

文章编号: 1003-8701(2006)06-0051-04

沙棘三亚种及其雌雄株的 RAPD 鉴定

刘洪章¹, 怀凤涛², 白秀娟^{1,2}, 李 玉¹

(1.吉林农业大学, 长春 130118; 2.东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘 要: 对生长在同一生态条件下的中国沙棘、俄罗斯大果沙棘和蒙古大果沙棘品种雌雄株性别进行了 RAPD 鉴定。结果表明, 只用一个引物即可将三亚种沙棘中的任何一种雌雄株区分开, 如用 B07、A11、D03 和 E03 引物之一即可将中国沙棘雌雄株区分开; 用 B06、A11 和 D07 引物之一即可将蒙古沙棘雌雄株区分开; 用 A13、E04 和 E07 引物之一即可将俄罗斯沙棘区分开; A13、E14、B06、B07、B10、A11、D07、E03 和 E15 引物中任何一个, 均可将中国沙棘、俄罗斯沙棘和蒙古沙棘区分开, 但不能同时区分开雌雄株。只用 2 个引物, 如 A11+A13 或 A11+E04 或 A11+E07 即可将 3 种沙棘及其雌雄株同时分开。从亲缘关系上看, 俄罗斯沙棘和蒙古沙棘有许多相同谱带, 说明二者在亲缘关系上较近。

关键词: 沙棘; RAPD; 雌雄株鉴定; 聚类分析

中图分类号: S793.6

文献标识码: A

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)为胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae*)植物, 为多年生小乔木或灌木, 雌雄异株。沙棘是我国三北防护林的先锋树种, 具有防风固沙、保持水土、护坡护岸、改土培肥、增进地力等多种生态功能, 同时沙棘也是一种药用果树, 营养价值和药用价值极高, 已作为栽培果树在我国大面积推广。但在其童期, 实生苗无法从形态上分辨出雌雄株, 最好的办法就是借助于分子生物学技术, 从分子水平进行标记。从目前看, 主要是采用 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术。该技术是 1990 年 William^[1]和 Welsh^[2]领导的两个研究小组同时提出的。目前, RAPD 标记在生物学的许多领域都得到了广泛的应用, 如遗传图谱构建、基因定位和克隆、外源导入基因的跟踪、物种亲缘关系和进化关系研究、品种鉴定等。关于 RAPD 技术在沙棘上的应用研究目前仅见一篇报道, 即 Weising, K 等^[3]对生长在瑞典的鼠李沙棘亚种海滨沙棘(*Hippophae rhamnoides* subsp. *rhamnoides*)的 10 个种群和鼠李沙棘亚种蒙古沙棘(*Hippophae rhamnoides* subsp. *Mongolia*)进行性别连锁标记。但对原产的中国沙棘、俄罗斯沙棘和蒙古沙棘同时进行性别标记目前尚未见报道。本文对生长在同一生态条件下的 3 种沙棘进行了雌雄株性别鉴定, 为沙棘属植物的早期性别鉴定提供了科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

中国沙棘、俄罗斯沙棘和蒙古沙棘三亚种雌雄株成熟叶片。应用的 13 种引物序列如下:

A13(CAGCACCCAC)/E04(GTGACATGCC)/E07(AGATGCAGCC)
E14(TGCGGCTGAG)/B06(TGCTCTGCCC)/B07(GGTGACGCAG)
B08(GTCCACACGG)/B10(CTGCTGGGAC)/A11(CAATCGCCGT)
D03(GTCGCCGTCA)/D07(TTGGCACGGG)/E03(CCAGATGCAC)
E15(ACGCACAACC)

1.2 DNA 提取方法

收稿日期: 2006-09-01

基金项目: 吉林省科技厅项目资助(980206-10); 吉林农业大学博士科研启动基金资助项目(2004-15)

作者简介: 刘洪章(1957-), 农学博士, 教授, 研究方向: 果树教学与研究。

1.2.1 试剂

蛋白酶 K、三羟基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙二胺四二酸二钠(EDTA-Na)、异戊醇、三氯甲烷(氯仿)、饱和酚、无水乙醇、CTAB。

1.2.2 提取方法

采用 CTAB 法。具体如下:

破壁:取少量沙棘叶,液氮下研磨,使细胞壁破裂。

消化:用 300 μ L 1x CTAB 提取液[1%CTAB 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)10 mM Na₂EDTA 0.7 mM NaCl]将其洗入 0.5 mL 的微量离心管中,轻轻摇动,将管置于 65 $^{\circ}$ C 的水浴中消化约 1 h。

抽提:分别用等体积的 Tris 饱和酚、酚-氯仿-异戊醇(v v v = 24 23 1)、氯仿-异戊醇(v v = 23 1)抽提蛋白质,每次混合 5 min,10 000 r 离心 10 min,移出水相至另一离心管。

沉淀:向水相中加入 2 倍体积的冰冷(-20 $^{\circ}$ C)无水乙醇,水平旋转数圈。15 000 r 离心 10 min, DNA 沉于管底。

洗涤:加入 1 mL 70% 冰冷乙醇,来回颠倒数次。8 000 r 离心 5 min。小心倒掉管中乙醇,将管倒置在滤纸上,让乙醇流尽。在真空泵中抽干或将离心管正立,在 40~50 $^{\circ}$ C 烘箱中 20 min,使乙醇完全挥发掉。

溶解:加 40~50 μ L 的 TE 缓冲液,置 55 $^{\circ}$ C 水浴中溶解 DNA。溶解后的 DNA 贮存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3 RAPD 扩增程序

95 $^{\circ}$ C 7 min/(94 $^{\circ}$ C 1 min、36 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min)45 个循环 /72 $^{\circ}$ C 10 min/4 $^{\circ}$ C 30 min。

1.4 RAPD 扩增体系

H₂O 14.7 μ L、Buffer 2.5 μ L、dNTP 2 μ L、模板 DNA 2 μ L、引物 3 μ L(5 pm)、Taq 酶 0.8 μ L,总体积:25 μ L。

1.5 琼脂糖凝胶的制备

用透明胶封住胶槽两端,摆放梳子,使其底部距底板 0.5~1 mm,并在电泳槽中加入适量电泳缓冲液(1x TAE),没过胶面 1 mm;然后根据所需浓度(1.5%)称取适量琼脂糖(0.45g)至 100 mL 三角瓶中,加入缓冲液(1x TAE)30 mL;再在瓶颈上盖上硫酸纸,在微波炉中加热约 30s 至琼脂糖溶化;室温下冷却至 60 $^{\circ}$ C,加入 1.5 μ L 溴化乙锭 10 mg/mL 至浓度 0.5 μ g/mL,充分混匀;稍冷却后倒入胶槽中冷却凝固。

1.6 电泳

将胶槽两侧的透明胶撕去置于电泳槽中,小心拨出梳子;取 8 μ L PCR 反应液至加样孔中,记住顺序;按 5V/cm 进行电泳,需 1 h 左右,然后取出至凝胶成像仪观察并拍照。

1.7 数据分析和聚类分析

按公式 $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$ 计算。其中 N_{xy} 为 x 和 y 两品种共有的 RAPD 条带数, N_x 和 N_y 分别为两品种扩增的总条带数。任意两品种之间的遗传距离的计算 $D=1-F$,D 为遗传距离,F 为共有带率。

电泳图谱中的每一条带均代表了引物与模板 DNA 之间互补的一对结合位点,可记为 1 个分子标记;PCR 扩增反应重复 1 次,选取可重复的 DNA 带记录,有带的记为 1,无带的记为 0,形成 0/1 矩阵图的原始数据输入微机。应用 SPSS10.0 统计软件对扩增结果进行聚类分析,给出树状图。

2 结果与分析

2.1 3 种沙棘雌雄株基因组特异 RAPD 差异性扩增结果

利用 13 种引物即可将中国沙棘、俄罗斯沙棘和蒙古沙棘及其雌雄株全部区分开。RAPD 图 1~13 可将相应的沙棘种类、雌雄株谱带清楚地扩增出来。

2.2 沙棘雌雄株基因组差异分析

2.2.1 俄罗斯沙棘雌雄株差异区分

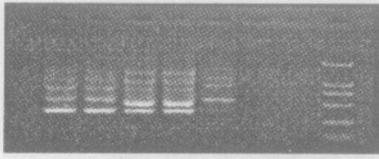


图 1 Primer A13

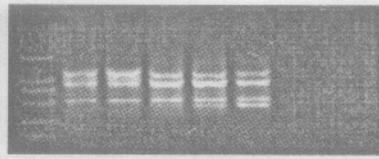


图 2 Primer E04

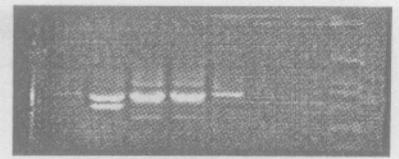


图 3 Primer E07

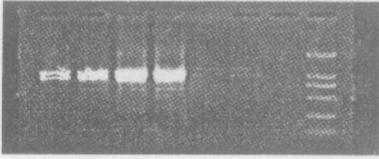


图 4 Primer E14

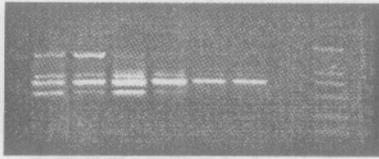


图 5 Primer B06

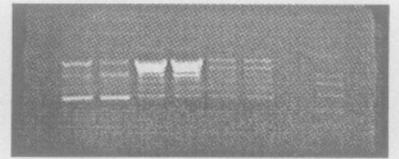


图 6 Primer B07

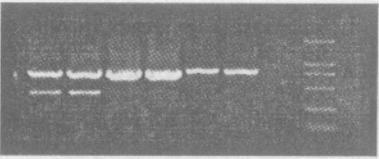


图 7 Primer B08

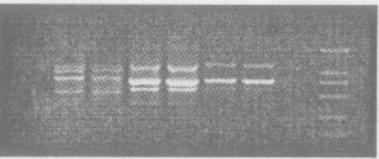


图 8 Primer B10



图 9 Primer A11

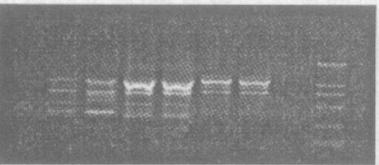


图 10 Primer D03



图 11 Primer D07

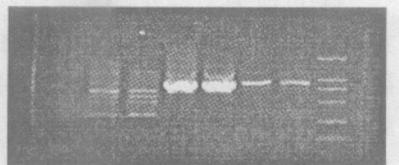


图 12 Primer E03

图 1 中引物 A13 雄株比雌株多扩增出 C、E、F、H 4 条带, 雌株没有带; 图 2 中 E04 引物雄株比雌株多扩增出其 A、B、C、E 4 条带, 雌株没有带; 图 3 中引物 E07 雄株比雌株多扩增出一条 C 带, 雌株没有带。

2.2.2 蒙古沙棘雌雄株差异区分

图 5 中引物 B06 雄株比雌株多扩增出 1 条 F 带; 图 9 中引物 A11 雌株比雄株多 1 条 C 带, 而雄株比雌株多 1 条 D 带; 图 11 中引物 D07 雄株比雌株多 1 条 F 带。用这 3 个引物之一即可将蒙古沙棘雌雄株区分开。

2.2.3 中国沙棘雌雄株差异区分

图 6 中引物 B07 雄株比雌株多扩增出 1 条 F 带; 图 9 中引物 A11 雌株比雄株多扩增出 1 条 B 带; 图 10 中引物 D03 雄株有 1 条 C 带, 雌株没有, 而雌株有 D、E 两条带, 雄株没有; 图 12 中引物 E03 雄株比雌株多扩增出 E、H 两条带。用这 4 个引物之一即可将中国沙棘雌雄株区分开。

2.2.4 中国沙棘、俄罗斯沙棘和蒙古沙棘之间差异的同时区分

用 A13、E14、B06、B07、B10、A11、D07、E03 和 E15 任何一个引物, 均可将中国沙棘、俄罗斯沙棘和蒙古沙棘区分开, 但不能同时区分雌雄株。

2.2.5 3 种沙棘及其雌雄株之间差异的同时区分

要将 3 种沙棘及其雌雄株同时区分开, 最少 2 个引物, 如引物 A11+A13 或 A11+E04 或 A11+E07。

2.3 聚类分析

聚类分析结果得到一树状分支图(图 14)。从图 14 中可以看出, 中国沙棘、蒙古沙棘和俄罗斯沙棘

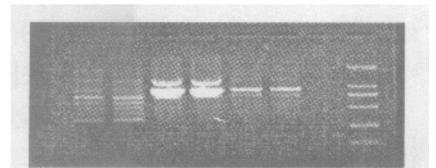


图 13 Primer E15

各图模板顺序为: 1 号(中国沙棘雄性)、2 号(中国沙棘雌性)、3 号(蒙古沙棘雄性)、4 号(蒙古沙棘雌性)、5 号(俄罗斯沙棘雄性)、6 号(俄罗斯沙棘雌性)。

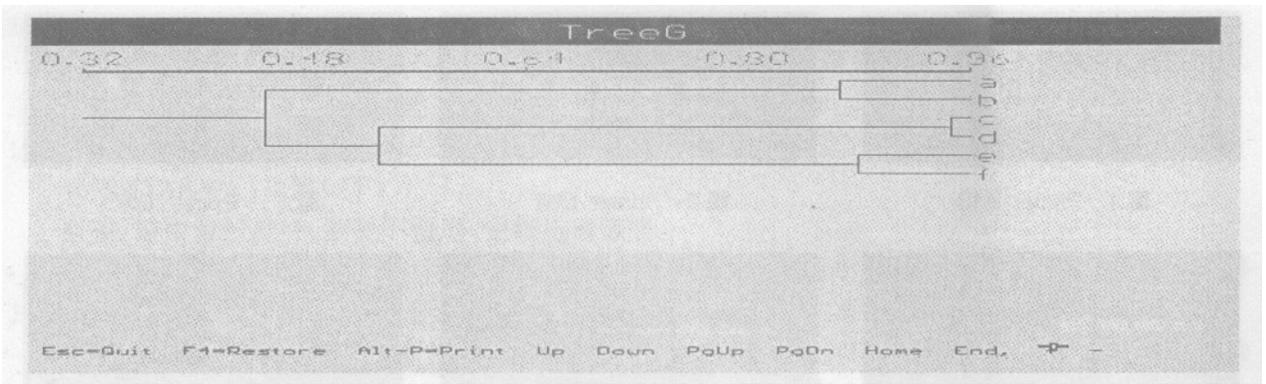


图 14 3 种沙棘雌、雄株聚类

注: a 和 b 分别代表中国沙棘雄、雌株; c 和 d 分别代表蒙古沙棘雄、雌株; e 和 f 分别代表俄罗斯沙棘雄、雌株。

3 个品种的雌雄株各自聚为 1 支, 表现相互间遗传关系较近, 而 3 个品种之间则存在明显的遗传差异。其中蒙古沙棘和俄罗斯沙棘之间的亲缘关系较近, 二者与中国沙棘之间的亲缘关系较远, 与实际相符合。因为蒙古沙棘品种有俄罗斯沙棘品种的血缘, 俄罗斯沙棘品种是蒙古沙棘与中亚沙棘两个亚种之间的远缘地理杂交种, 而中国沙棘则与之亲缘关系较远。

3 讨论与小结

目前关于沙棘雌雄株性别鉴定, Weising, K 等^[3]只对生长在瑞典的鼠李沙棘亚种(海滨沙棘)的 10 个类群和蒙古沙棘亚种进行 DNA 分子标记, 区分了海滨沙棘亚种的不同类群和蒙古沙棘亚种。本研究对中国沙棘、蒙古沙棘品种和俄罗斯沙棘品种 (中亚沙棘 *subsp. turkestanica* 和蒙古沙棘 *subsp. Mongolia* 两个亚种的地理远缘杂种)及其雌雄株同时进行 RAPD 分析。结果表明, 只用一个引物即可将三亚种沙棘中的任何一种雌雄株区分开, 如用引物 B07、A11、D03 和 E03 之一即可将中国沙棘雌雄株区分开; 用引物 B06、A11 和 D07 之一即可将蒙古沙棘雌雄株区分开; 引物 A13、E04 和 E07 之一即可将俄罗斯沙棘区分开; 用引物 A13、E14、B06、B07、B10、A11、D07、E03 和 E15 任何一个, 均可将中国沙棘、俄罗斯沙棘和蒙古沙棘区分开, 但不能同时区分雌雄株。

要将 3 种沙棘及其雌雄株同时分开, 最少 2 个引物, 如引物 A11+A13 或 A11+E04 或 A11+E07。

从亲缘关系上看, 俄罗斯沙棘和蒙古沙棘有许多相同谱带, 说明二者在亲缘关系上较近, 从树状图上看也说明了这一点, 而中国沙棘与俄罗斯沙棘和蒙古沙棘之间亲缘关系相对较远。

参考文献:

- [1] Williams JGK, Kunth AR, Lirak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990 18:6531-6535.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acid Res*, 1990 18:7213
- [3] Weising K., H. Nybom, K. W olff, and W. Meyer. DNA fingerprinting in plant and fungi. CRC Press, 1995, Boca Raton, FL.

Identification of Three Sea Buckthorn Subspecies and Their Female and Male Plant Using RAPD

LIU Hong-zhang, HUA I Feng-tao, BAI X iu-juan
(Jilin Agricultural University, Changchun, 130118, China)

Abstract: Three sea buckthorn from China, Russia and Mongolia and their female and male plant were distinguished by RAPD. The results showed that female and male plant of any subspecies could be identified by one primer. For example, anyone of primer B07, A11, D03 and E03 could identify female and male plant of China sea buckthorn. Anyone of primer B06, A11 and D07 could identify female and male plant of Mongolia sea buckthorn. Anyone of primer A13, E04 and E07 could identify female and male plant of Russia sea buckthorn. Anyone of primer A13, E14, B06, B07, B10, A11, D07, E03 and E15 could identify three (下转第 61 页)

[8] 高 辉, 张洪程 . 有机食品、绿色食品和无公害食品的概念及其异同[J] . 中国标准化, 2002(5): 20-21 .

[9] 方智远, 侯喜林, 祝 旅 . 蔬菜学[M] . 南京: 江苏科学技术出版社, 2004 .

[10] 吴卫华 . 我国有机农业和食品发展战略的思考[J] . 中国食物与营养, 2002(2): 9-11 .

[11] 梁国生, 张忠宝, 陈爱星, 等 . 无公害蔬菜、绿色蔬菜及有机蔬菜的生产[J] . 延边大学农学报, 2002(4): 250-253 .

.....
(上接第 54 页) sea buckthorn subspecies but could not identify the sex at the same time. Using two primers, for example, A11+A13, A11+E04 or A11+E07 could identify the sex and subspecies at the same time. Genetic relationship between Russia and Mongolia sea buckthorn was rather closely because they have many same band patterns.

Key words: Sea buckthorn; RAPD; Identification of sex; Cluster analysis

.....
(上接第 56 页)

续表 2

分类	专利权人	数量	专利号	专利名称	
大专院校	吉林省高等院校 科技开发研究中心	2	CN00110567	一种提高大豆蛋白质含量的速溶豆粉的生产方法	
			CN01106289	无废渣、无废水的超微、纳米大豆制品的生产方法	
			CN01113946	一种以大豆粕、玉米胚粕为原料生产分离蛋白过程中提取核酸的方法	
			CN02132768	脲酶阴性、无豆腥味、可直接食用的大豆分离蛋白	
			CN02133156	以高、低温豆粕为原料, 生产蛋白质含量 60% 的新型大豆蛋白的方法	
			CN02109311	活性营养豆奶的制作方法	
			CN03111630	安全高营养豆奶的制备方法	
			CN01138945	家猪的放牧式饲养方法	
			CN02133017	用废塑料制作热收缩型管道包覆材料的方法	
			CN03111082	大豆寡肽生产工艺及用于实现该工艺的酶水解反应釜	
企业	敦化市敖东食品开发 有限责任公司	1	CN02109625	提取大豆异黄酮的方法	
			CN02109626	提取大豆异黄酮的方法	
			CN02109627	强化维生素 A 营养大豆油及其生产方法	
			CN02109628	提取大豆异黄酮的方法	
			CN00106652	玉米方便面及其生产方法	
	吉林省禾合农业高新 技术开发有限公司		1	CN03111366	缓释非蛋白氮饲料及生产工艺
	吉林省斯大机械有限公司		1	CN00252689	豆粉豆腐机
	吉林省省华生物技术 开发有限责任公司		1	CN02109310	活性营养纳豆的制作方法
	吉林市新科奇保健食品有限公司		1	CN03133474	一种具有免疫调节、美容功能的口服剂型组合物及其制备方法
	辽源金昌企业集团公司		1	CN03110931	超氧化物歧化酶同工皂甙胶囊
个人	玄龙云等	27	无毒建筑材料及其制造方法、专用设备; 营养米; 全脂蛋白饲料、医药等		

注: 上述统计数据源自中国专利文摘(1985.9-2005.6)

吉林省在大豆加工利用研究领域专利技术的数量不少, 但研究水平和竞争实力稍差。从表 2 可以看出: 吉林省高等院校和科研机构近 5 年的专利申请数量有所增加, 但科研事业单位和大专院校的技术优势并不明显; 非本大专院校和科研单发明的专利数量之多。这种现象, 值得重视。

3 相关建议

我省的高等院校科技开发研究中心以 5 项大豆蛋白专利技术在在大豆加工利用领域 3 中位列第 10; 省内另有大豆加工利用研究机构约 5 家, 近 5 年内均没有专利技术产生。据 2002 年统计, 我省有固定资产 500 万元以上的大豆加工和制造企业 47 家, 其中, 油脂生产企业 28 家、酿造企业 13 家、其他产品(蛋白、磷脂及其他豆制品)的企业 6 家, 拥有自主知识产权技术很少。针对如此状况, 建议从大豆加工利用技术的高端入手, 借助于现代高新技术, 对传统大豆食品和最新大豆加工利用产品两个方向开展创新研究。

传统大豆加工制品工艺技术现代化。从国内大众传统饮食习惯入手, 利用我省大豆产区大豆品质优良的有利条件, 针对豆腐、豆酱、酱油等食品的加工开展技术创新研究, 创立吉林省的优势品牌。

新兴大豆加工制品工艺技术研究开发与开发。建议与大豆品质育种研究相配合, 从大豆功能活性物质利用的开发研究入手, 研制大豆功能食品。