

## 谭清苏铁性别连锁的 RAPD 和 SCAR 分子标记

# RAPD and SCAR Molecular Markers Linked to the Sexuality of Cycads (*Cycas tanqingii* D. Y. Wang)

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

JING Jian-Zhou<sup>1,3\*</sup>, JIN Hong<sup>2</sup>, LI Dong-Liang<sup>1</sup>, CHEN Xiao-Ke<sup>3</sup> and ZHANG Yong<sup>1</sup>

1 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 郑州 450002

2 深圳市仙湖植物园科技部, 深圳 518004

3 河南省生物工程技术研究中心, 郑州 450002

1 College of Food and Biology Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

2 Shenzhen FairyLake Botanical Garden, Shenzhen 518004, China

3 Henan Bioengineering Technology Research Center, Zhengzhou 450002, China

**摘要** 利用 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 分子标记技术, 寻找谭清苏铁 (*Cycas tanqingii*) 中与性别相关的分子标记, 筛选了 160 个 10bp 的随机引物, 产生了 2500 多个 RAPD 条带。只有引物 S0465 (CCCCGGTAAC) 产生了一条大约 500bp 的雌性特异 RAPD 标记, 该分子标记出现在所有的供试雌性植株中, 而所有的供试雄性植株都不具有该标记。对该特异片段进行了克隆和序列测定, 并根据序列分析结果将 RAPD 标记转化为重复性和特异性更好的特异特征序列扩增区域 (SCAR) 分子标记, 并命名为 STQC-S465-483。分子标记的建立可用于谭清苏铁幼苗性别的早期鉴定, 为谭清苏铁就地保护和迁地保护提供技术支持。

**关键词** 谭清苏铁, 性别, RAPD, SCAR, 分子标记

中图分类号 Q945.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1097-05

**Abstract** The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to amplify DNA fragment, aiming at finding markers linked to the sex trait in *Cycas tanqingii* D. Y. Wang. A total number of 160 random primers were screened in the RAPD-PCR and more than 2500 RAPD fragments were generated from the male or the female plants. One fragment of about 500bp was amplified steadily and repeatedly by the S<sub>0465</sub> (CCCCGGTAAC) primer only from female plants but not male plants. The RAPD marker was then converted into female-linked dominant SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) marker named STQC-S465-483. The development of this sex-linked SCAR marker provides a possibility of identifying the sex of *Cycas tanqingii* before sexual maturation, which is very important to *in situ* or *ex situ* conservation.

**Key words** *Cycas tanqingii* D. Y. Wang, sexuality, RAPD, SCAR, molecular markers

苏铁类植物是地球上现存的最原始种子植物之一, 有“植物界大熊猫”及“活化石”的美称。谭清苏

铁 (*Cycas tanqingii* D. Y. Wang) 是 1996 年发表的一个新种, 分布于我国云南南部、越南<sup>[1]</sup>等地区。谭清

Received: March 6, 2007; Accepted: April 10, 2007.

This work was supported by the grants from the Research Program of Shenzhen Urban Management Bureau and the Program for Young Backbone Teachers of Henan (No. gaojiao-05-461-110).

\* Corresponding author. Tel: +86-371-63557375; Fax: +86-371-63556627; E-mail: jzjing@zzuli.edu.cn

深圳市城市管理局资助项目和河南省青年骨干教师资助项目(高教-06-461-110)资助。生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

苏铁的生存环境呈现斑块状分布,种群很脆弱,抗外来干扰能力差,如果得不到有效保护,谭清苏铁就有灭绝的危险<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,迁地保护和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,在性成熟之前或性别未知时对谭清苏铁进行性别鉴定对于就地保护和迁地保护中雌雄植株的定向繁育,增加种群数量都具有重要意义。

对于雌雄异株植物性别的早期鉴定问题,已有很多研究人员从不同侧面进行了探索研究,归纳起来可分为8种<sup>[3]</sup>:形态鉴别法、生理生化鉴别法、化学物质分析鉴别法、同工酶图谱鉴别法、染色体核型鉴别法、化学药剂处理鉴别法、核酸技术鉴别法、蛋白质技术鉴别法等。然而,这些性别鉴定的方法在性别的早期鉴定方面都存在着一一些问题,如可靠性问题、稳定性问题、准确性问题等。随着分子生物学的发展,近年来DNA分子标记技术被应用于雌雄异株植物的性别鉴定中,提高了植物性别鉴定的可靠性和准确性<sup>[4]</sup>。

目前,分子标记技术在许多雌雄异株植物的性别研究上已有应用,如大麻(*Cannabis sativa*)<sup>[5]</sup>、银杏(*Ginkgo biloba*)<sup>[6]</sup>、罗汉松(*Podocarpus macrophyllus* (Thunb.) D. Don.)<sup>[7]</sup>、阿月浑子(*Pistachis*)<sup>[8]</sup>等,涉及到随机扩增多态性DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)、特征序列扩增区域(Sequence Characterized Amplified Regions, SCAR)、简单序列长度多态性(Simple Sequence Length Polymorphism, SLP)、微卫星分子标记(Simple Sequence Repeats, SSR)和简单序列重复间区(Inter Simple Sequence Repeat, ISSR)等分子标记技术<sup>[9]</sup>。

本实验利用RAPD和SCAR分子标记技术筛选与谭清苏铁性别高度相关的标记,为谭清苏铁的早期性别鉴定提供技术支持,实验中的DNA序列分析可用于苏铁类植物的种系发生研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

已知性别的谭清苏铁(*C. tanqingii*)雌、雄植株各10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 菌株与质粒

大肠杆菌 *E. coli* TG1 由河南省生物工程技术研究中心基因工程实验室提供;质粒载体 pUCm<sup>R</sup>-T Easy Vector Systems 购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

### 1.3 主要生化试剂

*Taq* DNA聚合酶购自北京天为时代科技有限公司。T4连接酶、RNase A、dNTP、IPTG、X-Gal、溶菌酶、琼脂糖等购自上海生工生物工程技术服务有限公司。各种限制性内切酶、DNA marker、Tryptone、Yeast Extract、氨苄青霉素(Amp)等购自 Promega 公司。DNA Gel Extraction Kit 试剂盒购自 AXYGEN 公司。

### 1.4 随机引物

此研究共用到160个随机引物,所用引物为上海生工生物工程技术服务有限公司产品。

### 1.5 谭清苏铁 DNA 提取(CTAB法)

分别取10株已知性别的谭清苏铁雌、雄植株的半年生羽叶,采用优化后的CTAB法<sup>[10]</sup>提取雌、雄植株全基因组DNA,并检测其质量、纯度和浓度。

### 1.6 RAPD-PCR 扩增

在无菌的0.5mL PCR薄壁管中分别加入下列组分:1×*Taq* DNA聚合酶缓冲液,2.5mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.25mmol/L dNTP, 0.25μmol/L RAPD引物, 1.5u *Taq* DNA聚合酶, 80ng 模板DNA和无菌双蒸水补足到20μL。另加入1滴无菌石蜡油,稍加离心后,在PCR基因扩增仪(Thermo公司)上扩增。RAPD-PCR扩增程序为:94℃预变性5min,再进行94℃变性45s、40℃退火45s和72℃延伸45s的30个循环扩增,最后72℃延伸5min。1.5%琼脂糖凝胶,120V电压在1×TAE缓冲液中电泳2.5h,1×GelRed(Biotium)染色紫外灯下检测,凝胶成像系统(ULTRA. LUM. MEGA10TM Gel-PRO ANALYZER)照相记录结果。

### 1.7 特异 RAPD 片段的回收、亚克隆与测序分析

RAPD分子标记特异片段的回收参照AXYGENBIO-DNA Gel Extraction Kit说明书;连接反应参照pUCm-T说明书;感受态细胞制备、连接产物的转化、阳性克隆的筛选鉴定、质粒提取纯化参照分子克隆(第三版)<sup>[11]</sup>;阳性样品质粒送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

### 1.8 SCAR-PCR 扩增

用GENERUNR分析测序结果,得出目的片段的DNA序列,根据序列分析结果,用Primer Premier 5软件设计19个核酮酸的SCAR引物。

以不同性别谭清苏铁全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,鉴定性别的 SCAR 标记。在无菌的 0.5mL PCR 薄壁管中分别加入下列组分:  $1 \times$  Taq DNA 聚合酶缓冲液,  $1.5\text{mmol/L}$   $\text{Mg}^{2+}$ ,  $0.25\text{mmol/L}$  dNTP,  $0.15\mu\text{mol/L}$  SCAR 引物 1 和引物 2,  $1.0\text{u}$  Taq DNA 聚合酶,  $80\text{ng}$  模板 DNA 和无菌双蒸水补足到  $20\mu\text{L}$ 。另加入 1 滴无菌石蜡油 稍加离心后,在 PCR 基因扩增仪上扩增。SCAR-PCR 扩增程序为  $94^\circ\text{C}$  预变性 5min,再进行  $94^\circ\text{C}$  变性 45s、 $55^\circ\text{C}$  退火 45s 和  $72^\circ\text{C}$  延伸 45s 的 30 个循环扩增,最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 5min。1.5% 琼脂糖凝胶,  $120\text{V}$  电压在  $1 \times$  TAE 缓冲液中电泳 30min,  $1 \times$  GelRed 染色紫外灯下检测,凝胶成像系统(ULTRA. LUM. MEGA10TM Gel-PRO ANALYZER)照相记录结果。

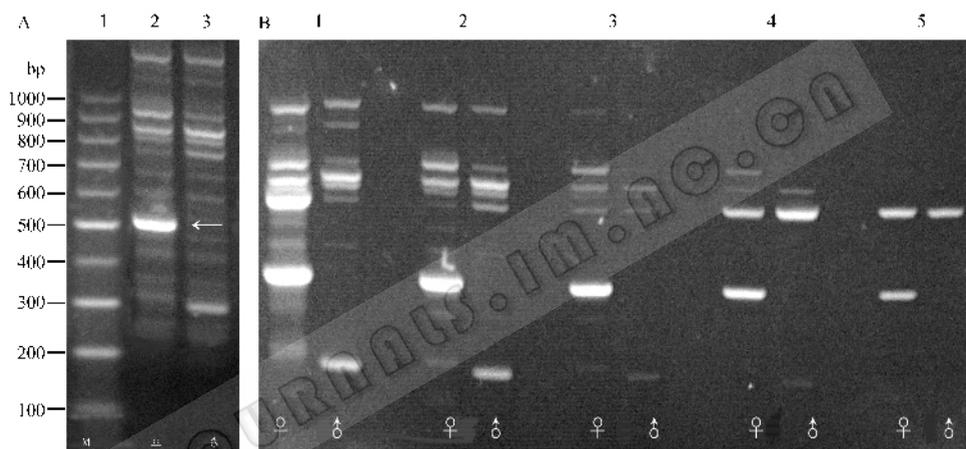


图 1 谭清苏铁雌性相关 RAPD 标记 RTQC-S465-500

Fig. 1 RTQC-S465-500 the sex-linked markers for the female of *C. tanqingii* with primer  $S_{0465}$

A: the size of the sex-special fragment RTQC-S465-500. 1: marker; 2: female individual (♀); 3: male individual (♂). B: the concentration gradient experimentation of template DNA. 1: 200ng; 2: 100ng; 3: 40ng; 4: 20ng; 5: 4ng.

## 2.2 特异片段的测序结果

特异片段 RTQC-S465-500 回收分别与 T 载体连接进行亚克隆,将筛选出的阳性质粒测序。引物

STQC-S465-500:

5' CCCCGGTAACACTTAGTTGCAGTTGTAGACCACCTGATAGCACGTAGTTGTAGTTGGTTACACTTGG  
TTGCAGTTGCAGTTGCACATTTTTTGCATTTTTTAAGCCTCTTAAGGCATTTTTCTACTAAATGAAGATCA  
TAAACATGAAAAACAAGTATTTAAGAGTATTATGAACCTAAAAATCCGAAAATGGATCATAGTCAGATA  
TAATCTTTCCATTAGGAGTGTATTATCTAGTTAGCTAACCAITTTTTAGGATGGACTTATTTATTAATCTAI  
ACGTGGATATATTTATTTAAATTTGAATTTATAAAGACTCAAGTTTTAGTCCATTGGTGTGATTCTTATCTG  
TTTGGTATTTGGTTGTCAAATTTCTTTAGCTTTTCTCCTATCAAGATTTGTAATGTTTATTTAATATCAITTTAA  
GCCTTCCTATAATTTCTTTTATTTAGACTTTAGACTTTGTTGGTTACCGGGG3'

3' TGAAACAACCAATGGCCCC5'

图 2 谭清苏铁雌性特异片段的全序列

Fig. 2 The complete sequence of the female-specific DNA fragment of *C. tanqing*

The part included in brackets is the partial, complementary sequence of the 3' end; the underlined nucleotides show the sequences of the primer  $S_{0465}$ ; the parts in which the letters are bold show the two primers of SCAR marker.

## 2.3 SCAR 分子标记分析

设计 SCAR 分子标记的 PCR 特异引物对序列如

## 2 结果

### 2.1 RAPD 分子标记分析

本实验用到的 160 个随机引物,除极个别引物没有扩增外,多数都能扩增出 10~25 条带,其大小在 100bp~2000bp 之间,共产生了 2500 多个 RAPD 条带。筛选出引物  $S_{0465}$ (CCCCGGTAAC)能够在所有供试的 10 个谭清苏铁雌株上扩增出特异片段 RTQC-S465-500,而在所有供试的 10 个雄株上不能够扩增出来。

在模板浓度梯度 PCR 扩增实验中,验证了该标记的特异性和稳定性并不随着模板 DNA 量的变化而发生变化,见图 1。

$S_{0465}$  扩增的特异片段为 483bp。其序列如图 2 (GenBank record EF394325)。

下:

SCAR-PCR 上游引物:5' CCCCCGGTAACACTTAG

TTG3' ;

SCAR-PCR 下游引物 :5' CCCC GGTAACCAACAA AGT3'.

为了获得稳定性特异性更好的分子标记,根据特异片段的序列分析结果,设计了 SCAR 分子标记引物。对所有供试的潭清苏铁雌雄植株进行 SCAR-PCR 扩增,电泳结果见图 3。结果表明:1)特异 RAPD 标记 RTQC-S465-500 成功转化为特异 SCAR 标记 STQC-S465-483;2)STQC-S465-483 标记在所有供试的雌株基因组 DNA 上有 SCAR-PCR 扩增,而在所有供试的雄株上没有扩增;3)在模板浓度梯度 PCR 扩增实验中,验证了该标记的特异性和稳定性没有随着模板 DNA 量的变化而发生变化;4)在退火温度的梯度 PCR 扩增实验中,验证了该标记的特异性和稳定性没有退火温度的变化而发生变化。

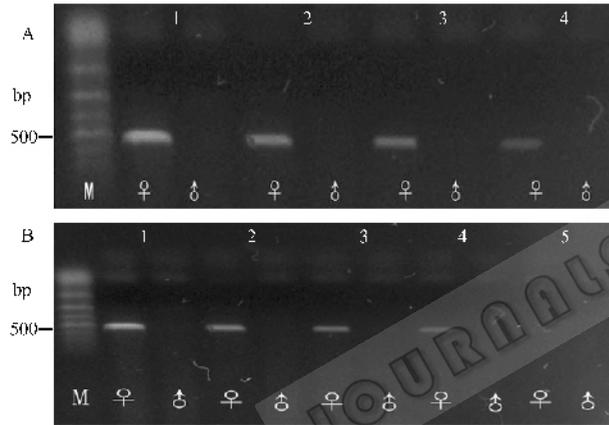


图 3 潭清苏铁雌株性别 SCAR 分子标记

Fig. 3 The SCAR molecular markers of female *C. tanqingii*  
A: the concentration gradient experimentation of template DNA. 1: 200ng; 2: 100ng; 3: 40ng; 4: 20ng. B: the anneal temperature experimentation. 1: 45°C; 2: 50°C; 3: 55°C; 4: 65°C; 5: 70°C.

### 3 分析与讨论

由于 RAPD-PCR 分子标记引物一般为 10 个碱基的随机排列,使得 RAPD 分子标记的信息量大,被广泛使用,然而其扩增系统的稳定性不仅受到扩增体系各组分的相对含量的影响,其扩增程序的影响也非常大<sup>[4]</sup>。因此,RAPD-PCR 扩增时除了优化反应体系的各组分外,还要尽量缩短退火时间、提高退火温度、减少循环数。有条件的还可以进行梯度 PCR 扩增,即:先采用较高的退火温度,然后逐渐降低退后温度,其退后温度可达到 60°C 之高。本实验经过摸索,采用较低的反应体系浓度,40°C 退火 45s,30 个循环的扩增,并使用检测灵敏度较高的染料 GelRed 染色,结果筛选出了一个引物 S<sub>465</sub> 能够特异

性地扩增与潭清苏铁雌株高度相关的标记 RTQC-S465-500。在模板的梯度扩增实验中也验证了特异片段的稳定性。

从现有文献来看,利用 RAPD 分子标记技术得到的 DNA 标记序列都是非编码序列,且多含有分散存在的重复序列<sup>[4]</sup>。片段序列分析结果表明,本实验得到潭清苏铁雌株性别 DNA 特异标记其序列中也是非编码序列,且多含 A 或 T 的重复序列,STQC-S465-483 中 A 和 T 占总碱基数目的 69.56%。STQC-S465-483 片段正义与反义链序列中共含 16 个 ATG 起始阅读框,平均 60.4 个碱基含一个 ATG 起始阅读框。

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 ~ 2500bp 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该标记是与性别决定基因紧密连锁的<sup>[11]</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>[12]</sup>。

由于 RAPD 分子标记在显示特异标记的同时还显示了其他信息,其专一性不强,因而有必要将其转化为专一性、稳定性和重复性更好的 SCAR 分子标记。本研究根据特异片段的序列分析结果,成功地将 RTQC-S465-500 标记转化为 SCAR 标记 STQC-S465-483,在模板浓度的梯度实验中其稳定性得以验证。该标记可用于潭清苏铁幼苗的性别早期鉴定,为苏铁就地保护和迁地保护提供技术支持。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Wang FX (王发祥), Liang HX (梁惠波), Chen TQ (陈谭清), et al. *Cycads in China*. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press (广东科技出版社), 1996. pp. 134 - 137.
- [2] Tian B (田波), Gong X (龚洵), Zhang QI (张启泰), et al. Study on the habitat, population and dynamics of *Cycas tanqingii*. *Acta Bot Borreal Occid Sin* (西北植物学报), 2005, 22(1): 133 - 137.
- [3] Zhao LS (赵林森), Xu XZ (徐锡增), Cui PY (崔培毅), et al. Studies on plant sex identification of dioecious tree species. *Journal of Nanjing Forestry University* (南京林业大学学报:自然科学版), 1998, 22(1): 71 - 74.
- [4] Dong LN (董莉娜), Su X (苏雪), Sun K (孙坤), et al. Applications of DNA molecular markers on sex identification of *Cycas* species. *Acta Bot Borreal Occid Sin* (西北植物学报), 2006, 23(1): 63 - 68. cn

- [ 5 ] Mandolino G , Carboni A , Forapani S , *et al.* Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp ( *Cannabis sativa* L. ). *Theor Appl Gen* , 1999 , **98** ( 1 ) : 86 - 89 .
- [ 6 ] Jiang I( 姜凌 ) , You RI( 尤瑞麟 ) , Li MX( 李懋学 ) , *et al.* Identification of a sex associated RAPD marker in *Ginkgo biloba* . *Acta Bot Sin*( 植物学报 ) , 2003 , **45** ( 6 ) : 742 - 747 .
- [ 7 ] Cai L( 蔡亮 ) , Tian XC( 田晓晨 ) , Li M( 李明 ) , *et al.* Application of RAPD in discrimination of podocarpus macrop hyllus's sex . *J Fudan Univ* ( *Nat Sci* )( 复旦学报 , 自然科学版 ) , 2002 , **41** ( 6 ) : 635 - 640 .
- [ 8 ] Tan DM( 谭冬梅 ) , Luo SF( 罗淑萍 ) , Li J( 李疆 ) , *et al.* Sex identification of pistachio by using RAPD analysis . *J Fruit Sci*( 果树学报 ) , 2003 , **20** ( 2 ) : 124 - 126 .
- [ 9 ] Zhuang I( 庄丽 ) , Peng ZM( 彭子模 ) , Mu PY( 穆培源 ) , *et al.* Development and application of DNA molecular markers in plants . *Journal of Xinjiang Normal University* ( *Natural Sciences Edition* ) ( 新疆师范大学学报 , 自然科学版 ) , 2003 , **22** ( 2 ) : 56 - 59 .
- [ 10 ] Li DL( 李东亮 ) , Jin H( 金红 ) , Jing JZ( 景建洲 ) , *et al.* Research of optimizing CTAB method in DNA extraction of cycas using orthogonal experiment design . *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 .
- [ 11 ] Sambrook J , Russell WD . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* , 3rd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001 , pp.2 - 137 .
- [ 12 ] Charles Ainsworth . Boys and girls come out to play : the molecular biology of dioecious plants . *Annals Bot* 2000 , **86** : 211 - 221 .