

湖南地方辣椒品种 RAPD 体系的正交优化研究

蒋向辉^{1,2}, 余朝文^{1,2}, 张玲玲¹, 伍贤进^{1,2}

(1. 怀化学院 生物工程系, 湖南 怀化 418008; 2. 怀化市生物育种与加工技术实验室, 湖南 怀化 418008)

摘要:以辣椒 DNA 为模板, 对影响辣椒 RAPD 扩增的重要参数进行了优化试验, 以期建立辣椒 RAPD 反应的最佳体系。通过采用正交试验设计的方法, 对辣椒 RAPD 条件进行了优化, 结果表明: 最佳的辣椒 RAPD 的反应体系 (15 μ L) 中含有 1 \times buffer, MgCl₂ 2.67 mM, dNTPs 0.13 mM, Primer 0.5 μ mol/L, Taq 0.75 U/ μ L, DNA 40~50 ng。适宜扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 再进入 40 个 PCR 循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 37 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

关键词: 地方辣椒; RAPD 反应体系; 正交设计

中图分类号: S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)09-0007-03

辣椒(*Capsicum frutescens* L.) 是茄科辣椒属常异花授粉作物, 原产于中南美洲热带地区, 在温带地区为 1 a 生草本植物。果实内含有丰富的维生素 C、蛋白质、糖类等营养物质^[1]。辣椒品种多, 椒果、叶片、株形等多种多样。近年来随着新品种的推广、农业耕作制度的改变及环境恶化等方面的原因, 辣椒种质资源在不断丧失。随着信息技术的飞速发展, 地方品种之间的交流也越来越频繁, 对地方辣椒品种资源的搜集、评价与鉴定工作变得相当重要。

RAPD 技术的全称是随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA), 此技术建立于 PCR 基础之上, 使用一系列具有 10 个左右碱基的单链随机引物, 对基因组的 DNA 全部进行 PCR 扩增, 以检测多态性。RAPD 技术自 1990 年发明以来, 在作物种质资源、遗传育种、基因定位等方面得到了广泛的、成功的应用^[2]。

但由于 RAPD 技术采用的引物较短, 反映快速、灵敏、高效; 退火温度低, 导致其对反应条件很敏感, 稳定性较差, 且不同物种对反应的要求也存在差异, 而且在国内外有关 RAPD 反应条件的优化研究, 大多采用单因子试验的方法, 难免会忽视各因子之间的相互作用效应。试验采用正交试验设计从 TaqDNA 聚合酶、MgCl₂、dNTPs 引物浓度及 DNA 用量 5 种因素 4 个水平对辣椒 RAPD 反应体系进行优化, 并在此基础上对 PCR 反应程序中的循环次数和退火温度进行比较, 建立最适合辣椒

RAPD 的反应体系, 进一步对湖南 9 个不同地方栽培种进行亲缘关系分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用湖南地方辣椒材料 9 份, 材料编号、品种名称及来源地见表 1。

表 1 试验材料及来源

编号	品种名称	来源	编号	品种名称	来源
1	紫羊角	湖南长沙	6	朝天椒	湖南株洲
2	小朝天椒	湖南长沙	7	小灯笼	湖南怀化
3	黄皮椒	湖南长沙	8	牛角椒	湖南怀化
4	大甜椒	湖南怀化	9	紫彩椒	湖南株洲
5	长尖椒	湖南益阳			

1.2 试验试剂

用于 RAPD-PCR 扩增反应的 RAPD 随机引物 (10 μ mol/L) 由北京赛百胜公司提供, TaqDNA 聚合酶 (5 U/ μ L), MgCl₂ (20 mM), dNTPs (10 mM) 以及 200 bp DNA Ladder Marker 等均购自上海生工公司; RAPD 扩增反应在生产 PCYL001 型 PCR 仪上进行; 电泳仪、电泳槽以及凝胶成像系统由湖南湘仪科技公司生产。经过初步筛选, 把引物 C₆ 作为此次正交试验的引物。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取 用 CTAB 法从供试材料的幼嫩叶片提取基因组总 DNA^[3], 对试验中的 TaqDNA 聚合酶、MgCl₂、dNTPs、引物的浓度及 DNA 用量采用正交设计法进行 5 因素 4 水平试验^[4], 反应的总体积为 15 μ L。方案见表 2 和表 3。反应程序参考 Bentzen P 等^[5] 的 Tuchdown 的方式: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 再进入 5 个 PCR 循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 40 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 然后进入 30 个循环, 每 6 个循环退火温度下降 1 $^{\circ}$ C, 从 39 $^{\circ}$ C 开始降到 35 $^{\circ}$ C, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分离 1 h, 电压为

第一作者简介: 蒋向辉 (1974-), 男, 湖南 安化人, 硕士, 讲师, 主要从事植物遗传与育种研究。E-mail: jxfei789@163.com。
通讯作者: 余朝文 (1964-), 男, 湖南 会同, 教授, 博士, 主要从事植物分子细胞遗传学研究。E-mail: shechaowe@tom.com。
基金项目: 怀化市科技局科技基础条件平台建设资助项目 (06-6)。
收稿日期: 2007-05-17

5 V/cm, 0.5 μg/L 的溴化乙锭染色, 在紫外成像系统上进行观察并拍照。

1.3.2 退火温度梯度与循环次数试验 参照高燕会等^[6]的方法利用筛选后的最佳的 RAPD 体系对温度进行梯度试验, 设置的退火温度在 35~40℃之间, 比较退火温度对谱带清晰度和数量的影响。进一步设定循环数分别为 34、36、38 与 40, 变性、退火和延长分别设为 1 min、45 s、1 min 和全设为 45 s 的 2 因素 3 次重复试验, 探索最佳的循环次数和变性、退火和延长时间。

1.4 RAPD 标记结果统计分析

每对 RAPD 引物检测 2~3 个位点, 每条多态性带视为 1 个等位基因, 将观测到的每条带视为 1 个性状, 有此带时记为“1”, 无此带时记为“0”。采用 CLUSTALW 1.8 软件对所得数据进行排列后, 用 Phylogenetic tree 菜单中的 Drawtree 命令进行聚类作图, 并计算参试材料的距离矩阵(以差异百分数表示), 以 DNAman 格式输出结果。距离计算采用 Kimura 参数法^[7], 聚类作图采用 UPGMA 法。

表 2 RAPD-PCR 体系的因素水平

水平	处理				
	Primer /μL	Dntp /μL	MgCl ₂ /μL	Taq /μL	DNA /μL
1	0.70	0.10	1.00	0.15	1.00
2	0.75	0.15	1.20	0.20	1.20
3	0.80	0.2	1.50	0.25	1.50
4	0.85	0.25	2.00	0.30	2.00

表 3 RAPD-PCR 正交试验设计表(L₁₆4⁵)

处理号	Primer /μL	dNTP /μL	MgCl ₂ /μL	Taq /μL	DNA /μL
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

2 结果与分析

2.1 各组份最适浓度配比的筛选

Taq 酶、Mg²⁺、dNTPs、引物浓度和 DNA 用量筛选根据试验的正交设计进行 PCR 扩增和电泳检测, 结果表明: Taq 酶、Mg²⁺、dNTPs、引物浓度及 DNA 用量都对 RAPD 有影响, 结果显示只有第 7、9、14、15、19、20 组能扩增出带, 其中以第 7 组扩增出的条带最为清晰稳定(如图 1 左和图 1 中), 即在 15 μL 反应体系中引物 0.75 μL(0.5 μmol/L)、dNTP 0.2 μL(0.13 mM)、MgCl₂ 22 μL(2.67 mM)、Taq 0.15 μL(0.75 U/μL)、DNA 1.2 μL(40~50 ng)为湖南地方辣椒品种 RAPD 反应的最佳配比。

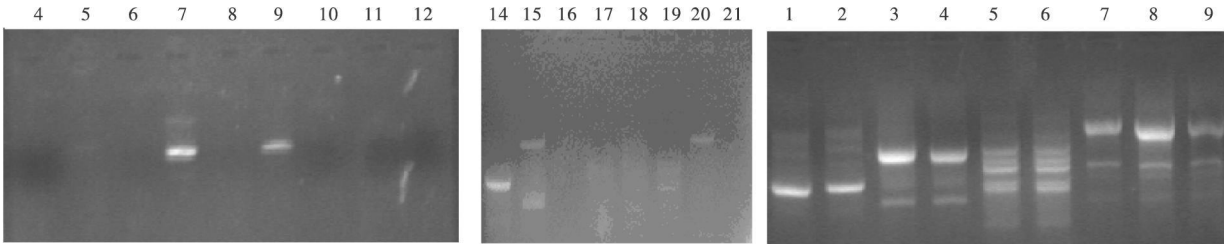


图 1 5 因素试验结果(左与中)及 C₆ 引物在 9 个地方辣椒品种的扩增条带(右)

2.2 最适退火温度的筛选

在对上述影响 RAPD 扩增效果的一系列重要因子进行优化的基础上, 通过设定不同的 PCR 退火温度试验发现辣椒 RAPD 的最佳退火温度为 37℃, 结果如图 1(右)。进一步设定的不同变性、退火和延长时间及循环数进行 PCR 发现, 循环数在 34~40 之间 PCR 扩增结果无明显差异, 循环过程中变性、退火、延伸分别设为 1 min、45 s、1 min 的效果都比设为 45 s 的扩增效果要好。因此, 对 9 个地方辣椒品种适宜的扩增条件为 94℃预变性 4 min, 再进入 40 个 PCR 循环 94℃变性 1 min, 37℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

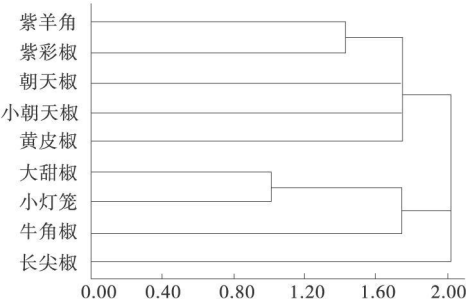


图 2 RAPD 标记的 UPGMA 聚类图

2.3 供试品种 RAPD 分子标记聚类

基于 10 对 RAPD 标记所得的数据 对湖南 9 个地方辣椒品种进行了聚类分析,并绘制树状图(图 2)。结果显示:以遗传距离 1.8 为界,9 份不同材料可分为两个组 紫羊角、紫彩椒、朝天椒、小朝天椒与黄皮椒为一组;大甜椒、长尖椒、牛角椒与小灯笼为一组。通过遗传距离分析发现,紫羊角与紫彩椒遗传距离为 1.42,大甜椒与小灯笼遗传距离最近,仅为 0.94,大甜椒与小灯笼是怀化地区农民广泛栽种的品种,成熟后两者都是鲜红色,大甜椒大而辣味较轻,小灯笼小而辣味较浓,都是农民长年留种繁殖的品种,可能来源于相同的祖先。紫彩椒果实有绿色、紫色和红色 3 种颜色 紫羊角成熟果皮呈紫红色,两者株高差异不大,从植物学形态看两者亲缘关系也较近。

3 小结与讨论

试验通过对影响辣椒 RAPD 反应的各因子进行正交设计试验,得到辣椒最佳的反应体系和反应程序试验结果表明 15 μ L 反应体系中各组份的最佳配比是:1 \times buffer, MgCl₂ 2.67 mM, dNTPs 0.13 mM, Primer 0.5 μ mol/L, Taq 0.75 U/ μ L, DNA 40~50 ng。适宜的扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,再进入 40 个 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 37 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。对于湖南 9 个地方辣椒品种进行聚类分析结果表明:运用 RAPD 分子标记与形态标记之间有很大的相关性,运用 RAPD 技术对辣椒进行区分鉴定是确实可行的,并且 RAPD 分子标记能鉴定在品种演化过程中出现的分化现象。

Mg²⁺ 是 Taq 酶的激活剂, Mg²⁺ 浓度过低对 Taq 酶的活化作用不够,过高又会抑制该酶的活性。张彦萍等^[10] 认为 Mg²⁺ 浓度是影响扩增特异性主要的因子之一,在以往的试验中也发现 PCR 扩增效率对 Mg²⁺ 浓度

极为敏感。但是反应体系中所示 Mg²⁺ 浓度并不一定是参加反应的游离 Mg²⁺ 浓度,反应体系中 DNA 模板的浓度、纯度、引物、dNTP 均会影响 Mg²⁺ 浓度。因此,试验对主要影响 PCR 扩增效率的组份进行多因素正交试验设计是合理有效的。

地方辣椒品种是长期人工选择与自然淘汰的产物,对本地区的气候、土壤条件和耕作条件及群众消费习惯有高度的适应性,对不利的气候和土壤因素有较强的抗性 or 耐性,甚至对地区的某些病虫害也有一定减免受害的性能,地方辣椒品种并且包含丰富的基因型,是一种重要的育种原始材料。但随着植物育种工作的开展,优良品种的迅速推广和种植,使传统的地方品种被取代,辣椒的遗传基础急剧减少。对地方辣椒种质材料进行综合客观的评价,了解种质间的遗传多样性,在种质保存、进一步创新和杂交育种中的亲本选配具有重要意义。

参考文献

[1] 王志敏,黄琴.蔗糖和植物生长调节剂对离体培养穗籽粒建成的影响[J].种子,2002,4(124):5-6.
[2] 贾继增.分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J].中国农业科学,1995,29(4):1-10.
[3] 王珍,方宣钧.植物 DNA 分离[J].分子植物育种,2003(2):278-294.
[4] 盖钧益.试验统计方法[M].1版.中国农业出版社,2000.278-294.
[5] Bentzen P, Olsen J B, McLean J E, et al. Kinship Analysis of Pacific Salmon: Insights Into Mating, Homing, and Timing of Reproduction[J]. The Journal of Heredity, 2001, 92(2): 127-136.
[6] 高燕会,朱玉球,黄华宏,杨梅. RAPD-PCR 体系的正交优化研究.生物技术,2006,16(3):55-58.
[7] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J. Mol. Evol, 1980, 16: 111-120.
[8] 张彦萍,刘海河.西瓜 RAPD-PCR 体系的正交优化研究[J].河北农业大学学报,2005,28(4):51-53.

Orthogonal Optimization of RAPD System for Pepper Varieties in Hunan Province

JIANG Xiang-Hui^{1,2}, SHE Chao-Wen^{1,2}, ZHANG Ling-Ling¹, WU Xian-Jin^{1,2}

(1. Department of Bioengineering, Huaihua College, Huihua, Hunan 418008, China; 2. Key Laboratory of Huaihua for Breeding and Bioprocess Technology, Huihua, Hunan 418008, China)

Abstract: In the study several important parameters influencing RAPD of local *Capsicum annuum* L. varieties were studied in order to establish the optimum RAPD system of local *Capsicum annuum* L. varieties. The RAPD reaction system was established with orthogonal design. The results showed the optimum volume of 15 μ L RAPD system consisted of 1 \times buffer, 2.67 mmol/L MgCl₂, 0.13 mmol/L dNTPs, 0.5 μ mol/L primer, 0.75 u Taq DNA polymerase and 40~50 ng template DNA. The suitable PCR procedure is one cycle denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 4min, 40 cycles which involves denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 1min, annealing at 37 $^{\circ}$ C for 45s and extending at 72 $^{\circ}$ C for 1min, one cycle extending at 72 $^{\circ}$ C for 10min, and then kept at 4 $^{\circ}$ C.

Key words: Local *Capsicum annuum* L. varieties; RAPD reaction system; Orthogonal design