

# 均匀设计法优化彩色马蹄莲品种的 RAPD-PCR 反应体系

陆 波<sup>1</sup>, 郑玉红<sup>1</sup>, 彭 峰<sup>1</sup>, 束晓春<sup>1</sup>, 陈晓萱<sup>2</sup>

(1. 江苏省中国科学院植物研究所 南京中山植物园, 江苏 南京 210014; 2. 江苏大千生态景观股份有限公司, 江苏 南京 210024)

**摘 要:**以 7 个彩色马蹄莲品种为研究对象, 以品种 Prafait DNA 为模板, 采用均匀设计法对影响彩色马蹄莲 RAPD-PCR 反应的 4 因素(模板 DNA 浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度)在 3 个水平上进行  $U_{12}(3^4)$  优化试验。结果表明:最佳的彩色马蹄莲 RAPD-PCR 的反应体系为: 20  $\mu$ L 体系中含有 25 ng 的模板 DNA, 0.125 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 1 $\times$ buffer 反应缓冲液, 0.55 mmol/L 引物, 1.0 U 的 *Taq* DNA 聚合酶。

**关键词:**彩色马蹄莲; 均匀设计法; RAPD-PCR

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>64 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0123-04

彩色马蹄莲(*Zantedeschia hybrida*)为天南星科(Araceae)马蹄莲属(*Zantedeschia* Spreng.)多年生草本花卉。马蹄莲属原产于非洲中南部,共有 7 个种(表 1),可分为白花马蹄莲和彩色马蹄莲两大类。目前世界上栽培的彩色马蹄莲多为彩色马蹄莲的 6 个原种杂交及回交形成的园艺品种<sup>[1-3]</sup>。彩色马蹄莲因其典雅别致的花形、花色及叶形,早在 1664 年就作为观赏花卉引入欧洲,栽植于法国巴黎皇家花园。1925 年意大利植物学家 Frangcesco Zantedeschia 首次命名彩色马蹄莲<sup>[4]</sup>。但其商业化生产直到 20 世纪初才正式展开,20 世纪 70 年代后,新西兰、荷兰及美国等国家开始了对彩色马蹄莲的

品种改良;20 世纪 80 年代更是出现了不少杂交园艺品种,这也带动了世界范围内彩色马蹄莲研发,促进了彩色马蹄莲产业的发展。我国虽然从 20 世纪 80 年代开始引种栽培彩色马蹄莲,但近年来关于种球休眠机理、花期调控和育种及品种鉴定等方面研究报道很多,发展也较快。

随着国外新的杂交园艺品种的大量引入及国内自身新品种培育,彩色马蹄莲在推广过程中所面临的品种权、细菌性软腐病问题,对彩色马蹄莲的产业发展造成了极大的束缚。因此,有必要对现有的杂交园艺种进行分类整理,利用分子技术确定品种间亲缘关系远近,这既可以选择亲本、构建分离群体和基因定位的基础,同时又可用来预测其杂种优势<sup>[5]</sup>。这方面的研究,Yao J L 等<sup>[6]</sup>利用 *Z. odorata* 与 *Z. aethiopica* 杂交,研究品种间的染色体组和质体基因组不相容的原因。张永春等<sup>[7]</sup>从 ISSR 分子标记入手,对 10 个彩色马蹄莲进行了遗传多样性和品种的分子鉴定,为系统分析彩色马蹄莲的遗传多样性和品种选育做了开拓性的工作。随着新的杂

**第一作者简介:**陆波(1979-),男,安徽马鞍山人,硕士,现主要从事观赏植物快繁与栽培及产业化研究工作。

**责任作者:**彭峰(1955-),男,硕士,研究员,现主要从事观赏植物育种与快繁及产业化研究工作。E-mail:pfeng@vip.sina.com。

**基金项目:**江苏省科技支撑计划资助项目(BE2009324);常州市科技支撑计划资助项目(CE20112015)。

**收稿日期:**2012-03-15

**Abstract:** Using 'Gexin No. 1' tobacco seeds as test materials, *FAD7* gene was transferred into tobacco leaves with the help of *Agrobacterium tumefaciens*. Shoots were regenerated on MS medium supplemented with 300 mg/L Ampicillin, 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA and rooted on MS medium with 300 mg/L Ampicillin and 100 mg/L Kanamycin. PCR analysis proved *FAD7* gene integration into Kanamycin resistance plants. The results of PCR analysis in  $T_1$  generation transgenic plants showed that the transformed gene could inherit to next generation, it grew well under low temperature. The parameters of leave chlorophyll fluorescence  $F_0$  decreased slightly, and the values of  $F_v/F_m$  kept high level after *CsFAD7* gene transformed into tobacco. fatty acid analysis showed that the contents ratio of linolenic acid in leaves were higher in transgenic tobacco than in wild type tobacco.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*; *Agrobacterium tumefaciens*; cucumber; *FAD 7* gene

交园艺种的引入,有必要深入分析彩色马蹄莲个园艺品种间的亲缘关系,为其种质创新提供理论依据。该研究以 7 个彩色马蹄莲品种为研究对象,建立彩色马蹄莲 RAPD 分子标记体系技术,为从分子角度探讨彩色马蹄莲园艺品种的亲缘关系提供分子生物学资料。

均匀设计(Uniform Design)由方开泰和王元 2 位数学家于 1978 年创立<sup>[8]</sup>,是基于试验点在整个试验范围内均匀散布的、从均匀性角度出发的一种试验设计方法。该研究利用均匀设计法对主要影响 RAPD 反应的模板 DNA、Primer、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs 的浓度等 4 个因素进行分子标记优化体系的探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

彩色马蹄莲品种于 2002 年和 2007 年分别引自荷兰和新西兰,所有品种均种植于南京中山植物园实验温室。于 2011 年 7 月 10 日随机采集组培繁殖移栽后的 5 盆盆栽苗叶片,混合后,提取 DNA。

### 1.2 试验方法

1.2.1 模板 DNA 的制备与检测 采用北京百泰克生物技术有限公司出品的新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取彩色马蹄莲叶片 DNA。DNA 检测采用贝克曼库尔特(BECKMAN COULTER)公司生产的 DU800 紫外/可见分光光度计测定 DNA 纯度和含量, $A_{260}/A_{280}$  于 1.8 左右为适,可用于试验分析,所得 DNA 浓度为( $mg/L$ )= $OD$  值  $A_{260} \times 50 \times$  稀释倍数<sup>[9]</sup>。

表 1 供试的 7 个彩塑马蹄莲品种

Table 1 Status of seven cultivars of *Zantedeschia hybrida* tested

品种名	引进地	引种时间	特性
Cultivar name	Introduced contry	Introduced time	Characteristics
Parfait	荷兰	2002 年	深红色到奶油粉色;叶宽长矛形,上面有斑点
Pink Diamond	荷兰	2002 年	粉玫瑰色;叶宽长矛形,上有斑点
Improved Rose Gem	荷兰	2002 年	粉红偏红;叶剑形
Improved Lavender Gen	荷兰	2002 年	粉红偏紫,有黑喉;叶剑形
Florex Gold	新西兰	2007 年	黄色;叶盾剑形
Golden Affair	新西兰	2007 年	金黄色;叶长矛形
Majestic Red	新西兰	2007 年	深红色叶;叶长矛形

1.2.2 RAPD-PCR 引物筛选 参照 RAPD-PCR 一般程序,对上海英潍捷基公司合成的 17 条引物寡聚核苷酸引物进行扩增。

1.2.3 RAPD 扩增反应体系 参照赵英均匀设计试验研究方法<sup>[10]</sup>,对影响彩色马蹄莲 RAPD-PCR 扩增的  $Mg^{2+}$ 、DNA、dNTPs、引物浓度等 4 个因素在 3 个水平上进行均匀设计优化试验,3 次重复,试验方案见表 2。

1.2.4 RAPD 扩增程序和产物检测 PCR 反应程序参照同为天南星科植物红掌(*Anthurium andraeanum*)的扩增程序<sup>[11]</sup>,稍加改动:94℃ 预变性 1 min;38℃ 复性 45 s,

72℃ 延伸 2 min,35 次循环;72℃ 延伸 7 min,最后置 4℃ 保存。扩增结束后,在反应体系中加入适量的溴酚蓝,于 LX-200 掌式离心机上混匀,全部点样于 1.2% 的琼脂糖凝胶上(含 1% 的溴化乙锭(EB)染色);在 1×TAE 电泳缓冲液中,于 140 V,200 mA 电场下电泳 20 min;后在 FR-200A 凝胶电泳图像分析系统中观测,照相。

表 2 彩色马蹄莲品种 RAPD-PCR 反应体系的均匀设计

Table 2 Uniform design of RAPD reaction system of *Zantedeschia hybrida*

水平	因素 Factors			
Levels	$Mg^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$	dNTPs/ $mmol \cdot L^{-1}$	Primer/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	DNA/ng
1	2.500	0.100	0.320	20
2	2.000	0.100	0.200	20
3	1.500	0.150	0.200	20
4	2.000	0.150	0.440	25
5	2.500	0.125	0.320	25
6	2.000	0.150	0.440	25
7	2.500	0.100	0.440	25
8	1.500	0.125	0.320	15
9	2.500	0.125	0.200	20
10	2.000	0.150	0.200	15
11	1.500	0.125	0.320	20
12	1.500	0.100	0.440	15

### 1.3 数据分析

参照李雪峰等<sup>[12]</sup>的方法,依据琼脂糖电泳条带的强弱及多少依次打分,然后对不同处理和评分结果进行分析,筛选出最佳 RAPD-PCR 反应体系;利用最佳反应体系进行稳定性验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 浓度和纯度检测

利用紫外分光光度计对提取的 DNA 样品进行检测,发现 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  均在 1.8 左右,表示蛋白质含量不超过 0.3%,对后面 RAPD-PCR 无较大影响;DNA 的浓度约为 500 ng/ $\mu L$ ,稀释后可用于 RAPD-PCR 反应体系。

### 2.2 RAPD 引物筛选

将提取的 DNA 稀释 10 倍后参照张永春等<sup>[7]</sup> ISSR-PCR 体系对 17 条寡居核苷酸引物进行筛选,根据条带有无,初步筛选出 14 条引物(图 1),引物序列见表 1。

表 3 筛选出的 RAPD 引物及其序列

Table 3 RAPD primers screened and the corresponding sequences

引物	序列 5'→3'	引物	序列 5'→3'
Primer	Sequence 5'→3'	Primer	Sequence 5'→3'
35	AGGTGACCGT	43	GTGAGGCGTC
36	CCACAGCAGT'	44	GGACCCAACC
37	CAAACGTCGG	45	GGGGGTCTTT
38	ACCCCGAAG	46	GTCGCGTCA
39	GTTGCGATCC-	47	CCGCATCTAC
40	GGACCCCTTAC	48	TCTGGTGAGG
42	ACCGCGAAGG'	49	GATGACCGCC

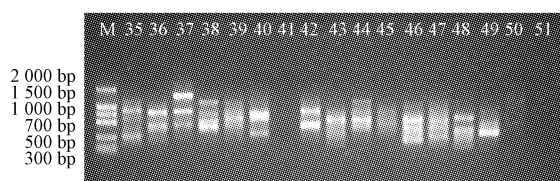


图1 RAPD 引物筛选结果

注:图中数字为引物编号;M:标准分子量 DL 2000.

Fig. 1 The results of RAPD primers screening

Note: The figures in the picture are the codes of the primers; M; DNA ladder DL 2000.

### 2.3 PCR 均匀设计试验结果直观分析

选择条带清晰且数目较多的 44 号引物为此次体系优化的引物,对彩色马蹄莲品种 Parfait 的 RAPD-PCR 体系进行优化,PCR 扩增结果进行电泳,结果见图 2。依据琼脂糖电泳条带的强弱及条带的多少依次打分。扩增性强、清晰度高、背景低的最佳产物记为 12 分,与此相反,最差的记为 1 分,3 次重复,平均评分结果依次为:5,3,11,6,6,5,3,12,10,9,10,2。据图 2 及平均评分结果可以得到彩色马蹄莲 Parfait RAPD-PCR 反应体系的最佳组合:即在 20  $\mu$ L 反应体系中,含 1 $\times$ Buffer,1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,0.125 mmol/L dNTPs,0.55  $\mu$ mol/L 引物, *Taq* E 1.0 U,25 ng 模板 DNA,ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。在彩色马蹄莲 RAPD 体系优化的同时,对 DNA 同步进行梯度分析,结果如图 3。从图 3 可以看出,稀释 50 倍的 DNA 扩增条带清楚,后续试验可采用 50 倍稀释液约 10 ng 作为模板反应浓度。

### 2.4 反应体系的稳定性验证

依据上述优化体系,采用 50 倍稀释 DNA 液,结

合均匀设计试验优化出的最佳反应体系,用 38 号和 39 号引物对 7 个彩色马蹄莲品种进行 RAPD-PCR,验证优化体系的重复性和稳定性(图 4)。从图 4 可以看出,所有品种均扩增出了清晰的条带,重复实验结果表明该体系具有较好的稳定性和可重复性。

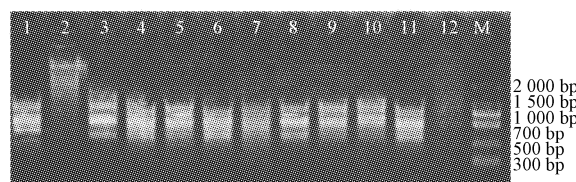


图2 DNA 浓度对 RAPD 反应影响分析

注:1~12 处理编号同表 1;M:标准分子量 DL 2000.

Fig. 2 Effect of template concentration on RAPD reaction

Note: The codes are the same as those in Table 1; M; DNA ladder DL 2000.

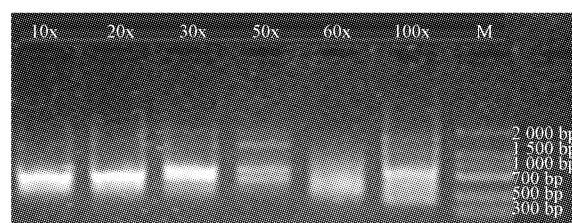


图3 彩色马蹄莲 DNA 浓度对 RAPD-PCR 的影响

注:图中数字为 DNA 稀释倍数;M:标准分子量 DL 2000.

Fig. 3 Effect of template concentration on RAPD reaction of *Zantedeschia hybrida*

Note: The figures in the picture are the dilution times of the template; M; DNA ladder DL 2000.

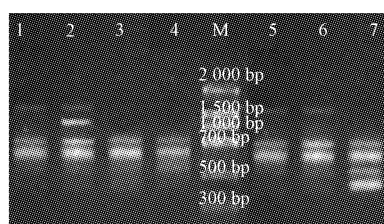


图4 不同彩色马蹄莲品种 38 号和 39 号引物扩增的试验结果

注:1~7 号 DNA 分别对应 Parfait、Majestic Red、Pink Diamond、Improved Rose Gem、Improved Lavender Gen、Florex Gold 和 Golden Affair; M:标准分子量 DL 2000.

Fig. 4 The amplification products generated by primer 38 and 39 of different cultivars of *Zantedeschia hybrida*

Note: the No. 1~7 template DNA are Parfait, Majestic Red, Pink Diamond, Improved Rose Gem, Improved Lavender Gen, Florex Gold and Golden Affair, respectively; M; DNA ladder DL 2000.

## 3 讨论与结论

与其它很多分子标记方法相比,RAPD 标记具有操作简单、效率高等优点,但同时也有重复性不如 AFLP 等标记的缺陷。在 RAPD 反应中,影响扩增的因素很多,早期报道中就有包括 PCR 缓冲液、dNTP 和  $Mg^{2+}$  浓度、循环参数(退火温度、变温时间等)、*Taq* DNA 聚合酶的来源及型号、模板 DNA 的质量和浓度、引物浓度等;

此外,不同的试验材料,扩增条件也不同。而 RAPD 带谱的准确性与稳定性是利用 RAPD 标记进行分析的前提条件,RAPD 反应最优化体系是完成种间聚类分析的前提和关键步骤<sup>[13]</sup>。所以,进行 RAPD 分析时,必须对 RAPD 体系进行优化,从而建立起具有高度重复性的反应体系。该研究对 RAPD 反应影响的 4 个因素进行优化设计,与张永春等<sup>[7]</sup>建立的彩色马蹄莲的 ISSR 反应



体系(每 20  $\mu\text{L}$  中含  $1 \times \text{Buffer}$ 、1.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 、0.6  $\mu\text{mol/L}$  引物、20 ng 模板 DNA、0.4 mmol/L dNTP、1 U DNA 聚合酶)和张君毅<sup>[14]</sup>使用的同为天南星科植物半夏[*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.]的 RAPD 扩增体系(每 20  $\mu\text{L}$  中含  $1 \times \text{Buffer}$ 、2.0 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 、0.2 mmol/L 引物、0.2 mmol/L dNTP、20 ng 模板 DNA、0.4 U DNA 聚合酶)相比,彩色马蹄莲 RAPD 和 ISSR 反应体系基本相同;但  $\text{Mg}^{2+}$  浓度、引物和 dNTP 浓度比半夏 RAPD 体系低;模板 DNA 的用量相近;DNA 聚合酶的用量则比半夏高。在 RAPD 反应条件优化的研究中,目前多采用正交实验方法,需要考虑“均匀散布”和“整齐可比”等特性,试验步骤相对繁琐。然而均匀设计只考虑试验点在试验范围内充分“均匀散布”而不用考虑“整齐可比”,因此试验的结果没有正交实验结果的整齐可比性,其试验结果的处理多采用回归分析方法<sup>[8]</sup>。此方法也进一步简化了试验步骤,为多因素多水平的实验开辟了新途径。

#### 参考文献

- [1] Nicolson D H. Translation of Engler's classification of Araceae with updating [J]. Aroidiana, 1982, 5(3): 67-88.
- [2] Traub H P. The genus *Zantedeschia* [J]. Plant Life, 1948(4): 9-32.
- [3] Perry P L. A new species of *Zantedeschias* (Araceae) from the western cape [J]. South African Journal of Botany, 1989, 55(4): 447-451.
- [4] Letty C. The genus *Zantedeschia* [J]. Bothalia, 1973, 2(5): 5-26.
- [5] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 108-127.
- [6] Yao J L, Cohen D, Rowland R E. Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of *Zantedeschia* (Araceae) [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(2): 255-260.
- [7] 张永春, 汤庚国, 褚云霞, 等. 彩色马蹄莲 ISSR 体系的建立及初步分析 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 827-832.
- [8] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [9] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 216.
- [10] 赵英, 张文辉, 朱宇林, 等. 柳树 RAPD 反应体系均匀设计试验研究 [J]. 玉林师范学院学报(自然科学), 2010, 24(4): 31-35.
- [11] 潘英文, 林明光, 刘福秀. 红掌组培苗遗传变异的 RAPD 检测技术研究 [J]. 热带作物学报, 2011, 32(3): 468-470.
- [12] 李雪峰, 张含国, 贯春雨, 等. 利用正交设计优化兴安落叶松 RAPD-PCR 反应体系 [J]. 植物研究, 2009, 29(1): 80-85.
- [13] 周章乐, 王振英, 彭永康, 等. 影响 RAPD 实验结果的稳定性和可靠性因素研究 [J]. 华北农学报, 2003, 18(3): 81-83.
- [14] 张君毅. 半夏遗传结构和多样性 RAPD 标记分析 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(18): 43-47.

## Optimization of RAPD Reaction System by Uniform Design on *Zantedeschia hybrida*

LU Bo<sup>1</sup>, ZHENG Yu-hong<sup>1</sup>, PENG Feng<sup>1</sup>, SHU Xiao-chun<sup>1</sup>, CHEN Xiao-xuan<sup>2</sup>

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen, Nanjing, Jiangsu 210014; 2. Jiangsu Daqian Ecology and Landscape Company Limited, Nanjing, Jiangsu 210024)

**Abstract:** Taking 7 varieties of *Zantedeschia hybrida* as materials, using color calla lily 'Praefait' DNA as template DNA, the concentration of  $\text{Mg}^{2+}$ , Primer, dNTPs and template DNA, which greatly influence the RAPD-PCR, were optimized by Uniform Design method  $U_{12}(3^4)$ . The results showed that optimum RAPD reaction system of *Zantedeschia hybrida* was every 20  $\mu\text{L}$  reaction system containing  $1 \times \text{PCR Buffer}$ , 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.55  $\mu\text{mol/L}$  primer, 0.125 mmol/L dNTPs, 25 ng DNA template and 1.0 U *Taq* DNA polymerase.

**Key words:** *Zantedeschia hybrida*; uniform design; RAPD-PCR