

RAPD 分子标记技术在植物研究上的应用

谭云, 李忠海*, 黎继烈, 贾媛 (中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南长沙 410004)

摘要 RAPD 分子标记技术是利用随机引物, 通过 PCR 扩增来检测 DNA 多态性的技术。文中主要介绍了 RAPD 分子标记技术的概念、基本原理以及优缺点, 总结了 RAPD 分子标记技术在植物研究上的应用现状, 并对 RAPD 分子标记技术在植物遗传多样性分析、基因指纹图谱构建、亲缘关系分析、品种鉴定以及药用植物和珍稀植物等方面的研究前景进行了展望。

关键词 RAPD; 遗传多样性; 基因指纹图谱; 品种鉴定

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)25-10236-03

Application of RAPD Molecular Marker Technology in Plant Research

TAN Yun et al (Department of Life Science and Technology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract Random amplified polymorphic DNA molecular marker technology use random primers through PCR amplification to detect the DNA polymorphism. The concept, basic principle, advantages and disadvantages of RAPD molecular marker technology were introduced, the application status in plant research was summarized, the research prospect of RAPD molecular marker technology in plant genetic diversity analysis, genetic fingerprinting construction, phylogenetic analysis, variety identification, medicinal plants and rare plants were forecasted.

Key words RAPD; Genetic diversity; Genetic fingerprint; Variety identification

近年来, 随着人们不断对遗传学和分子生物学进行了探索和研究, 越来越多的遗传标记方法被发掘, 包括在表现型水平上对基因间接反映的遗传标记, 如形态标记、细胞学标记和生化标记, 以及在 DNA 水平上对遗传变异的直接反映的遗传 DNA 分子标记。

目前, 常用的 DNA 分子标记技术有: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 技术、RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA) 技术、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 技术和 ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 技术。其中, RAPD 分子标记技术与其他 DNA 技术相比较, 具有操作简便、灵敏度高和多态性丰富等优点, 是研究物种遗传多样性和系统进化的重要技术, 并在农业、林业、医学、动物学、植物学和微生物学的各个领域都得到广泛应用。在植物研究方面的应用, 主要集中在物种遗传多样性分析、亲缘关系探讨、基因指纹图谱的构建以及物种品种鉴定等方面。笔者简要综述了 RAPD 分子标记技术的原理与特点, 详细描述了该技术在植物研究中的主要应用, 并对其应用前景进行了展望, 现报道如下。

1 RAPD 分子标记技术

1.1 RAPD 分子标记技术简介 RAPD 技术是 1990 年由 Williams 和 Welsh 领导的两个小组几乎同时发展起来的一种较为简便的检测 DNA 多态性技术^[1-2]。RAPD 分子标记技术因其操作简便、反应迅速和无放射性污染等特点在动植物和微生物的遗传多样性检测、品种鉴定、构建基因指纹图谱、基因定位、亲缘关系分析和系统进化等方面都得到了广泛应用^[3-4]。

1.2 RAPD 分子标记技术原理 RAPD 分子标记技术是以

一系列随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链为引物, 以所研究基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 经 35~40 个循环, 产生大量不同长度的具有的多态性 DNA 片段, 扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离, 经 EB 染色或银染来检测扩增产物 DNA 片段的多态性^[5-8]。这些扩增产物的多态性就反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。虽然每一个引物检测基因的 DNA 多态性是有限的, 但是随机引物数量很多, 基本上可以覆盖整个基因组, 所以从理论上讲, RAPD 分子标记技术可对物种的整个基因组 DNA 进行多态性检测^[9]。

1.3 RAPD 分子标记技术与 PCR 技术比较 RAPD 分子标记技术的本质是 PCR 反应, 其继承了 PCR 技术效率高、样品用量少、灵敏度高、特异性强和检测容易的优点, 并具有自身独特的优点: ① PCR 反应所用引物为 1 对, 长度为 20 bp 左右, 而 RAPD 分子标记所用引物为 1 个, 长度为 10 bp; ②经典的 PCR 反应复性温度高, 一般为 60℃ 左右, 而 RAPD 分子标记仅为 36℃ 左右; ③经典的 PCR 为特异扩增, 而 RAPD 分子标记为随机扩增。

1.4 RAPD 分子标记技术的优点 与其他分子标记技术相比, RAPD 分子标记技术有如下优点: ①RAPD 技术所需样品是基因组 DNA, 样品的采集不受时间限制, 不存在组织特异性, 可以直接在 DNA 水平上进行检测。②RAPD 技术对模板 DNA 的纯度要求不高, 直接用 DNA 粗提液均可扩增获得产物, 需求量小。③可以利用的随机引物多, 并且没有种族的特异性, 具广泛和通用性的特点。④RAPD 技术操作安全, 不需 DNA 探针, 不使用同位素进行分子杂交, 试验中所使用的药品的毒性较低。⑤操作简便, 物种不受环境和发育状况等影响, 价格低廉, 一般的实验室即可开展研究工作。⑥RAPD 技术扩增产物经琼脂糖电泳或 PAGE 检测, 灵敏度要比同工酶电泳染色法高得多, 因而可分辨出更多的多态片段, 做出更准确的判断。

基金项目 国家科技支撑计划课题(2012BAC01B07)。

作者简介 谭云(1989-), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 研究方向: 生物资源学, E-mail: tany_hncu@163.com。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事食品科学研究, E-mail: lizh11@163.com。

收稿日期 2013-08-01

1.5 RAPD 分子标记技术的不足 RAPD 分子标记技术虽然有其独特的优势,但也有其不足之处:首先,由于 RAPD 技术采用的引物的 T_m 值较低,扩增结果易受外界因素的影响,包括模板浓度和 Mg^{+} 浓度,所以试验的稳定性和重复性较差。其次,RAPD 技术为显性遗传(极少数为共显性遗传),不能鉴别纯合子基因和杂合子基因,提供的基因信息不完整。最后,RAPD 技术所使用的是随机引物,因此检测到的基因组位点不清晰。

2 RAPD 分子标记技术的应用

我国地大物博,生物资源极其丰富。但近年来,由于人类通过持续开发大自然来发展经济,自然环境遭到前所未有的破坏,我国特有的一些珍稀的物种如银杉、珙桐和红豆杉等都濒临灭绝。而利用 RAPD 技术,分析物种的遗传多样性和亲缘关系,可以构建物种的基因指纹图谱,保护珍稀物种的种质资源。

2.1 RAPD 分子标记技术在植物遗传多样性分析上的应用 遗传多样性是保护生物学的核心之一,广义的遗传多样性是指地球上所有生物所携带的遗传信息的总和。狭义的遗传多样性是指种内的遗传多样性,即种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和。物种的遗传多样性越高,遗传变异越丰富,对外界环境变化的适应能力就越强,说明物种生存繁衍的能力越强。

余立辉等通过对 32 份银杏种质材料进行 RAPD 分析,随机选择 8 个单引物和 4 对双引物进行 RAPD 扩增,共得到 85 个位点,其中 81 个位点是多态性的,多态性位点比(Percentage of Polymorphic Bands,PPB)达到 95.3%,说明此银杏样品在 DNA 水平上有很高的遗传多样性^[10]。罗光佐等利用 RAPD 技术对鹅掌楸和北美鹅掌楸进行分析,2 个种都有较高的遗传多样性,但北美鹅掌楸的遗传多样性水平高于鹅掌楸^[11]。宋丛文等利用 RAPD 技术对 5 个天然珙桐种群的遗传多样性进行研究,扩增后共产生 101 个位点,其中多态位点 98 个,多态性位点比(PPB)为 97.0%,说明珙桐群体的遗传多样性较高^[12]。汪小全等运用 RAPD 技术对珍稀植物银杉进行了遗传多样性分析,从 21 个引物中共检测 106 个位点,其中多态位点 34 个,多态性位点比(PPB)仅为 32.1%,说明银杉的遗传变异水平偏低^[13]。茹文明等采用 RAPD 技术对山西南部南方红豆杉 8 个种群进行了遗传多样性检测,利用 21 个随机引物,共检测出 134 个位点,其中多态性位点 123 个,多态性位点比(PPB)为 91.8%,说明南方红豆杉的遗传多样性较高^[14]。

高日等应用 RAPD 分子标记技术对东北刺人参进行遗传多样性分析,16 条随机引物共扩增出 117 个条带,其中多态性条带 51 条,占 43.6%,说明东北刺人参遗传多样性水平较低^[15]。南晓洁等对 6 个柴胡药材干根进行 RAPD 分析,3 条引物能够有效扩增,共扩增出 28 个条带,多态性条带为 20 条,占 71.4%,说明柴胡药材的遗传多样性良好^[16]。黄璐琦等对中药白芷的种质资源进行分析,12 个随机引物共扩增出 40 个条带,其中多态性条带 26 个,占 65.0%,显示白芷的遗

传变异水平较低^[17]。

2.2 RAPD 分子标记技术在植物亲缘关系分析上的应用 通过分析 RAPD 分子标记的结果,可以用物种的遗传相似系数来描述同一物种的不同品种之间的亲缘关系。遗传相似系数越大,二者的亲缘关系越近。林郑和等利用 RAPD 技术对 39 个茶树品种进行分析,发现各茶树品种之间的遗传相似系数在 0.17~0.97,揭示了不同茶树品种之间的亲缘关系^[18]。邱源等通过 RAPD 技术对种植在四川省开江县的 23 个油橄榄品种进行分析,发现各品种的种间遗传相似系数介于 0.67~0.98,平均相似系数为 0.78,其中科新·佛奥和贺吉的相似系数最高,达到 0.98,说明两者的亲缘关系最近^[19]。宋常美等利用 RAPD 技术对来自贵州各地的 35 份樱桃桃材料进行了亲缘性分析,各樱桃品种之间的相似系数在 0.44~0.87^[20]。郑道君等利用 RAPD 技术确定了 8 个木犀科苦丁茶品种的亲缘关系^[21]。

2.3 RAPD 分子标记技术在植物构建基因指纹图谱上的应用 1991 年,Welsh 首次直接利用 RAPD 进行遗传作图,为基因图谱的构建提供了新的方法。RAPD 分子标记中的每个 RAPD 片断可作为分子图谱中的一个位点,大量的 RAPD 位点可以使得根据形态性状构建的遗传图谱变得饱和,加大定位基因的密度,完善物种的基因指纹图谱^[22]。

由于 RAPD 是一种显性标记,符合孟德尔遗传定律,但不能区分杂合子基因和纯合子基因,因此在物种的遗传分析及基因指纹图谱的构建中常常将 RAPD 条带作为单剂量标记^[23]。利用这种方法,于拴仓等构建了由 17 个连锁群,352 个遗传标记组成的大白菜基因指纹图谱,为大白菜的品种鉴定提供理论指导^[24]。张海英等构建了由 9 个连锁群,234 个标记组成的黄瓜基因指纹图谱,有助于了解黄瓜各品种的遗传背景^[25]。刘峰等构建了一张由 22 个连锁群,240 个标记的较高密度的基因指纹图谱,图谱覆盖了整个大豆的基因组,为大豆的遗传育种及品种系统演变研究提供依据^[26]。祁建民等采用 RAPD 技术构建了 10 个黄麻属植物的基因指纹图谱,为黄麻属植物的研究奠定了基础^[27]。王凌晖等采用 RAPD 技术构建了广西野生何首乌的基因指纹图谱,有助于野生何首乌种质资源的分类、品种鉴定及良种选育^[28]。

2.4 RAPD 分子标记技术在植物品种鉴定上的应用 通过随机引物扩增出的条带,可以构建物种的基因指纹图谱,由于每个品种的指纹图谱各不相同,根据二歧分类的原理,即可进行品种鉴定。

智福军等用 RAPD 技术进行分析,鉴定了 5 个枣树品种^[29]。许磊等使用 RAPD 技术对 6 个鹰嘴豆品种进行了鉴定^[30]。潘新法等对江苏省太湖常绿果树技术推广中心的 16 个枇杷品种的基因组 DNA 进行 RAPD 分析,为枇杷的品种鉴定提供了新的方法,同时也为分子标记辅助育种提供了依据^[31]。傅小霞等利用 RAPD 技术对中国热带农业科学院热带牧草研究中心提供的广泛种植的 11 份柱花草进行了品种鉴定^[32]。张秋云等利用 RAPD 技术对新疆天彩科技股份有限公司提供的 45 份彩色棉和白棉进行彩色棉品种鉴定,建

立了彩色棉品种鉴定和彩色棉种子纯度分析的方法,为进一步有效地促进田间常规育种选择提供一种有效手段^[33]。

作为四大文明古国之一,我国的中医药文化源远流长。RAPD 分子标记技术同样可以对中药材进行品种鉴定,为中药材的研究提供新方法。虞泓等通过研究发现 RAPD 分子标记技术可很好地用于红景天物种的分子鉴定和遗传背景研究^[34]。肖小河等运用 RAPD 技术对国产姜黄属药用植物进行分析,从 DNA 分子水平上为姜黄属植物分类与中药鉴定提供了参考依据^[35]。黄芸等运用 RAPD 技术有效地鉴别了射干类药材,为射干类药材的鉴定提供了新方法^[36]。陈京荔等采用 RAPD 技术对 19 个不同品种的地黄进行了鉴定分析,为地黄的育种材料的选择提供了参考^[37]。

3 展望

由于 RAPD 分子标记技术具有操作快速高效,多态性比率高,分析成本较低等特点,目前在植物研究中已获得比较普遍的应用,如:物种的遗传多样性分析、种质资源研究、品种鉴定、构建基因指纹图谱、亲缘关系分析、辅助育种以及基因标记等。

然而,RAPD 分子标记技术由于随机引物的 T_m 值较低,扩增结果易受模板浓度和 Mg^{+} 浓度影响,导致试验的稳定性和重复性较差,限制了该技术的发展。在今后研究中,针对特定的研究物种需要摸索最佳反应条件,力求该技术快捷高效。由于 RAPD 分子标记技术不能鉴别纯合子和杂合子,不能提供完整的基因信息,因而在利用该技术构建基因指纹图谱时,要与其他分子标记技术(如 RFLP 技术、ISSR 技术和 SCAR 技术等)结合起来,构建完整的基因指纹图谱,为该物种的进一步研究奠定基础。

RAPD 分子标记技术在今后的发展将继续运用于植物遗传多样性分析、基因指纹图谱构建、亲缘关系分析以及品种鉴定等方面,尤其是在药用植物和珍稀植物的研究上还有更为广阔的前景。

参考文献

- [1] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, KAVIK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acid Res, 1990, 18: 6531–6535.
- [2] WELSH J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucl Acid Res, 1990, 18: 7213–7218.
- [3] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 403–410.
- [4] 王志林, 赵树进, 吴新荣. 分子标记技术及其发展[J]. 生命的化学, 2001, 21(4): 39–42.
- [5] CASTIGLIONE S, WANG G, DAMIANI G, et al. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones[J]. Theor Appl Genet, 1993, 87(1/2): 54–59.
- [6] SANCHEZ N, GRAU J M, MANZANERA J A, et al. RAPD markers for the identification of *Populus* [J]. Silvae Genetica, 1998, 47(2/3): 67–70.
- [7] BRADSHAW H D, JR REINHARD, STETTTLER R F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping OTLS with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree[J]. Genetics, 1995,

- 139: 963–973.
- [8] WU R, BRADSHAW JR H D, STETTTLER R F. Molecular genetics of growth and development in *Populus* (Salicaceae). V. Mapping quantitative trait loci affecting leaf variation[J]. American Journal of Botany, 1997, 84(2): 143–153.
- [9] 白晶, 张月学, 杨冬鹤, 等. 几种重要的分子标记原理及 RAPD 应用[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2004, 20(5): 89–91.
- [10] 余立辉, 张楚英, 梁红. 32 个银杏品种的 RAPD 遗传多态性及其分类[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2007, 20(2): 1–6.
- [11] 罗光佐, 施季森, 尹俊明, 等. 利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸与鹅掌楸种间遗传多样性[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 9–13.
- [12] 宋从文, 包满珠. 天然珙桐群体的 RAPD 标记遗传多样性研究[J]. 林业科学, 2004, 40(4): 75–79.
- [13] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国科学(C 辑), 1996, 26(5): 436–441.
- [14] 茹文明, 秦永燕, 张桂萍, 等. 濒危植物南方红豆杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物研究, 2008, 28(6): 698–704.
- [15] 高日, 廉美兰, 吴松权, 等. 东北刺人参遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(6): 627–628.
- [16] 南晓洁, 郝媛媛, 赵良贵, 等. 柴胡药材干根 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. 中草药, 2009, 40(3): 447–451.
- [17] 黄璐琦, 王敏, 付桂芳, 等. 中药白芷种质资源的 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(8): 457–459.
- [18] 林郑和, 陈常颂, 陈荣冰. 我国 39 个茶树品种的 RAPD 分析[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 695–701.
- [19] 邱源, 韩华柏, 李俊强, 等. 23 个油橄榄品种的 RAPD 分析[J]. 林业科学, 2008, 44(1): 85–89.
- [20] 宋常美, 文晓鹏. 贵州樱桃种质资源遗传多样性的分子评价[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(8): 11–14.
- [21] 郑道君, 梁远发, 刘国民, 等. 木犀科苦丁茶种质资源的 RAPD 分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 4164–4172.
- [22] 张晗, 沙伟. RAPD 分子标记技术在遗传多样性研究中的应用[J]. 贵州科学, 2003, 21(3): 81–85.
- [23] GATTAPAGLIA D, SEDEROFF R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers[J]. Genetics, 1994, 137: 1121–1137.
- [24] 于拴仓, 王永健, 郑晓鹰. 大白菜分子遗传图谱的构建与分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(2): 190–195.
- [25] 张海英, 葛伟伟, 王永健, 等. 黄瓜分子遗传图谱的构建[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 617–622.
- [26] 刘峰, 庄炳昌, 张劲松, 等. 大豆遗传图谱的构建和分析[J]. 遗传学报, 2000, 20(11): 1018–1026.
- [27] 祁建民, 周东, 吴为人, 等. 应用 RAPD 指纹探讨黄麻属种间遗传多样性及其亲缘关系[J]. 遗传学报, 2003, 30(10): 926–932.
- [28] 王凌晖, 曹福亮, 汪贵斌, 等. 何首乌野生种质资源的 RAPD 指纹图谱构建[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(4): 37–40.
- [29] 智福军, 贾彦丽, 梁海永, 等. 利用 RAPD 分子标记技术进行枣树的品种鉴定[J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 110–114.
- [30] 许磊, 王希东, 张桦, 等. 鹰嘴豆的 RAPD 品种鉴定和聚类分析[J]. 新疆农业大学学报, 2008, 31(1): 51–56.
- [31] 潘新法, 孟祥勋, 曹广力, 等. RAPD 在枇杷品种鉴定中的应用[J]. 果树学报, 2002, 19(2): 136–138.
- [32] 傅小霞, 漆智平, 何华玄. 柱花草 RAPD 品种鉴定方法[J]. 种子, 2005, 24(12): 6–9.
- [33] 张秋云, 郭江勇. RAPD 分子标记技术在彩棉品种鉴定中的应用[J]. 新疆农业科学, 2004, 41(3): 143–146.
- [34] 虞泓, 朱荣勋, 李永谊, 等. 云南常见药用红景天的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2005, 36(1): 96–99.
- [35] 肖小河, 刘峰群, 史成和, 等. 国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中草药, 2000, 31(3): 209–212.
- [36] 黄芸, 秦民坚, 杨光, 等. RAPD 法鉴定射干类中药[J]. 中草药, 2002, 33(10): 935–937.
- [37] 陈京荔, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 地黄不同品种的 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 505–508.