92^{\circ}\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $38^{\circ}\text{C}$  退火  $1.0 \text{ min}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $2 \text{ min}$ , 如此循环 35 轮; 最后一轮延伸为  $72^{\circ}\text{C}$   $10 \text{ min}$ . 扩增产物在  $1.3\%$  琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭  $0.5 \text{ mg/L}$ ) 中电泳. 电压为  $60 \text{ V}$ , 电泳缓冲液为  $0.5 \times$  TBE. 电泳  $2 \sim 3 \text{ h}$  后在紫外分析仪下检测观察并照相记录.

应用复日 SmartView 生物电泳图象分析软件分析并作曲线.

##### 1.2.2.3 相似率分析

根据 Nei 等人的相似率分析公式进行数据分析<sup>[13]</sup>, 相似率 =  $(2 \times Nab) / (Na + Nb) \times 100\%$ , 其中 Nab 为样品 a 和 b 之间共有的 DNA 扩增带数目, Na 为样品 a 具有的 DNA 扩增带数目, Nb 为样品 b 具有的 DNA 扩增带数目.

## 2 结果及分析

### 2.1 引物的筛选

选用13个随机引物检测淡黄色和橙色金盏菊的基因组 DNA. 其中有4个引物( $S_4, S_7, S_8, S_{14}$ )未扩增出任何条带, 余下的9个引物能扩增出条带, 共产生89条清晰可辨谱带(表2). 通常在 RAPD 反应中产生的1条带代表基因组中的一个位点, 即这9个引物对两种金盏菊基因组的89个位点进行了检测. 其中每个引物对两个样品可扩增出2~15条可分辨的 DNA 片段, 9个引物对每个样品扩增出的 DNA 片段数分别为43条和46条, 与标准分子量 DNA 比较, 绝大多数扩增条带分子量大小在364~2000bp 之间.

表2 每个引物扩增的条带数及品系间的相似率

引物编号	扩增的条带数		相似率(%)
	橙 色	淡黄色	
$S_1$	6	6	100
$S_2$	4	4	100
$S_3$	8	7	93.3
$S_6$	6	6	100
$S_9$	3	3	100
$S_9$	6	9	80
$S_{10}$	6	7	92.3
$S_{12}$	3	3	100
$S_{14}$	1	1	100
扩增的条带总数	43	46	94.38

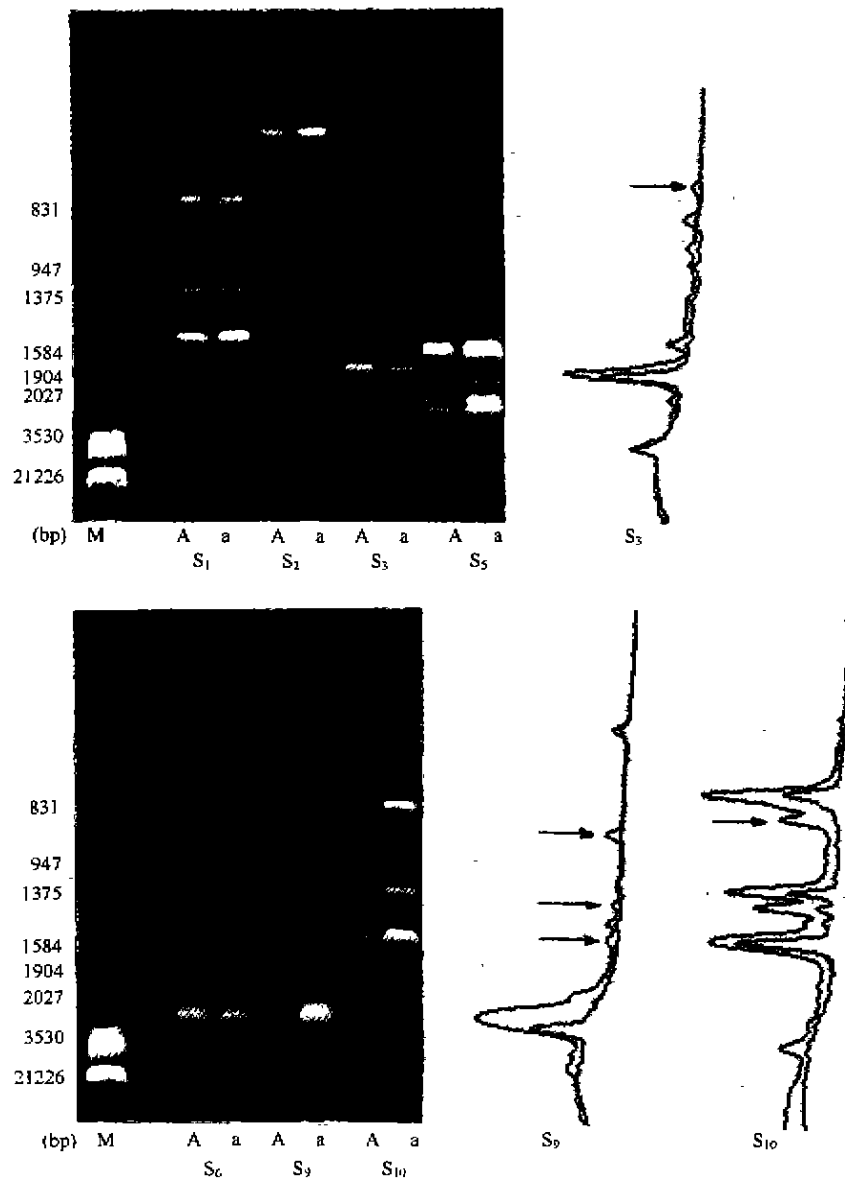
### 2.2 两个样品扩增的条带类型及相似率分析

实验结果显示大部分引物扩增出的条带类型对两种不同花色的金盏菊来说, 无多态性差异, 但是  $S_3$  引物在橙色金盏菊中扩增出的8条带(图1), 其中有一条带在淡黄色金盏菊中没能扩增出, 相反  $S_9$  和  $S_{10}$  引物在淡黄色金盏菊中分别各多扩增出3条带和1条带, 而这些条带在橙色金盏菊中都没能扩增出. 按相似率分析法计算两个样品基因组之间的相似率, 结果见表2. 两个样品之间的差异带数为5条, 占其总带数的5.62%, 两种花色的金盏菊基因组之间的相似率为94.38%.

## 3 讨 论

RAPD 是由 WILLIAMS<sup>[14]</sup> 和 WELSH<sup>[15]</sup> 于1990年首先提出, 已在许多领域得到广泛运用. 刘春林等<sup>[16]</sup> 认为, 在属、种内和群体内, 特定大小的 RAPD 片段具有序列同源和遗传相关性的假设是普遍有效的<sup>[17]</sup>, 即具有相似分子量的扩增 DNA 片段通常显示出遗传相似性. 从实验结果看, 13种引物中只有3种引物能扩增出金盏菊淡黄色和橙色两个品种之间有差异序列的 DNA 片段. 经

RAPD 分析两者基因组相似率为 94.38%,说明这两种材料在遗传关系上非常接近,这与事实情况一致,实验所取的材料是除了花色有差异外,其余性状完全一致的同一种植物,但是  $S_3$ ,  $S_9$ ,  $S_{10}$  3 种随机引物能扩增出有差异序列的 DNA 片段,某种随机引物在两种不同生物基因 DNA 上,结合位点的数目和位置不同,就会产生不同的扩增产物,这反映了两种不同生物基因组 DNA 碱基序列的差异.据报道,近等基因系(NILs)几乎仅在目标性状上存有差异,因此,一般凡是能在近等基因系间揭示多态性的分子标记,就极可能位于目标基因的两翼附近<sup>[18]</sup>,因此,利用 RAPD 对两个近等基因系进行分子标记,是进行快速基因定位的有效方法.



M: MARK(标准分子量 DNA); A:橙色金盏菊; a:淡黄色金盏菊  
箭头所指处为多扩增出的条带

图 1 随机引物  $S_3$ ,  $S_9$ ,  $S_{10}$  的 RAPD 扩增带谱及扫描曲线

目前利用 NILs 已定位了一些农作物质量性状基因,例如番茄抗病毒基因 Tm-2a,园艺作物在

这方面研究报道较少. 由于所选用的材料, 除了花色不同外, 其余性状完全相同, 可以被看作是二个近等基因系, 那么在本试验中两者基因组之间存在5.62%的差异, 也许正反映了两种不同花色金盏菊在控制花色表达目的基因上的差异.

## 参考文献:

- [1] 郑志亮. 花卉作物的花色基因工程[J]. 福建农业科技, 1996(1): 24-25.
- [2] 傅荣昭, 马江生, 曹光诚, 等. 观赏植物色香形基因工程研究进展——文献综述[J]. 园艺学报, 1995, 22(4): 381-385.
- [3] 何小玲, 王金发. 观赏花卉的品质基因及其基因工程问题[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(6): 462-465.
- [4] 苏焕然, 张丹, 汪清胤, 等. 花卉基因工程研究进展[J]. 北方园艺, 1996(4): 26-30.
- [5] 余迪求, 李宝健. 花色素苷生物合成的遗传和发育调控[J]. 植物生理与分子生物学, 1997, 33(11): 365-370.
- [6] MEYER P, HEIDMANN I, FORKMANN G, et al. A new petunia flower colour generated by transformation of mutant with maize gene[J]. Nature, 1987, 330: 677-678.
- [7] 包满珠. 植物花青素基因的克隆及应用[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 279-284.
- [8] 刘旭东, 相建海. 新的遗传标记技术——RAPD 及其在遗传分析中的应用[J]. 海洋科学, 1996(4): 45-47.
- [9] 梁红健, 刘敏, 钟志宇等. 中国部分兰花品种 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 1996, 23(4): 365-370.
- [10] 陈永强. 植物组织 DNA 提取的一种快速方法[J]. 遗传, 1979, 1(1): 39-40.
- [11] BENDICH A J, BOLTON E T. Relatedness among Plants as Measured by the DNA-Agar Technique[J]. Plant Physiology, 1967, 42(7): 959-967.
- [12] 戴思兰, 陈俊榆, 李文彬. 菊属植物 RAPD 反应体系的建立[J]. 北京林业大学学报, 1996, 18(1): 46-51.
- [13] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5267-5273.
- [14] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K L, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [15] WELSH J, MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [16] 刘春林, 官春天, 李树. 植物 RAPD 标记的可靠性研究[J]. 生物技术通报, 1999(2): 31-34.
- [17] 李常保, 宋建成. RAPD 标记与作物改良[J]. 生物技术通报, 1998(6): 20-27.
- [18] 张德水, 陈受宜. DNA 分子标记、基因组作图及其在植物遗传育种上的应用[J]. 生物技术通报, 1998(5): 15-22.

## RAPD Analysis in the Different Color-flowered *Calendula officinalis*

XU Yan, LI Jian-yue, GE Ji-lin

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Teachers University, Shanghai 200234)

**Abstract:** The RAPD markers generated by 13 random primers, 10bp in every one, discriminated light Yellow-flowered and orange-flowered *Calendula officinalis*. 89 bands were amplified from 9 among 13 primers used, the average bands of each primer were 10. The results indicated that three primers ( $S_5, S_9, S_{10}$ ) of used could reveal polymorphisms between two kinds of color-flowered.

**Key words:** random amplified polymorphic DNA; random primers; *calendula officinalis*