

利用 RAPD 分子标记对 30 份山茶属种质资源进行分类分析

晏嫦好^{1,2}, 黄华林^{1,2}, 李家贤^{1,2}, 何玉媚¹ (1. 广东省农业科学院饮用植物研究所, 广东广州 510640; 2. 广东省茶树种质资源创新利用重点实验室, 广东广州 510640)

摘要 [目的]对 30 份山茶属种质资源进行分类分析。[方法]利用 RAPD 分子标记技术研究 30 份山茶属种质资源的遗传多样性, 并进行分类分析。[结果]17 个 RAPD 引物共扩增出 138 条带, 多态性条带为 129 条, 多态性比率为 93.5%, 材料间的遗传相似系数(GS)变化范围为 0.605~0.855。[结论]利用 NTSYS 软件对 RAPD 扩增结果进行聚类分析, 可将 30 份资源分为 5 大类群, 其分类结果与张宏达分类体系基本一致。

关键词 山茶属种质资源; RAPD; 分类

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)16-04962-02

Classification and Analysis of 30 Camellia Germplasm Resources by Using RAPD Molecular Markers

YAN Chang-yu et al (Drinkable Plants Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640; Guangdong Key Laboratory of Tea Plant Resources Innovation & Utilization, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract [Objective] To classify and analyze 30 Camellia germplasm resources. [Method] Using RAPD molecular markers, the genetic diversity of 30 Camellia germplasm resources was studied and classified. [Result] The result showed that 138 bands were amplified by 17 RAPD primers and 129 polymorphic bands (93.5%). The variance range of genetic similarity (GS) among 30 accessions of Camellia germplasm was 0.605-0.855. [Conclusion] The dendrogram was constructed by using the NTSYS software based on RAPD data indicated that 30 Camellia germplasm were divided into 5 classes, and the classification results were basically the same as the Zhang Hongda classification system.

Key words Camellia germplasm; RAPD; Classification

山茶属(*Genus Camellia*)是山茶科(Theaceae)中最大、系统上较原始的一个属。我国是该属植物的分布中心, 拥有绝大多数的种类, 无论对于亚属(*Subgenus*)、组(*Section*)还是种(*Species*)的划分, 山茶属植物在分类学上都争议较大。Sealy^[1]、张宏达^[2]以及闵天禄^[3]在各自的研究基础上提出了世界著名的 3 大山茶属分类系统, 但是这 3 大分类系统之间存在巨大分歧。因此, 关于山茶属资源的分类研究仍是研究者关注的热点。随着分子生物学的不断发展, 从 DNA 分子水平揭示植物系统演化关系, 使植物系统学研究进入了一个新的时代。笔者根据张宏达分类体系中的分类选择了山茶属中 2 个亚属的 5 个组的资源, 应用 RAPD 分子标记技术对其进行分类分析, 旨在对现存分类学的结果进行初步的验证, 并为解决山茶属分类分歧问题提供新的证据。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验材料均取自广东省油茶种质资源圃(英德), 采集新鲜枝条, 带回实验室取一芽二叶叶片, 用液氮处理后置于 -80 °C 冰箱冷冻保存备用。采集的种质资源的名称及原产地见表 1。

1.2 基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法^[4]从供试材料中提取基因组 DNA, 经质量检测后, 稀释至 200 ng/μl, 于 -20 °C 保存, 用于后续的 RAPD 分析。

1.3 RAPD 扩增 RAPD 引物采用 40 个随机引物, 筛选出扩增多态性条带多, 稳定性强, 背景清晰的引物 17 条(表 2)。RAPD-PCR 反应体系为 25 μl, 包括, 模板 DNA 50 ng, 引物

0.5 μl, 2 × PCR mix (含 *Taq* 酶, dNTP, Mg²⁺ 等) 12.5 μl, 用 ddH₂O 补充至 25 μl。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 50 s, 37 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。RAPD-PCR 产物在 1.6% 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果用自动凝胶成像系统拍照分析。

表 1 样品名称及原产地

样品号	样品名称	原产地	样品号	样品名称	原产地
1	香花糙果茶	广东	16	凤凰油茶 6 号	广东
2	软枝油茶 3 号	广西	17	普 1 号	广西
3	新兴红花油茶	广东	18	凤凰油茶 4 号	广东
4	凤凰油茶 2 号	广东	19	赣 190	江西
5	窄叶短柱茶	广东	20	凤凰油茶 7 号	广东
6	广宁红花油茶	广东	21	福建油茶	福建
7	凤凰油茶 1 号	广东	22	凤凰油茶 5 号	广东
8	安徽油茶 2 号	安徽	23	安徽油茶 3 号	安徽
9	青皮糙果茶	广西	24	岑软 2 号	广西
10	红皮糙果茶	香港	25	岑软 3 号	广西
11	越南油茶	越南	26	浙江油茶	浙江
12	广宁白花油茶	广东	27	湖北油茶	湖北
13	凤凰油茶 3 号	广东	28	云南白花油茶	云南
14	安徽油茶 1 号	安徽	29	张氏红山茶	广东
15	湖南油茶 86 号	湖南	30	金花茶	广西

表 2 RAPD 引物序列

引物	引物序列	引物	引物序列
s3	CATCCCCCTG	s1008	TTCCCGTGCC
s4	GGACTGGAGT	s1010	GGGATGACCA
s28	GTGACGTAGG	s1106	CTCGGGATGT
s35	TTCCGAACCC	s1107	AACCGCGGCA
s55	CATCCGTGCT	s1127	TCGCTGCGGA
s89	CTGACGTCAC	s1130	CTGTGTGCTC
s94	GGATGAGACC	s1464	CCAGCACTTC
s99	GTCAGGGCAA	s1469	TGCCACGAGG
-	-	s1510	ACTGCCCGAC

基金项目 广东省科技计划项目(2011B060400026); 广东省农业科学院院长基金(201439)。

作者简介 晏嫦好(1981-), 女, 广东广州人, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 山茶属种质资源选育及分子生物学。

收稿日期 2014-05-08

1.4 数据分析 将电泳图谱清晰且可重复的 DNA 条带记为 1,同一位置上的弱带且不重复或未出现条带的记为 0,形成“1,0”原始数据矩阵,利用 NTSYSpc(2.10)数据分析软件进行数据分析,采用 UPGMA 方法构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 30 份山茶属种质资源的多态性分析 使用 17 个随机引物对 30 个供试材料进行扩增,共扩增出 138 个位点,其中多态性条带为 129 条,占总条带数的 93.5%,每个引物平均获得 7.6 条多态性条带(图 1)。

2.2 30 份山茶属种质资源的聚类结果分析 利用 NTSYSpc(2.10)数据分析软件,用 UPGMA 法建立了 30 份山茶属种质

资源间的遗传关系 RAPD 聚类分析图(图 2)。RAPD 聚类分析结果表明,30 份种质资源间的相似系数在 0.605~0.855,当相似系数为 0.665 时可将 30 份种质资源划分为 5 大类群。第 1 类只有 1 份资源——金花茶(样品号:30)。第 2 类也只有 1 份资源——张氏红山茶(样品号:29)。第 3 类包括包含 2 份资源:新兴红花油茶(样品号:3)和广宁红花油茶(样品号:6)。第 4 类包含 3 份资源:香花糙果茶(样品号:1)、青皮糙果茶(样品号:9)和红皮糙果茶(样品号:10)。第 5 类包括 23 份资源,可分为 2 个亚类:第 1 亚类包括软枝油茶 3#(样品号:2)等 9 份资源,第 2 亚类包括广宁白花油茶(样品号:12)等 14 份资源。



注: M 为 DL2000;泳道 2~31 为 1~30 号样品

图 1 RAPD 随机引物 S1469 电泳图谱

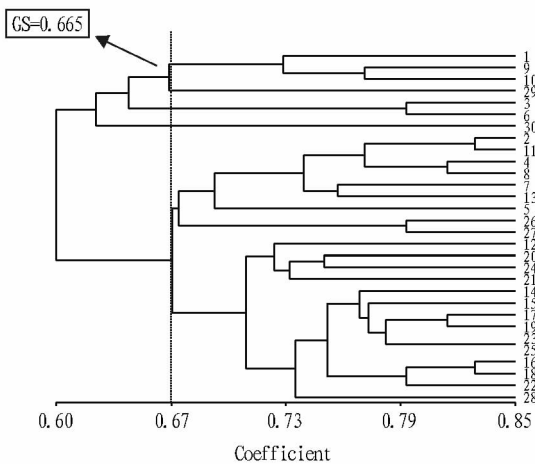


图 2 30 份样品的 RAPD 聚类分析结果

3 结论与讨论

山茶属植物是异花授粉植物,遗传组成上的高度杂合和表现形上的多态性给植物分类带来了困难,这也是山茶属植物分类至今未能定论的主要原因。DNA 分子标记是 DNA 序列信息的直接或间接反应,为植物系统学的研究提供了大量的信息数据,DNA 分子标记的分类结果能够对现存分类学结果进行验证,并可能提出新的见解,做出合理的修订。

通过对比发现,试验中 RAPD 分子标记与张宏达分类体系中对不同组的划分基本一致,但稍有区别。根据张红达分类体系可知,30 份供试资源分属于 2 个亚属 5 个组,其中 22 份资源属于山茶亚属油茶组,窄叶短柱茶属于山茶亚属短柱

茶组,金花茶属于茶亚属金花茶组,张氏红山茶、广宁红花油茶和新兴红花油茶属于山茶亚属红山茶组,青皮糙果茶、红皮糙果茶和香花糙果茶属于山茶亚属糙果茶组。从 RAPD 聚类分析结果看,22 份油茶组资源和窄叶短柱茶聚为一类,说明这 2 个组的亲缘关系较近,支持了闵天禄对油茶组和短柱茶组合并的观点^[5]。红山茶组的 3 份资源,广宁红花油茶和新兴红花油茶聚为一类,而张氏红山茶未与这 2 份资源聚在一起,分析可能的原因为:在张宏达分类体系中是根据其花色等生物学性状进行分类的,但张氏红山茶具有四季开花特性,属多季开花植物,其生理特性与其他 2 份资源有差异,因此在 DNA 水平上张氏红山茶与广宁红花油茶和新兴红花油茶可能存在较大差异;糙果茶组的 3 份资源聚为一类,金花茶单独为一类,这 2 组的划分与张宏达分类体系中的分类一致。据邓白罗^[6]等研究表明,RAPD 分析结果基本上支持张宏达的山茶属红山茶组植物分类方法,说明形态上的相似性与 DNA 的相似性有很强的相关性,试验结果也表明,RAPD 的分类结果与张宏达分类体系较为一致,但也存在部分差异。因此,利用分子标记方法,并与传统分类方法进行相互验证,将使山茶属植物的分类系统趋于更加科学合理。

参考文献

- [1] SEALY J R. A revision of the genus *Camellia* [M]. London: the Royal Horticulture Society, 1958.
- [2] 张宏达,任善湘. 中国植物志,第 49 卷,第 3 分册[M]. 北京:科学出版社,1998.

24 h, 做好标记, 编号。

1.2.6 复筛摇瓶培养。用移液枪从 LB 培养基中抽取 5 ml 菌液至一灭菌的盛 100 ml 发酵培养基的 250 ml 三角锥形瓶中, 32 °C 摇床培养 3 d。

1.2.7 生物表面活性剂排油活性的测定。取一定量的发酵培养液, 1 000 r/min 离心 10 min, 得上清液, 取直径为 20 cm 的培养皿, 加入 90 ml 蒸馏水, 并且加入 0.5 g 苏丹 III 染色, 然后加入 1 滴柴油, 待柴油均匀分布于水面上后, 在柴油膜的中央慢慢加入 80 μ l 上清液, 观察排油圈大小。

1.2.8 生物表面活性剂乳化性能的测定。取一定量的发酵培养液, 1 000 r/min 离心 10 min, 得上清液, 取 3 ml 上清液与等体积的柴油, 加到乳化管中, 搅拌, 混合均匀, 制备悬浊液, 观察乳化相和油相的体积变化以及乳化性能的稳定性。

2 结果与分析

2.1 产表面活性剂排油性检测 试验结果见图 1。经测量, 玻璃平皿的直径为 20 cm, 排油圈的直径约为 4 cm。

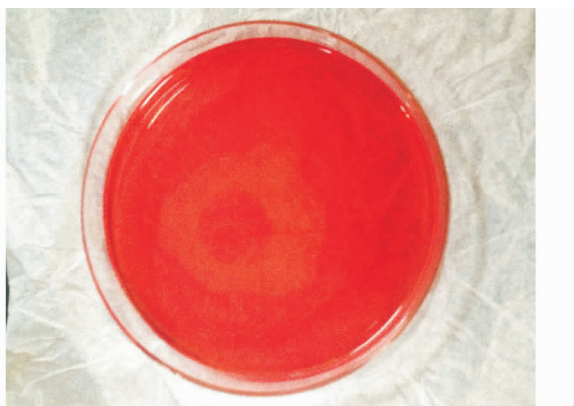


图 1 产表面活性剂排油性检测

2.2 产表面活性剂乳化性能的检验

2.2.1 初始相。由图 2 可知, 乳化层较厚。

2.2.2 变化相。由图 3 可知, 形成乳化层 1 d 后, 乳化层变薄, 说明该产表面活性剂菌的乳化性能不稳定。

3 讨论

以废弃的钻井液为原材料, 利用生物表面活性剂的性质



图 2 产表面活性剂乳化性能的检测(初始相)

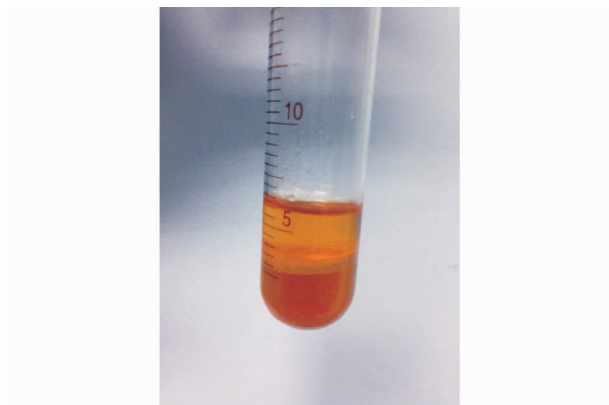


图 3 产表面活性剂乳化性能的检验(变化相)

进行产表面活性剂菌株的培养和筛选, 并且将筛选出来的产表面活性剂菌进行排油活性和乳化性能的测定。经测定, 该试验筛选出来的产表面活性剂菌排油活性较好, 但乳化性能不稳定。

参考文献

- [1] 叶建阳, 叶向德, 郭军权. 石油工程环境保护[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2010.
- [2] 吕志萍, 程龙飞. 石油污染土壤中石油含量对玉米的影响[J]. 油气田环境保护, 2001, 11(1): 36-37.
- [3] 马志华. 石油对海洋环境造成的污染究竟有多大[J]. 森林与人类, 2002(12): 8-9.

(上接第 4963 页)

- [3] 闵天禄. 世界山茶属的研究[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2000.
- [4] 黄建安, 黄意欢, 罗军武, 等. 茶树基因组 DNA 的高效提取方法[J]. 湖南农业大学学报, 2003, 29(5): 402-407.

- [5] 闵天禄. 山茶属山茶组植物的分类、分化和分布[J]. 云南植物研究, 1998, 20(2): 127-148.
- [6] 邓白罗, 谭晓风, 漆龙霖, 等. 山茶属红茶组植物的 RAPD 分析及分类研究[J]. 林业科学, 2006, 42(5): 36-40.