

# 谭清苏铁性别相关的 RAPD 标记研究

景建洲<sup>1,2\*</sup>, 李东亮<sup>1</sup>, 金红<sup>3</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 曹黎明<sup>1</sup>

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 郑州 450002; 2. 河南省生物工程技术研究中心, 郑州 450002; 3. 深圳市仙湖植物园科技部, 广东 深圳 518004)

**摘要:**以谭清苏铁(*Cycas tanqingii* D. Y. Wang)雌雄植株半年生羽叶为材料,用优化的 CTAB 法分别提取其全基因组 DNA,进行 RAPD 单因子梯度实验和正交实验以优化扩增条件。应用 160 个 RAPD 随机引物检测基因组 DNA,雌雄植株均扩增出 1 450 多条带,其中引物 S0465 扩增出与谭清苏铁雌株高度相关的 RAPD 标记,其大小约为 500 bp,该标记与雄株没有关联。

**关键词:**谭清苏铁; 性别; RAPD; 分子标记

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)03-0198-05

## Identification of a Sex-associated RAPD Marker in *Cycas tanqingii* D. Y. Wang

JING Jian-zhou<sup>1,2\*</sup>, LI Dong-liang<sup>1</sup>,  
JIN Hong<sup>3</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, CAO Li-ming<sup>1</sup>

(1. College of Food and Biology Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Bioengineering Technology Research Center, Zhengzhou 450002, China; 3. Shenzhen FairyLake Botanical Garden, Shenzhen 518004, China)

**Abstract:** The total genomic DNA was extracted from half-a-year-old leaflets of the male and female cycads (*Cycas tanqingii* D. Y. Wang) using an optimized CTAB protocol. The RAPD-PCR amplification conditions were optimized by monofactor and multifactor orthogonal experiments. A total of 160 primers were used for RAPD-PCR amplification and more than 1 450 fragments were obtained from both male and female plants. A fragment of about 500 bp only linked to the female was generated by the S0465 primer, which can be used in sex determination of *C. tanqingii*.

**Key words:** *Cycas tanqingii*; Sex; RAPD; Molecular markers

苏铁类植物是地球上现存的最原始种子植物之一。因受环境变化和人为破坏的影响,苏铁类植物呈现出一些不适应环境的生存弱点,如生长发育期长、雌雄异株且雌雄比例约为 3:1、花期不同、不易授粉繁殖、自然结实率低等,致使苏铁类植物濒临灭绝,保护苏铁类植物已经刻不容缓<sup>[1]</sup>。谭清苏铁(*Cycas tanqingii* D. Y. Wang)是 1996 年发表的 1 个新种,分布于我国云南省小黑江流域及越南的黑水

河流域海拔 800 m 以下的山地雨林和热带雨林中<sup>[1]</sup>。谭清苏铁种群脆弱,抗干扰能力差,如果得不到有效保护,就有灭绝的危险<sup>[2]</sup>。谭清苏铁开花较晚,在性成熟之前雌雄植株在形态上无法区分,对于就地保护的野生种群,很难确定种群的性别结构,迁地保护及引种回归也需要知道植株的性别,按照一定的性别比例交叉种植。因此,在性成熟之前对谭清苏铁进行性别鉴定对于就地保护和迁地

收稿日期:2006-08-04

接受日期:2007-01-11

基金项目:深圳市城市管理局项目;河南省青年骨干教师项目(教高 2005-461-110)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

保护中雌雄植株的定向繁育, 以及谭清苏铁的引种回归都具有重要意义。

目前对苏铁的研究主要集中在种质资源收集与保护、系统分类、形态解剖、病虫害防治、生理生化分析及开发价值等方面<sup>[1]</sup>。在分子生物学方面, Xiao 等<sup>[2]</sup>利用 ISSR 研究了贵州苏铁 (*Cycas guizhouensis* K. M. Lan et R. F. Zou) 的种间差异, 马永等<sup>[3]</sup>优化了 ISSR 的扩增条件, 进而应用 ISSR 研究了叉孢苏铁 (*Cycas segmentifida* D. Y. Wang et C. Y. Deng) 在不同居群中的遗传多样性, 王晓明等<sup>[4]</sup>利用 ISSR 分析了仙湖苏铁野生种群的遗传多样性。随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 分子标记技术在许多雌雄异株植物的性别研究上都有应用, 如大麻 (*Cannabis sativa* L.)<sup>[6]</sup>、银杏 (*Ginkgo biloba* L.)<sup>[7]</sup>、罗汉松 (*Podocarpus macrophyllus*)<sup>[8]</sup> 等。本文利用 RAPD 分子标记技术, 以寻找与谭清苏铁性别高度相关的分子标记性别决定基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

分别取 10 株已知性别的谭清苏铁 (*Cycas tanqingii* D. Y. Wang) 雌、雄植株的半年生羽叶 (采自深圳仙湖植物园苏铁种质资源保护中心的栽培植株), 硅胶干燥室温存放。凭证标本 (王定跃 5538、5539、5540) 存放于深圳市仙湖植物园植物标本室 (SZG)。

### 1.2 全基因组 DNA 提取

采用优化后的 CTAB 法<sup>[9]</sup>提取雌、雄植株全基因组 DNA, 并检测其质量、纯度和浓度。

### 1.3 PCR 单因子实验

由 Fevzi Bardakci 的实验原理<sup>[10]</sup>设计了原始的 RAPD 实验条件。反应体系为 20  $\mu$ l, 包含 1 $\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.4), Mg<sup>2+</sup>、dNTP、RAPD 引物 (上海生工)、Taq DNA 聚合酶 (天为时代)、模板 DNA 和无菌双蒸水。RAPD 扩增参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 再进行 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s、36 $^{\circ}$ C 退火 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 的 35 次循环扩增, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶、97 V 电压在 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中电泳 1.5 h, 0.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> EB 染色紫外灯下检测, 凝胶成像系统照

相记录结果。

在原始实验参数的基础上分析实验影响因子, 设计了单因子梯度实验 (表 1)。在每次单因子实验中, 除了该因子梯度变化外, 其他因子不变。

表 1 RAPD 扩增体系单因子实验设计

Table 1 The monofactor design for optimizing RAPD reaction system

编号 No.	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	dNTP (mmol/L)	引物 Primer ( $\mu$ mol/L)	Taq (U)	DNA (ng)
1	0	0	0	0	0
2	0.25	0.05	0.05	0.05	4.5
3	0.5	0.08	0.1	0.1	13.5
4	1	0.13	0.2	0.2	45
5	2	0.25	0.4	0.4	135
6	2.5	0.38	0.8	0.8	450
7	3.5	0.56	1.6	1.5	1350
8	5	0.73	3.2	3	4500

### 1.4 正交实验

由单因子实验选择正交实验水平 (表 2), 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

表 2 RAPD 体系优化正交实验表

Table 2 The orthogonal design for optimizing RAPD reaction system

编号 No.	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	dNTP (mmol/L)	引物 Primer ( $\mu$ mol/L)	Taq (U)	DNA (ng)
1	2	0.15	0.2	0.5	45
2	2	0.2	0.25	1	100
3	2	0.25	0.3	1.5	200
4	2	0.3	0.4	2	400
5	2.5	0.15	0.25	1.5	400
6	2.5	0.2	0.2	2	200
7	2.5	0.25	0.4	0.5	100
8	2.5	0.3	0.3	1	45
9	3	0.15	0.3	2	100
10	3	0.2	0.4	1.5	45
11	3	0.25	0.2	1	400
12	3	0.3	0.25	0.5	200
13	3.5	0.15	0.4	1	200
14	3.5	0.2	0.3	0.5	400
15	3.5	0.25	0.25	2	45
16	3.5	0.3	0.2	1.5	100

### 1.5 特异 RAPD 引物筛选

应用正交实验优化出来的最佳 RAPD 实验条件, 从 160 个 RAPD 随机引物中, 可以筛选出鉴别

谭清苏铁雌、雄的合适引物,用来扩增雌株与雄株的特异性片段,并鉴定该片段的稳定性。电泳时用 GeneRuler™100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)作 Marker 参照。

## 2 结果和分析

### 2.1 RAPD 单因子实验

由图 1A 可以看出,  $Mg^{2+}$  浓度为 0.5–3.5 mmol/L 均有扩增条带,以  $Mg^{2+}$  为 2.0、2.5 mmol/L 时的扩增效果较好。图 1B 表明, dNTP 浓度为 0.05–0.56 mmol/L 均有扩增且扩增的条带的亮度逐渐增加,当 dNTP 浓度为 0.15–0.30 mmol/L 扩增效果较

好;图 1C 表明,引物浓度为 0.05–3.0  $\mu\text{mol/L}$  均有扩增,当引物浓度为 0.2–0.4  $\mu\text{mol/L}$  扩增效果较好;由图 1D 可以看出, *Taq* 酶的量在 0.05–2.0 U 内均能扩增出来清晰条带且条带数目逐渐增加,当 *Taq* 酶量为 0.5–2.0 U 扩增效果较好;图 1E 表明,模板 DNA 的量为 4.5 ng–4.5  $\mu\text{g}$  均有扩增,当 DNA 的量为 45–450 ng 有较好扩增。

### 2.2 正交实验结果

由图 2 可以看出,泳道 2、3、4、7、8、11、12 和 16 扩增的条带单一清晰,亮度高,容易分辨各条带,其中泳道 2、11、12 扩增的条带最清晰易于分辨,泳道 11、12 扩增的条带亮度最高。

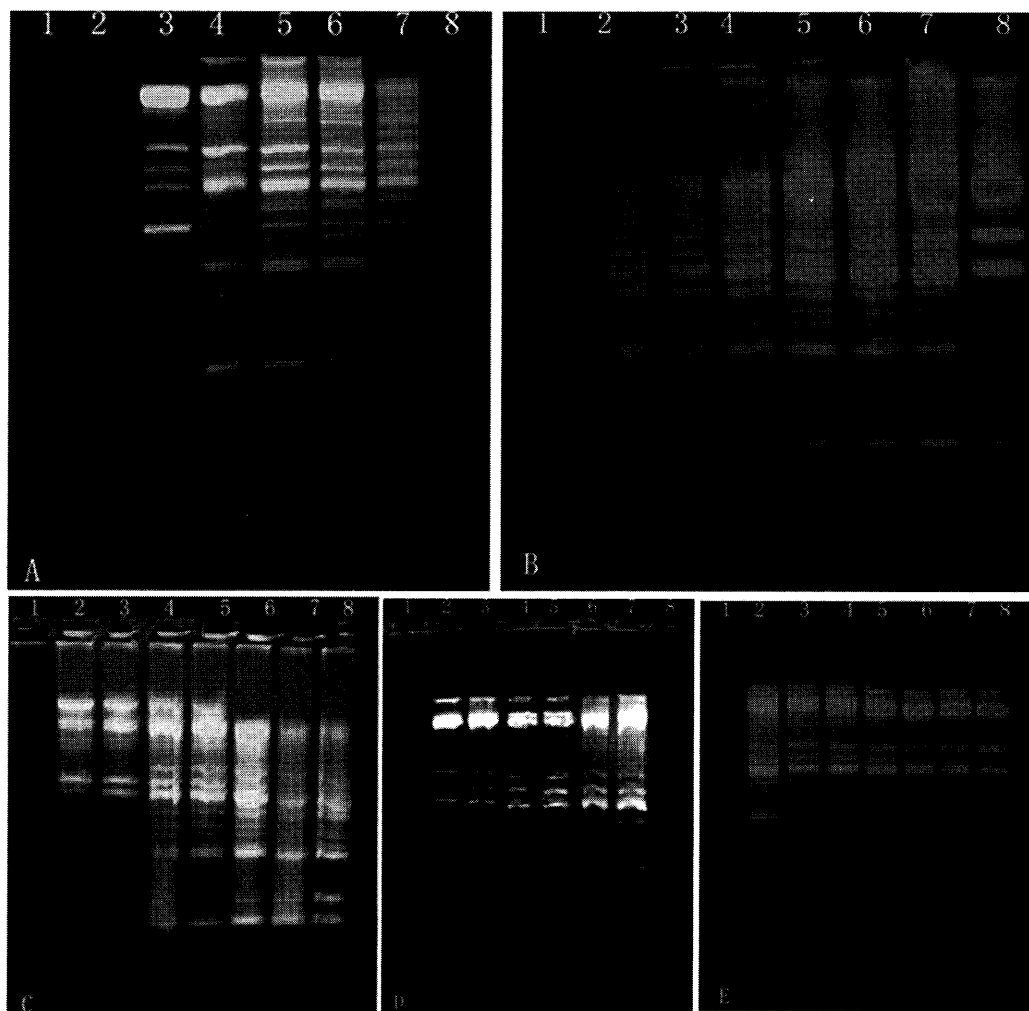


图 1 单因子设计优化的 RAPD 扩增结果

Fig. 1 RAPD-PCR amplification of DNA in *Cycas tanqingii* based on monofactor test

A: 1–8: 0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 2.50, 3.50, 5.00 mmol/L  $Mg^{2+}$ ; B: 1–8: 0, 0.05, 0.08, 0.13, 0.25, 0.38, 0.56, 0.7 mmol/L dNTP; C: 1–8: 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60, 3.20  $\mu\text{mol/L}$  primer S0036; D: 1–8: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.0 U *Taq* enzyme; E: 1–8 :0, 4.5, 13.5, 45, 135, 450, 1350, 4500 ng template DNA.

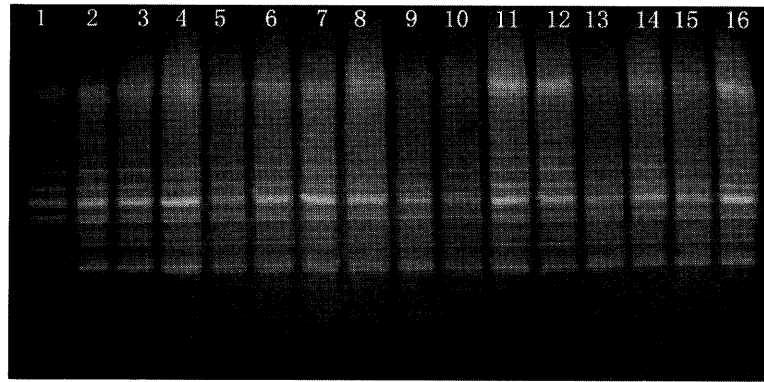


图2 RAPD 反应体系影响因子正交实验

Fig. 2 RAPD-PCR amplification of DNA in *Cycas tanqingii* based on orthogonal test

1-16 对应表 2 的编码 seen in Table 2.

### 2.3 因素优化结果

由单因子梯度实验和正交实验优化出适合本实验的扩增条件,其反应体系为:1×*Taq* DNA 聚合酶缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L KCl, 10 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 8.4), 2.75 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ , 0.275 mmol/L dNTP, 0.75  $\mu\text{mol/L}$  引物, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 100 ng DNA。

### 2.4 性别相关标记的建立

用 160 条 RAPD 随机引物对雌、雄植株全基因组 DNA 进行扩增,共扩增出 1 450 多条带,平均每条引物可扩增出 8.6 条带,大小在 150–1 400 bp 之内。其中只有引物 S0465(CCCCGGTAAC)在谭清苏铁雌株上扩增出约 500 bp 的特异条带(标记为 TQS465-500)。该片段可作为谭清苏铁性别鉴别的

RAPD 标记,该标记与雄株没有关联,结果见图 3。

## 3 讨论

单因子梯度和正交实验表明,适合 RAPD-PCR 扩增的引物浓度范围较宽,扩增条带的数目和清晰度几乎一样,并且 RAPD 引物仅有 10 bp,退火温度比较接近,相对的  $\text{Mg}^{2+}$  的影响较弱,所以本实验中的 160 个 RAPD 引物都可以用引物 S0036 所优化的条件进行扩增。纯度较高的模板 DNA 的量适用范围较大,在 4.5 ng–4.5  $\mu\text{g}$  均有扩增,且扩增带纹清晰,条带数目也几乎一样,仅亮度有细微差别。

目前,利用 RAPD 技术从雌雄异株植物扩增出的性别特异性片段大小一般在 150–2 500 bp 之间,而且这些标记大多是雄性特异性的。对于那些有明确性染色体的物种来说,此标记可能是与雄性相连锁的,因为雄性一般是异型染色体。但在那些性染色体还未鉴定的物种中,存在雄性连锁的标记表明该物种存在性染色体或者是此标记是与性别决定基因紧密连锁的<sup>[1]</sup>。雌性连锁的分子标记已在蒿柳(*Salix viminalis*)、猕猴桃(*Actinidia chinensis*)等中有过描述,推测这种标记可能与雌性决定基因紧密连锁<sup>[2]</sup>。本文用 RAPD 技术筛选出的与雌株相关的分子标记,可用于谭清苏铁的早期性别鉴定,同时该标记的获得为克隆与性别相关的基因奠定了基础。

由于 RAPD 标记稳定性不够,且大多为显性标记,所以在获得 RAPD 标记后,一般将其转化为 SCAR 标记,才能在实践中得到较好的应用。本研究利用 RAPD 技术,探讨谭清苏铁两性间的基因组差异,筛选与性别相关的分子标记,克服了形态、生理生化指标受环境及发育阶段影响的缺点。通过对本

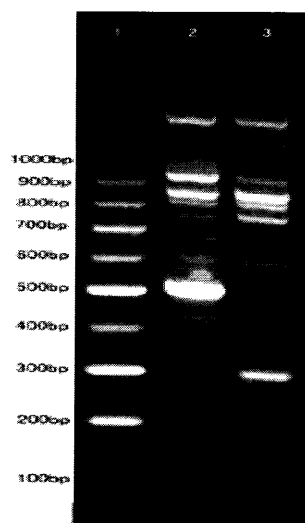


图3 谭清苏铁雌株性别相关标记 TQS465-500

Fig. 3 Sex-associated RAPD marker TQS465-500 in *Cycas tanqingii*

1: Marker; 2: 雌株 Female; 3: 雄株 Male

研究获得的与雌性相关的 RAPD 标记的进一步克隆与测序,设计 1 个性别特异性的 PCR 引物,将其转化为重复性和特异性的更好的 SCAR 标记(正在研究中),用于苏铁性别的早期鉴定。随着分子生物学技术的日益发展,分子生物学鉴定将成为一种可靠的鉴别途径,也可能是最终解决植物性别鉴定的最好方法。

此外本研究中,用 160 个引物在雌雄基因组的扩增,共得到 1 450 多个条带,相当于检测了约 1 450 个位点,但只有 1 个位点表现出性别差异。这表明,雌雄异体的谭清苏铁与其他两性生物一样,虽然性器官及生理行为等方面存在差异,但遗传信息的绝大部分是一致的。

### 参考文献

- [1] Wang F X(王发祥), Liang H B(梁惠波), Chen T Q(陈谭清), et al. Cycads in China [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1996: 134–137.(in Chinese)
- [2] Tian B(田波), Gong X(龚洵), Zhang Q T(张启泰), et al. Study on the habitat, population and dynamics of *Cycas tanqingii* [J]. Acta Bot Borreal-Occid Sin(西北植物学报), 2005, 25(1): 133–137.(in Chinese)
- [3] Xiao L Q, Ge X J, Gong X, et al. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) [J]. Ann Bot, 2004, 94: 133–138.
- [4] Ma Y(马永), Li N(李楠), Zhong Y C(钟业聪), et al. Optimization and preliminary application of ISSR-PCR amplification for *Cycas segmentifida* [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 2005, 34(1): 10–13.(in Chinese)
- [5] Wang X M(王晓明), Lai Y L(赖燕玲), Xu X M(徐向明), et al. Genetic variation in the endemic plant *Cycas fairylakea* (Cycadaceae) from Meilin Forest Park in Shenzhen on the basis of ISSR analysis [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni(中山大学学报: 自然科学版), 2006, 45(3): 82–85.(in Chinese)
- [6] Mandolino G, Carboni A, Forapani S, et al. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98(1): 86–92.
- [7] Wang X M(王晓梅), Song W Q(宋文芹), Liu S(刘松), et al. RAPD markers related to sex locus in *Ginkgo biloba* L. [J]. Acta Sci Nat Univ Nankai (南开大学学报: 自然科学版), 2003, 34(3): 116–117.(in Chinese).
- [8] Cai L(蔡亮), Tian X C(田晓晨), Li M(李明), et al. Application of RAPD in discrimination of *Podocarpus macrophyllus*'s sex [J]. J Fudan Univ (Nat Sci) (复旦大学学报: 自然科学版), 2002, 41(6): 635–640.(in Chinese)
- [9] Li D L(李东亮), Jin H(金红), Jing J Z(景建洲), et al. Research of optimizing CTAB method in DNA extraction of cycas using orthogonal experiment design [J]. J Zhengzhou Univ Light Ind (Nat Sci) (郑州轻工业学院学报: 自然科学版), 2007, 22(2): 19–22. (in Chinese)
- [10] Bardakci F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers [J]. Turk J Biol, 2001, 25: 185–196.
- [11] Li R L(李瑞丽), Lu L D(卢龙斗), Gao W J(高武军), et al. Advances in sex identification of dioecious plants [J]. Guihaia (广西植物), 2006, 26(4): 387–390.(in Chinese)
- [12] Charles A. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants [J]. Ann Bot, 2000, 86: 211–221.