

紫花桔梗和白花桔梗的 RAPD 指纹图谱鉴定研究

王立平, 孙丽娜, 薛均诚, 吴松权, 吴基日

(延边大学农学院 吉林龙井 133400)

摘要: 用 RAPD 方法对紫花桔梗和白花桔梗进行了指纹图谱的研究, 以期对桔梗花色的鉴定提供分子依据。采用 BSA 法从 200 个随机引物中筛选出具有多态性的 7 个引物。结果引物 OPG02 在检测的紫花桔梗个体中均能各自扩增出一条 580bp 左右的特异带, 而在白花桔梗中则未见。表明该 RAPD 标记具有紫花桔梗特异性, 可用于鉴别紫花桔梗和白花桔梗。

关键词: 桔梗; 紫花; 白花; RAPD; 指纹图谱

中图分类号: S 567.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)05-0040-02

桔梗(*platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 隶属于桔梗科(*Campanulaceae*), 桔梗属(*platycodon*) 为单种属, 仅桔梗一种^[1]。桔梗的花色有紫花和白花两种, 有的学者认为白花桔梗(*platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. var. *album* Hort) 是紫花桔梗的变种^[2]。桔梗的根为著名的中药材, 具有宣肺、祛痰、散寒、镇咳、消肿、排脓等功效^[3]。桔梗根还可以制成美味的朝鲜族传统小菜, 在中国东北地区及日本、韩国、朝鲜等东亚国家备受青睐^[4]。

RAPD(random amplified polymorphic DNA) 是 1990 年由美国科学家 Williams 和 Welsh 几乎同时采用 PCR 技术发展起来的一种 DNA 分子标记技术。因其操作简便、快速、高效且在不了解物种基因组相关分子生物学信息下就可进行等优点而广泛应用于动植物遗传育种、基因诊断、居群遗传学、生物系统学与进化研究^[5]。用 RAPD 技术对 56 份桔梗种质资源进行 RAPD 分析的结果表明: 桔梗种质资源的聚类结果与地理分布几乎一致^[6]。

研究利用 RAPD 技术对紫花和白花桔梗进行 RAPD 分析, 旨在从 DNA 水平上揭示紫花和白花桔梗的遗传差异, 为桔梗花色遗传规律的研究、鉴别紫花桔梗和白花桔梗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试白花桔梗和紫花桔梗各 7 份, 详见表 1。供试材料的种子于 2005 年 4 月 28 日播在延边大学农学院中草药试验圃地, 7 月 15 日采集新鲜幼嫩的叶片并保存

于 -75℃ 冰箱中备用。

表 1 供试材料及来源

序号	花色	种子来源	序号	花色	种子来源
1	白花	朝鲜	8	紫花	安徽
2	白花	朝鲜	9	紫花	内蒙赤峰
3	白花	朝鲜	10	紫花	吉林安图
4	白花	朝鲜	11	紫花	吉林白山
5	白花	吉林龙井	12	紫花	吉林龙井
6	白花	吉林龙井	13	紫花	吉林长春
7	白花	吉林龙井	14	紫花	安徽亳州

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 提取 采用改进的 CTAB 法^[9], 称取 0.2g 幼叶, 在液氮中研磨至粉末状, 置于 1.5mL 离心管中, 加入 650 μ L 预热到 65℃ 的 2 \times CTAB 提取缓冲液(2%CTAB; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl(pH 8.0); 1.4M NaCl; 1%PVP) 和 10 μ L β -巯基乙醇, 65℃水浴 45min, 取出在室温下冷却。加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 剧烈震荡。室温下 12 000 转离心 10min, 取上清液置 1.5mL 离心管中, 再加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)震荡混匀, 室温下 12 000 转离心 5min。取上清液置于新离心管中加入 2/3 体积 -20℃预冷的异丙醇, 置 -20℃冰箱中放置 30min 至出现絮状沉淀, 弃去上清液, 加入 70% 的酒精洗涤沉淀两次, 将离心管倒置于吸水纸上干燥。加入 100 μ L 1 \times TE 缓冲液溶解 DNA, 加入 2 μ L RNase37℃保温 1h 去除 RNA。紫外分光光度计检验 DNA 的浓度及纯度。将 DNA 浓度定为 10ng/ μ L, 于 -20℃冰箱中保存、备用。

1.2.2 紫花桔梗和白花桔梗基因池的建立 采用 BSA 法^[9], 分别将表 1 中的 7 个紫花桔梗和 7 个白花桔梗个体中提取的 DNA 等量混合, 组成紫花桔梗和白花桔梗基因池。

1.2.3 PCR 反应体系 20 μ L 反应体系中, 模板 DNA 20ng, 引物 0.3 μ mol/L, dNTP 150 μ mol/L, MgCl₂ 2.0mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 μ nit, 10 \times Buffer 2.0 μ L。

1.2.4 PCR 扩增条件 94℃预变性 5min, 94℃变性 1min, 40℃退火 1min, 72℃延伸 90S。共 40 个循环, 72℃

第一作者简介: 王立平(1981-), 男, 在读硕士, 主要研究方向为桔梗的遗传育种。

通讯作者: 吴基日, 博士生导师, E-mail: wujiri@yahoo.com.cn。

基金项目: 吉林省自然科学基金项目(20040553) 和延边大学重点课题(延大科合字(03)第 07 号)。

收稿日期: 2007-01-13

最后延伸 5min。

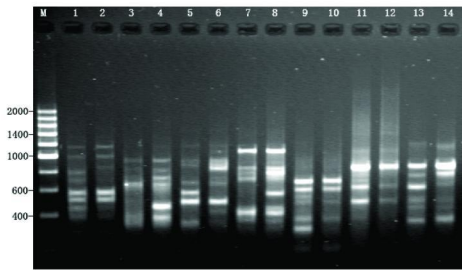
1.2.5 PCR 产物的检测 扩增的产物用 1.4% 琼脂糖凝胶(含 0.5%g/mL 的溴化乙锭)上电泳,电泳缓冲液为 1×TAE(pH=8.0),在 3v/cm 恒压下电泳 2.5h 左右,用 Dolphin-DOC 凝胶成像仪观察结果并照相。

2 结果与分析

以紫花桔梗和白花桔梗基因池 DNA 为模板进行 RAPD 分析,从 200 个随机引物中筛选出具有多态性的 7 个引物为 OPC04(CCGCATCTAC)、OPE07(AGATG

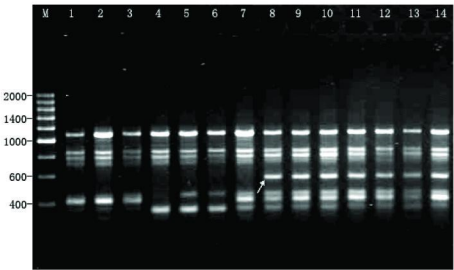
CAGCC)、OPF4(GGTGATCAGG)、OPG02(GGCACTGAGG)、OPG15(CTGGGACTC)、OPG17(ACGAGCGACA)、OPJ11(CTCCTGCCA),如图 1。用这 7 个引物对构成紫花桔梗和白花桔梗基因池 DNA 的单株进行扩增,只有引物 OPG02 在检测紫花桔梗个体中均能各自扩增出一条 580bp 左右的条带(图 2 中箭头所指),标记为 OPG02-580,而在白花桔梗的个体中则未见到,表明该 RAPD 标记具有紫花桔梗特异性。

为了验证该标记的准确性,研究中对其余的紫花桔



(图中 M 为 200bp 的 DNA 标记,1、3、5、7、9、11、13 为白花 DNA 模板,2、4、6、8、10、12、14 为紫花 DNA 模板)

图 1 7 个引物的扩增结果



(图中 M 为 200bp 的 DNA 标记 1-7 号为白花桔梗 8-14 号为紫花桔梗)

图 2 白花桔梗和紫花桔梗个体用引物 OPG02 扩增的结果

梗和白花桔梗的 DNA 进行提取,利用引物 OPG02 进行扩增,结果紫花桔梗都能扩增出 580bp 左右的特异条带,而白花桔梗则未有,这进一步证明了该标记的有效性。

3 讨论与结论

关于 RAPD 技术的稳定性、重复性问题,许多研究证明只要反应条件严格控制,重复结果是可以得到的^[7]。研究通过严格控制 RAPD 实验体系的扩增程序和只记录重复性好的强带,结果紫花桔梗都能扩增出 580bp 左右的特异条带,而白花桔梗则未有。多次 RAPD 分析中,这种差异类型均稳定存在。这也说明利用本研究所建立的桔梗反应体系进行 RAPD 分析,所得到的紫花桔梗和白花桔梗指纹图谱重复性好、稳定性强。

研究利用 RAPD 分子标记技术构建了紫花桔梗和白花桔梗指纹图谱,从 DNA 水平上初步揭示了紫花桔

梗和白花桔梗在遗传物质上存在的真实差异,为进一步将 RAPD 标记转化成稳定的 SCAR 标记、研究桔梗的花色遗传和鉴别紫花桔梗和白花桔梗提供理论依据。

参考文献:

[1] 刘鸣远,付承新.桔梗生物学研究[J].植物研究,1985,5(1):71-80.
[2] 杨胜亚,余春霞,黄芩,柴胡.桔梗高效栽培技术[M].郑州:河南科学技术出版社,2004:104-106.
[3] 刘德军,马维希.桔梗[M].北京:中国中医药出版社,2001:1-5.
[4] 舒变,高山林.桔梗研究进展[J].中国野生植物资源,2001,20(2):4-6.
[5] 邹喻苹,葛颂,王晓东,等.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001:30-51.
[6] 严一字,吴基日,孙丽娜.桔梗种质资源的 RAPD 分析[J].安徽农业科学,2006,34(16):3908-3910.
[7] 刘春林,官春云,李梅.关于植物随机引物扩增多态性 DNA 标记可靠性问题[J].植物生理学通讯,2000,36(1):56-59.

Fingerprint Research on Identification of Purple Flower *Platycodon grandiflorus* and White Flower *Platycodon grandiflorus* by RAPD

WANG Li-ping, SUN Li-na, WU Song-quan, XUE Jun-cheng, WU Ji-ri
(Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract: In order to provide molecular foundation for the flower color of *Platycodon grandiflorus*, RAPD analysis was adopted to identify the purple flower *P. grandiflorus* and white flower *P. grandiflorus*. With the method of BSA, 7 polymorphic primers were screened from 200 random primers. A band of 580bp from OPG02 was specifically amplified from all the tested the purple flower *P. grandiflorus* and were absent in the tested white flower *Platycodon grandiflorus*. So, the band had the speciality of the purple flower *P. grandiflorus* and it can be used to identify the purple flower *P. grandiflorus* and white flower *P. grandiflorus*.

Key words: *Platycodon grandiflorus*; Purple flower; White flower; RAPD; Fingerprint