

叶春秀, 杨雷, 田琴, 等. 应用 RAPD 标记技术鉴定 2 个新疆枣品种[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 55, 59.

应用 RAPD 标记技术鉴定 2 个新疆枣品种

叶春秀, 杨雷, 田琴, 庄振刚, 谢宗铭

(新疆农垦科学院分子农业技术育种中心, 新疆石河子 832000)

摘要: 对新疆的 2 个枣材料(哈密大枣、哈密玉枣)进行 RAPD 分析, 最终从 18 条随机引物中筛选出 2 条稳定性较好的引物, 能够将这 2 个材料区分开来。研究结果为从分子水平上鉴定这 2 个材料提供了研究基础。

关键词: 枣; RAPD; 遗传多样性; 新疆

中图分类号: S665.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0055-01

新疆作为我国主要枣栽培地区之一, 品种资源比较丰富^[1]。近年来新疆红枣产业发展较快, 枣成为主要林果业树种之一。在红枣栽培、引种、推广过程中, 往往存在混杂、同物异名、同名异物现象, 这对红枣资源的研究和利用很不利, 所以建立稳定的红枣资源鉴定体系十分重要。目前, 枣品种分类主要是以形态学、用途及分布特征为依据^[2], 随着分子生物学技术研究的深入, 分子标记技术以其快速、准确的特点也逐渐被应用于动植物遗传多样性的鉴定^[3], RAPD 分子标记在果树遗传多样性鉴定方面已得到广泛应用^[4]。本研究建立了一种枣品种分子标记鉴定技术, 旨在用于形态相似枣品种分子水平上的鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料采自新疆哈密农十三师农业科学研究所。采集幼嫩叶片放入冰盒, 于实验室 -80 °C 存储。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照改良 CTAB 法^[5-8] 并加以改进, 提取基因组 DNA。将提取的基因组 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶中进行纯度和浓度分析, 保存在 -20 °C 备用。

1.2.2 引物的合成与筛选 试验所用的随机引物由上海生物工程技术有限公司合成, 共 18 条, 引物序列如表 1。

1.2.3 RAPD 反应条件和反应体系 RAPD 反应体系为 20 μL, 各成分如下: 10 × Buffer (含 Mg²⁺) 2.0 μL, dNTPs (10 mmol) 0.4 μL, 引物 1.5 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, DNA 模板 (20 ng/μL) 2.0 μL, ddH₂O 13.9 μL。扩增反应程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 36 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 7 min。在冰盒上将反应物加完后微甩, 放入 Bio-RAD PCR 仪中扩增, 反应完成后取 PCR 扩增产物 10 μL 点入含 EB 的 2% 凝胶中, 电泳到距底部 1 cm 时在 Bio-RAD Gel Doc XR 凝胶成像分析系统下观察并记录结果。

表 1 RAPD 分析所用引物

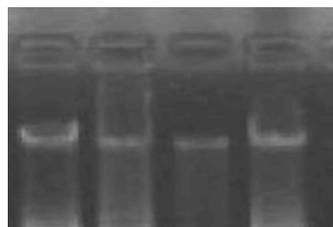
引物名称	引物序列(5'-3')	引物名称	引物序列(5'-3')
OPG14	GGATGAGACC	OPU13	GGCTGGTTC
OPH08	GAAACACCCC	OPU16	CTGCGCTGGA
OPH19	CTGACCAGCC	OPU20	ACAGCCCCCA
OPJ01	CCCCGCATAA	OPV02	AGTCACTCCC
OPJ07	CCTCTCGACA	OPV07	GAAGCCAGCC
OPO06	CCACGGGAAG	OPV10	CGACCTGCTG
OPO10	TCAGAGCGCC	OPV18	TGGTGGCGTT
OPP02	TCGGCAGCCA	OPW02	ACCCCGCCAA
OPQ04	AGTGGCTGA	OPW08	GACTGCCTCT

2 结果与分析

2.1 枣基因组 DNA 的提取

考虑到枣叶片含有较多的糖类物质, 在提取过程中易造成 DNA 样品黏稠, 影响后期试验结果, 因此对文献[5]中的基因组 DNA 提取方法稍加改进, 增加了离心速率和酚/氯仿抽提次数, 最终得到浓度、纯度较好的 DNA 样品, 能够在后期 RAPD 扩增体系中得到具有差异性的扩增产物(图 1)。

1 2 3 4



1~2—材料1; 3~4—材料2

图 1 2 个枣材料的 DNA 电泳图谱

2.2 RAPD 引物筛选及材料鉴定

采用 18 条随机引物对 2 个试验材料进行 PCR 扩增, 分析扩增结果, 最终筛选出 2 条稳定性较好的引物, 用于最终试验分析。经过重复性扩增, 在 2 个试验材料上得到稳定的扩增产物, 从扩增结果可以看出, 这 2 个材料的扩增图谱在主带上存在明显差异(图 2)。

3 结论与讨论

3.1 影响 RAPD 反应的因素

在 RAPD 反应过程中, 影响其稳定性的因素较多, 对每个

(下转第 59 页)

收稿日期: 2012-10-25

作者简介: 叶春秀(1982—), 女, 四川成都人, 副研究员, 从事植物分子育种研究。E-mail: yecx2008@163.com。

通信作者: 谢宗铭, 研究员。E-mail: xiezcmhy@163.com。

236.36 g, 表现为前期增长迅速, 后期保持较大干物质积累量的时间较长, 可以有效提高籽粒灌浆, 协调穗数与粒重的矛盾; 玉米产量与冠层内不同层次透光率符合 $Y = e^{[a + b \times TP\text{PAR}_i + c \times \ln(TP\text{PAR}_i)]}$, 高产群体穗位层适宜透光率在 16.26% 左右, 地面漏光率在 0.99% 左右。冠层适宜的光分布有利于叶片提高光合效率, 维持较高 LAD, 实现玉米群体高产。提高作物群体的光合作用效率和物质生产能力主要在于改善群体冠层的通风透光能力, 提高群体光合性能。

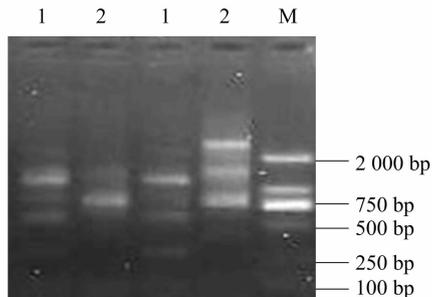
生产中常通过栽培管理和调整株型与叶片的方位等来影响群体结构, 从而改善植株对光的有效截获^[12-14], 提高群体生产力。本试验研究结果对构建玉米高产群体结构提供了重要的参考价值, 为高产玉米育种和栽培提供了有价值的参数指标。同时, 生产实践中须重视在玉米生长的关键时期各项田间管理措施的有效配合, 延缓 LAI 下降速度, 保证较高 LAD, 增加干物质积累量, 提高光合速率, 将有利于玉米超高产的实现。

参考文献:

- [1] 郭庆法, 王庆成, 汪黎明. 中国玉米栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 380-406.
- [2] 李明, 李文维. 肥料和密度对寒地高产玉米源库性状及产量的调节作用[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1130-1137.
- [3] 齐延芳, 许芳佐, 周柱华, 等. 种植密度对玉米鲁原单 22 光合作用的影响[J]. 核农学报, 2004, 18(1): 14-17.

- [4] 吕丽华, 陶洪斌, 夏来坤, 等. 不同种植密度下的夏玉米冠层结构及光合特性[J]. 作物学报, 2008, 34(3): 447-455.
- [5] 卢义次. 作物的光合作用和物质生产[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [6] 张银锁, 宇振荣. 环境条件和栽培管理对夏玉米干物质积累、分配及转运的试验研究[J]. 作物学报, 2002, 28(1): 104-109.
- [7] 张继祥, 毛志泉, 魏钦平, 等. 美国黑核桃实生苗单叶片光合作用生理生态模型的建立与验证[J]. 生物数学学报, 2004, 19(1): 113-115.
- [8] 屈会娟, 李金才, 沈学善, 等. 种植密度和播期对冬小麦品种兰考矮早八干物质和氮素积累与转运的影响[J]. 作物学报, 2009, 35(1): 124-131.
- [9] 薛珠政, 卢和顶, 林建新, 等. 种植密度对玉米单株和群体效应的影响[J]. 玉米科学, 1999, 7(2): 52-54.
- [10] 白 鸥, 黄瑞冬. 不同纯度玉米群体株高、光分布和产量的比较研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(3): 59-61.
- [11] 任光俊, 陆贤军, 高远方, 等. 作物光合作用的遗传与产量改良[J]. 西南农业学报, 2004, 17(1): 57-61.
- [12] 罗新兰, 陈祥兰, 姚运生, 等. 东北玉米叶面积指数动态模拟模型研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 91-94.
- [13] 郭 江, 郭新宇, 郭程瑾, 等. 密度对不同株型玉米群体结构的调控效应[J]. 华北农学报, 2008, 23(1): 149-153.
- [14] 王庆成, 牛玉贞, 徐庆章, 等. 株型对玉米群体光合速率和产量的影响[J]. 作物学报, 1996, 22(2): 223-227.

(上接第 55 页)



1~2—2个枣材料; M—DL2000 DNA 标记

图2 RAPD引物对2个枣品种的扩增

反应因子进行重复性探索, 才能最终确定能够得到稳定扩增结果的反应体系。在影响 RAPD 稳定性的因素中, 基因组 DNA 模板浓度、纯度是重要影响因素之一。本研究通过对 DNA 模板浓度的研究发现, 模板对反应体系的影响不大, 反应结果的稳定性在很大程度上是各反应因子综合影响的结果, 须经过重复性试验在各因子间找到一个平衡点, 得到最佳组合, 最终得出较稳定和可靠的结果。本研究经过重复试验, 最终找到了适合枣品种鉴定的反应体系。

3.2 2个新疆红枣材料的差异性分析

新疆是我国新兴的枣产业基地, 也是枣资源较丰富的地区, 不仅具有特异的枣种质资源, 而且近年来也选育和引进了不少枣品种。在种质资源选育和引进过程中, 难免存在同物异名和同名异物的情况, 为避免这种现象发生, 采用有效的鉴别方法进行区分就显得比较重要。本研究采用的 2 个枣材料

(哈密大枣、哈密玉枣) 是哈密地区特有的枣种质资源, 而且哈密玉枣是新育成的品种, 其来源不是很清楚, 在形态学上与哈密大枣比较相似, 在生产和栽培过程中常被混淆, 本研究利用 RAPD 分子标记技术对其鉴定和分析, 为准确区分这 2 个材料提供了理论依据, 也为红枣品种鉴定提供了一种方法。

参考文献:

- [1] 曲泽洲, 王永惠. 中国果树志·枣卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 22.
- [2] 赵 锦, 刘孟军. 枣树品种、品系及其近缘种的 RAPD 分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 590-594.
- [3] 岳建萍. DNA 分子标记技术在植物种质资源鉴定中的应用[J]. 生物学通报, 2003, 38(12): 15-16.
- [4] 于华平, 房经贵, 张美勇, 等. RAPD 标记用于葡萄、苹果等 7 种果树品种的鉴定的研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(10): 5-9.
- [5] 张虎平, 牛建新, 王国安, 等. 适于核桃基因标记的 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2003, 13(5): 18-19.
- [6] Cheng Y J, Guo W W, Yi H L, et al. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21(2): 177-178.
- [7] Sharma A D, Gill P K, Singh P. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20(4): 415.
- [8] Proberki S, Bailey G L, Baum B R. Modification of a CTAB extraction protocol for plant containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8-15.