

椰子种质资源 RAPD 标记研究中的引物筛选

李和帅^{1,2}, 李辉亮², 范海阔¹, 黄丽云¹, 唐龙祥^{1*} (1. 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南海口 571101)

摘要 [目的] 对椰子遗传多样性进行深入研究, 为进一步开发利用椰子种质资源奠定基础。[方法] 利用 80 个 10 碱基随机引物, 对中国海南、云南、广东、广西等椰子种植区所采集的 67 个椰子种质进行随机扩增, 以筛选适合于对所有椰子品种进行 RAPD 分析的引物。[结果] 共筛选出 30 条能扩增出条带清晰、明亮、具多态性且重复性好带型的有效引物。12 个随机引物在所有样品中共扩增出 340 条带, 即检测到 340 个椰子 RAPD 位点, 其中 307 个位点为多态性位点, 占总位点的 90.3%。[结论] 利用 RAPD 标记技术对椰子大量样品的系统分析, 为椰子的品种鉴定、遗传育种及种质资源的保护与利用提供了依据和背景资料。

关键词 椰子; RAPD 标记; 引物; 筛选

中图分类号 S667.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)26-11245-03

Primers Screening in the Study on Coconut Germplasm Resources with RAPD Markers

LI He-shuai et al (Coconut Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339)

Abstract [Objective] The aim was to study the genetic diversity of coconut deeply in order to lay the foundation for the development and utilization of coconut germplasm resources. [Method] 67 coconut germplasm collected from coconut planting areas such as Hainan, Yunnan, Guangdong and Guangxi were used for random amplification by using 80 random 10-base primers to screen the suitable primers for RAPD analysis of all coconut varieties. [Result] 30 effective primers amplifying clear and bright bands with polymorphism and good reproducibility were screened. 340 bands were amplified in all the samples with 12 random primers, which showed that there were 340 RAPD loci detected in the coconuts. Among these loci, there were 307 polymorphic loci, accounting for 90.3% of total. [Conclusion] The systems analysis on a great deal of coconut samples by using RAPD marking technology provided the basis and background information for variety identification, genetic breeding and the protection and utilization of germplasm resources.

Key words Coconut; RAPD markers; Primers; Screen

DNA 分子标记技术是指通过直接分析生物个体或种群间遗传物质的多态性来诊断生物内在基因分布规律及其外在性状表现规律的技术。任何生物种或个体都具有特定的 DNA 多态性, 通过直接分析 DNA 的多态性便能避开遗传特性表现过程中的环境因素、数量性状遗传、部分与完全显性的干扰, 快速而准确地测定 DNA 的差异性。

1990 年, Williams 等和 Welsh 等几乎同时建立了随机扩增多态 DNA (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记技术^[1], 这种标记技术可以在 DNA 序列信息未知的情况下, 对物种基因组进行分析, 而且成本低、快速、灵敏, 所需 DNA 的量少, 不需放射性同位素标记, 用溴化乙锭染色后即可直接观察记录, 因而倍受生物学家的青睐。由于 RAPD 标记技术应用随机引物, 当对大量实验材料进行研究时, 往往首先要对引物进行筛选^[2]。

椰子 (*Cocos nucifera* L.) 为棕榈科椰子属常绿乔木, 广泛分布于世界热带与亚热带地区, 在我国主要分布于海南省, 其他如云南、广西、广东、台湾等省区也有少量分布。为进一步开发利用椰子种质资源, 有必要对其遗传多样性进行深入研究。国外曾利用 SSR^[3-8]、RAPD^[9-11]、AFLP^[8]、ISSR^[12]、QTL^[13-15] 等标记技术对部分椰子品种进行过研究, 但国内尚未见利用 RAPD 标记技术对椰子种质资源进行系统研究的报道。为便于更有效地利用 RAPD 技术对椰子种质资源进行遗传分析, 笔者利用 67 个椰子种质材料, 通过 RAPD 标记技术对 80 个 10 碱基的随机引物进行筛选。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验材料主要采自海南文昌中国热带农业科学院椰子研究所椰子种质资源圃, 另外还到海南其他市县、云南、广西、广东等椰子种植区采集, 材料均为叶片。该试验的主要目的是对椰子种质资源 RAPD 分析所需引物进行筛选, 所以所选材料尽量代表不同的遗传背景。取样时选取健康植株嫩叶, 采下叶片后置于冰盒中带回实验室, 置于 -70 °C 冰箱中保存备用。

1.2 主要试剂 提取 DNA 的试剂均为国产分析纯; PCR 实验所用 10 × Buffer、MgCl₂、dNTP、Taq DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司; 引物购自北京三博远志公司; DL 15000 DNA Marker、DL 2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; 电泳所用染料 DNA Stainer 购自北京赛百盛公司。

1.3 基因组 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法^[10,16] 提取椰子基因组 DNA。具体操作步骤: 分别取椰子的新鲜幼嫩叶片 2 g 左右, 置于研钵中, 加入液氮, 迅速研磨成粉末状, 转入 2 ml 离心管中, 然后加入 500 μl CTAB 提取缓冲液 (2% W/V CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2% W/V PVP, 0.4% V/V 巯基乙醇), 65 °C 加热约 60 min, 取出冷却至室温, 加入 500 μl 氯仿-异戊醇 (24:1), 轻轻颠倒混匀, 12 000 r/min 离心约 10 min 使其形成分离相, 将上层水相分别转移至另一个 2 ml 离心管中, 加入等体积冰冻异丙醇使 DNA 沉淀, 将 DNA 挑出用 70% 酒精漂洗, 晾干后溶于 100 μl TE 中备用。

1.4 DNA 检测 用 Eppendorf 公司的 Biophotometer 紫外分光光度计分别测定不同样品的 DNA 溶液在 260 和 280 nm 波长下的 OD 值, 以及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值, 比值在 1.8~2.0 时, 可用于 RAPD 扩增。并测定所提取 DNA 的浓度 (μg/ml), 将样品 DNA 的浓度稀释至 50 ng/μl。将所得 DNA 样品用

基金项目 国家科技基础条件平台重点项目 (2005DKA21005-69); 中国热带农业科学院科技基金项目 (Rky0631)。

作者简介 李和帅 (1978-), 男, 湖南临武人, 在读硕士, 研究实习员, 从事椰子的种质资源及育种研究工作。* 通讯作者。

收稿日期 2008-06-30

0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 的完整性,以 DL 15000 DNA Marker 为分子标记,用 DNA stainer 染色,结果用 Tanon 成像系统照相记录。

1.5 PCR 反应及其产物电泳扩增反应 在 Biometra 的 PCR 仪上进行。20 μ l 反应液包括:10 \times PCR Buffer 2 μ l, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.25 mmol/L dNTP, 1 μ mol/L RAPD 引物, 0.75 U Taq DNA 聚合酶, 50 ng 模板 DNA。PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 90 s, 再做 36 个循环, 即每一个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 降温至 4 $^{\circ}$ C 取出点样或在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。扩增产物用 1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳, 以 DL 2000 DNA Marker 为分子标记, 用 DNA stainer 染色, 结果用 Tanon 凝胶成像系统照相记录。

1.6 RAPD 标记的数据获得与处理 在 RAPD 扩增结果电泳图谱中, 每一扩增条带代表引物的一个结合位点, 视为有效的分子标记^[17]。基于电泳迁移率相等的条带是相同 DNA 片段扩增产物的假设, 同一引物、同一位点用 DL 2000 DNA Marker 作为对照分子量大小标记。

2 结果与分析

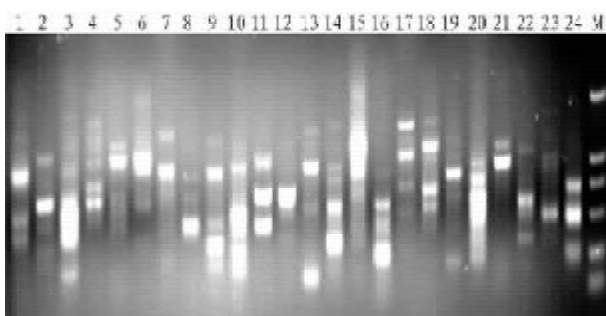
2.1 RAPD 标记的引物筛选结果 该试验所用 80 个引物及其序列见表 1。用 80 个引物对 67 个样品进行随机扩增, 以筛选出适合于对所有椰子品种进行 RAPD 分析的引物。共筛选出 30 条能扩增出条带清晰、具多态性、明亮且重复性好带型的有效引物(表 2)。读取这些谱带, 计算出样品间 RAPD 多态性位点的百分率为 90.3%。

一般来说, 在大部分样品中不能产生 DNA 扩增带的引

表 1 试验所用的引物及其序列

Table 1 Primer and its sequence in the test

引物 Primer	碱基序列(5'~3') Base sequence	引物 Primer	碱基序列(5'~3') Base sequence	引物 Primer	碱基序列(5'~3') Base sequence	引物 Primer	碱基序列(5'~3') Base sequence	引物 Primer	碱基序列(5'~3') Base sequence
C1	TTCGAGCCAG	C17	TTCCCCCAG	D13	GGGGTGACGA	E9	CTTCACCCGA	F5	CCGAATTCCC
C2	GTGAGGCGTC	C18	TGAGTGGGTG	D14	CTTCCCAAG	E10	CACCAGGTGA	F6	GGGAATTCGG
C3	GGGGTCTTT	C19	GTTGCCAGCC	D15	CATCCGTGCT	E11	GAGTCTCAGG	F7	CCGATATCCC
C4	CCGCATCTAC	C20	ACTTCGCCAC	D16	AGGGCGTAAG	E12	TTATCGCCCC	F8	GGGATATCGG
C5	GATGACCGCC	D1	ACCGCGAAGG	D17	TTTCCACGG	E13	CCCGATTCCG	F9	CCAAGCTTCC
C6	GAACGGACTC	D2	GGACCAACC	D18	GAGAGCCAAC	E14	TGCGGCTGAG	F10	GGAAGCTTGG
C7	GTCCCACGA	D3	GTCGCCGTCA	D19	CTGGGGACTT	E15	ACGCACAACC	F11	TTGGTACCCC
C8	TGGACCGGTG	D4	TCTGGTGAGG	D20	ACCCGGTCAC	E16	GGTACTGTG	F12	ACGGTACCAG
C9	CTCACCGTCC	D5	TGAGCGGACA	E1	CCCAAGGTCC	E17	CTACTGCCGT	F13	GGTCTCAGAA
C10	TGCTGGGTG	D6	ACCTGAACGG	E2	GGTGCGGGAA	E18	GGACTGCAGA	F14	TGCTCAGGT
C11	AAAGCTGCGG	D7	TTGGCACGGG	E3	CCAGATGCAC	E19	ACGGCGTATG	F15	CCAGTACTCC
C12	TGTCATCCCC	D8	GTGTGCCCCA	E4	GTGACATGCC	E20	AACGGTGACC	F16	GGAGTACTGG
C13	AAGCCTCGTC	D9	CTCTGGAGAC	E5	TCAGGGAGGT	F1	ACGGATCCTG	F17	AACCCGGGAA
C14	TGCGTGCTTG	D10	GGTCTACACC	E6	AAGACCCTC	F2	GAGGATCCCT	F18	TTCCCGGTT
C15	GACGGATCAG	D11	AGCGCCATTG	E7	AGATGCAGCC	F3	CCTGATCACC	F19	CCTCTAGACC
C16	CACACTCCAG	D12	CACCGTATCC	E8	TCACCACGCT	F4	GGTGATCAGG	F20	GGTCTAGAGG



注: M. DNA Marker; 1~24 分别为引物 C2、C4、C6、C8、C10、C12、C15、C19、C20、D5、D11、E1、E3、E4、E6、E7、E14、E15、E16、E18、F3、F4、F6、F12。

Note: M. DNA Marker; 1~24 are primers C2, C4, C6, C8, C10, C12, C15, C19, C20, D5, D11, E1, E3, E4, E6, E7, E14, E15, E16, E18, F3, F4, F6 and F12.

图 1 部分引物筛选的结果

Fig. 1 Result of partial primer screening

物, 说明与该类种质基因组 DNA 的同源性较低, 在对种质资源的 RAPD 研究中不宜用作合适的引物, 而筛选出在所有样品中都能扩增出条带清晰、具多态性、明亮且重复性好带型的有效引物用于正式的种质资源大规模材料的 RAPD 标记研究。

2.2 RAPD 标记的数据分析 根据照片记录, 如图 1 为部分引物的 RAPD 图谱, 图 2 为引物 D3 扩增的部分种质的 RAPD 图谱。

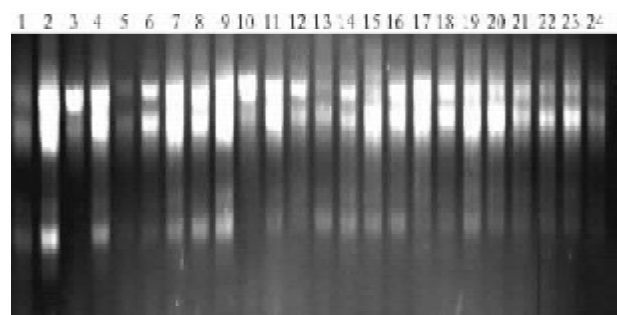


图 2 引物 D3 扩增的部分椰子种质的 RAPD 图谱

Fig. 2 RAPD pattern of partial coconut germplasm by primer D3

由表 2 可知, 12 个随机引物在所有样品中共扩增出 340 条条带, 即检测到 340 个椰子 RAPD 位点, 其中 307 个位点为多态性位点, 多态性位点百分率为 90.3%。

引物扩增图谱的差异性说明一方面椰子各种质间有较近的亲缘关系, 用某些引物能扩增出遗传位点一致的图谱;

另一方面各种质间存在较丰富的遗传物质差异,有较明显的遗传分化现象。

表 2 30 个引物的序列及其扩增结果

Table 2 Sequence and amplification result of 30 primers

引物 Primer	碱基序列(5'~3') Base sequence	总带数 Total band number	多态性带 Polymorphic bands	多态性百分率/% Polymorphic percentage
C2	GTGAGGCGTC	7	6	85.71
C4	CCGCATCTAC	6	6	100
C6	GAACGGACTC	8	7	87.50
C8	TGGACCGGTG	7	5	71.43
C10	TGTCTGGGTG	12	11	91.67
C12	TGTCATCCCC	6	6	100
C15	GACGGATCAG	13	12	92.31
C19	GTTGCCAGCC	12	11	91.67
C20	ACTTCCCCAC	13	13	100
D3	GTCGCCGTCA	14	12	85.71
D5	TGAGCGGACA	12	11	91.67
D11	AGCGCCATTG	11	10	90.91
D13	GGGGTGACGA	13	10	76.92
D19	CTGGGGACTT	11	10	90.91
D20	ACCCGGTCAC	9	8	88.89
E1	CCCAAGGTCC	10	8	80.00
E3	CCAGATGCAC	12	9	75.00
E4	GTGACATGCC	13	10	76.92
E6	AAGACCCCTC	11	10	90.91
E7	AGATGCAGCC	13	12	92.31
E14	TGCCGGCTGAG	13	13	100
E15	ACGCACAACC	14	14	100
E16	GGTACTGTG	12	11	91.67
E18	GGAATTCAG	15	14	93.33
E20	AACGGTGACC	16	16	100
F3	CCTGATCACC	14	13	92.86
F4	GGTGATCAGG	13	12	92.31
F6	GGGAATTCGG	6	5	83.33
F10	GGAAGCTTGG	11	10	90.91
F12	ACGGTACCAG	13	12	92.31
Total		340	307	90.30

3 结论

综上所述,通过筛选合适的引物,利用 RAPD 标记技术能够对椰子种质资源进行快速、准确的遗传分析。利用 RAPD 标记技术对椰子大量样品的系统分析,对椰子遗传多样性、椰子品种间的亲源关系将有进一步的认识,为椰子的品种鉴定、遗传育种及种质资源的保护与利用提供依据和背

景资料。

参考文献

- [1] 戴思兰,陈俊愉,李文彬. 菊花起源的 RAPD 分析[J]. 植物学报,1998,40(11):1053-1059.
- [2] CHARLES J SIMON, FRED J MUEHLBAUER. A quick and versatile method for plant DNA extraction from small amounts of tissue [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [3] MANIMEKALAI R, NAGARAJAN P. Use of simple sequence repeat markers for estimation of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm accessions [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2007, 16(1): 29-33.
- [4] MEEROW A W, WISSER R J, STEVEN B J, et al. Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 715-726.
- [5] PERERA L, RUSSELL J R, PROVAN J, et al. Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera*) [J]. Genome, 2000, 43(1): 15-21.
- [6] PERERA L, RUSSELL J R, PROVAN J, et al. Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers [J]. Euphytica, 2001, 122: 381-389.
- [7] PERERA L, RUSSELL J R, PROVAN J, et al. Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers [J]. Euphytica, 2003, 132: 121-128.
- [8] TEULAT B, ALDAM C, TREHIN R, et al. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 764-771.
- [9] CARDENA R, ASHBURNER G R, OROPEZA C, et al. Identification of RAPDs associated with resistance to lethal yellowing of the coconut (*Cocos nucifera* L.) palm [J]. Scientia Horticulture, 2003, 98: 257-263.
- [10] MANIMEKALAI R, NAGARAJAN P. Interrelationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using RAPD technique [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53: 1137-1144.
- [11] UPADHYAY A, JAYADEV K, MANIMEKALAI R, et al. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers [J]. Scientia Horticulturæ, 2004, 99: 353-362.
- [12] MANIMEKALAI R, NAGARAJAN P. Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers [J]. Scientia Horticulturæ, 2006, 108: 49-54.
- [13] BAUDOIN L, LEBRUN P, KONAN J L, et al. QTL analysis of fruit components in the progeny of a Rennell Island Tall coconut (*Cocos nucifera* L.) individual [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 258-268.
- [14] HERRAN A, ESTIOKO L, BECKER D, et al. Linkage mapping and QTL analysis in coconut (*Cocos nucifera* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 292-300.
- [15] LEBRUN P, BAUDOIN L, BOUREDEIX R, et al. Construction of a linkage map of the Rennell Island Tall coconut type (*Cocos nucifera* L.) and QTL analysis for yield characters [J]. Genome, 2001, 44(6): 962-970.
- [16] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phyto chem Bull, 1987, 19: 11-15.
- [17] CLARK M S. 植物分子生物学实验手册 [M]. 顾红雅, 瞿礼嘉, 译. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [11] CUTTING S M, VANDER-HOM P B. Genetic analysis [C]//HARWOOD C R, CUTTING S M. Molecular biological methods for *Bacillus*. Chichester, UK: Wiley, 1990: 78-82, 144-145.
- [12] BARBOZA-CORONA J E, J C CONRERAS, et al. Selection of chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis* [J]. Biotechnol Lett, 1999, 21: 1125-1129.
- [13] ELEAZAR BARBOZA-CORONA J, ELIZABETH N M, ROCIO V R, et al. Cloning, sequencing and expression of the chitinase gene chiA74 from *Bacillus thuringiensis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1023-1029.
- [14] LEWIS P, MARSTON A L. GFP vectors for controlled expression and dual labeling of protein fusions in *Bacillus subtilis* [J]. Gene, 1999, 227: 101-109.

(上接第 11244 页)

(3): 504-509.

- [6] WORTMAN A T, SOMERVILLE C C, COLWELL R R. Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: Gene cloning and applications of a chitinase probe [J]. Appl Environ Microbiol, 1986, 52(1): 142-145.
- [7] 陈三凤, 李季伦, 裘维蕃. 关于抑制植物病原真菌几丁质酶来源及效应的研究强作用黄杆菌的分离和鉴定 [J]. 植物病理学报, 1992, 22(4): 323-327.
- [8] 李继红, 邵寒霜, 郑学勤. 烟草几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 在大肠杆菌中的表达 [J]. 生物工程学报, 1998, 14(3): 309-313.
- [9] 李育阳. 基因表达技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 唐雪明, 邵蔚蓝, 王正祥, 等. 地衣芽孢杆菌感受态细胞的诱导形成及其高效电转化方法 [J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(5): 460-463.