

文章编号: 1674-7054(2012)03-0208-08

与苦丁茶冬青雄性性状连锁的 RAPD 标记

罗轶奇, 李娟玲, 刘国民, 成善汉, 潘学峰, 翟丽艳

(海南大学 苦丁茶研究所 海南 海口 570228)

摘 要: 通过正交试验设计对影响苦丁茶冬青 RAPD-PCR 反应的 5 种因素 4 水平进行优化试验, 最终确定苦丁茶冬青 RAPD-PCR 的最佳反应体系为: 在 25 μL 反应体系中, DNA 模板 20 ng, Mg^{2+} 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$, 引物浓度为 0.3 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$, Taq 聚合酶浓度为 2.0 U, dNTPs 浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$ 。最佳的 RAPD-PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 120 s, 进行 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。然后通过 RAPD 技术筛选了 91 条随机引物, 共计有 24 条引物能在雌/雄 DNA/样品池间显示多态性, 其中引物 S164 和 S191 分别扩增得到 2 个雄性特异标记 S164-900 和 S191-800。经多次重复实验, RAPD 标记均能在雄性个体中稳定出现, 故此标记可应用于苦丁茶冬青性别的早期鉴定。

关键词: 苦丁茶冬青; RAPD 标记; 优化; 性别鉴定

中图分类号: Q 756

文献标志码: A

“苦丁茶”并非指一种特定的植物, 而是我国民间一大类传统代茶饮料的统称。苦丁茶主要有两大类, 一是以苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha*) 为代表的冬青科苦丁茶; 另一类则是以粗壮女贞(*Ligustrum robustum*) 为代表的木犀科苦丁茶。苦丁茶冬青除含有多种维生素、多种氨基酸以及矿质元素等营养成分, 还富含苦丁茶苷元、熊果酸、蛇麻脂醇、 α -香树脂醇等多种功能成分, 能显著降低血液总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白(LDL) 的含量, 改善血液粘稠度, 对高血压、动脉血管硬化症、肥胖症、冠心病、便秘、咽喉肿瘤、慢性咽喉炎等多种疾病有显著疗效。除此之外, 苦丁茶冬青为多年生常绿阔叶树, 树体、花序、果实, 均具有良好的观赏价值, 是一种珍贵的园林绿化树种, 常作为人道树种植于公园或庭院, 亦作为中心树种植于回车道或花坛^[1-4]。苦丁茶冬青是雌雄异株的多年生乔木, 性生理成熟期长, 在其童期无法通过外部形态区分其性别。采用传统的常规杂交育种面临许多困难, 耗时, 工作量大, 手续繁杂。因此, 对苦丁茶冬青性别进行早期鉴定已成为苦丁茶冬青育种中急需解决的问题。分子标记技术可以为苦丁茶冬青的育种工作提供强有力的辅助作用, 可以大大加速育种的进程。利用与性别决定基因紧密连锁的分子标记, 完全有可能在短时间内对苦丁茶冬青的性别进行早期鉴定。RAPD 分子标记具有技术简单、操作方便和 DNA 样品用量少等优点, 因此, 得到广泛应用。国内外有不少学者已利用 RAPD 分别找到与银杏(*Ginkgo biloba* L.)、菠菜(*Spinacia oleracea* L.)、阿月浑子(*Pistacia vera* L.)、毛白杨(*Populus tomentosa* Carrière) 等植物性别相关的 RAPD 标记^[5-9]。但由于 RAPD 分子标记技术是建立在 PCR 反应基础之上的分子标记技术, 其反应体系不同会产生不同的结果, 为了确保 RAPD 分析结果的可靠性和可重复性, 进行 RAPD-PCR 反应体系优化研究是十分必要的。本研究运用正交实验方法, 对影响 RAPD 结果的主要影响因子(dNTPs 浓度、Taq 酶用量、模板 DNA 浓度、引物浓度和 Mg^{2+} 浓度用量) 和热循环参数(退火温度、循环次数等) 进行了优化, 建立了一套适用于苦丁茶冬青种质材料 RAPD 分析的优化反应体系, 并运用该优化的反应体系, 利用 S164 和 S191 两条 RAPD 引物分别扩增得到了 2 个与雄性性状连锁的 RAPD 特异标记 S164-900 和 S191-800。

收稿日期: 2012-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860048); 海南省自然科学基金项目(311035)

作者简介: 罗轶奇(1987-), 男, 湖南祁东人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 刘国民(1955-), 男, 湖南祁东人, 教授, 博士, 博士生导师. E-mail: 13005082258@163.com

1 材料与方法

1.1 供试材料 苦丁茶冬青嫩叶,取自海南大学苦丁茶种质资源圃。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 试剂 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、Tris(三氯氨基甲烷)、EDTA(乙二胺四乙酸)购自广州威佳科技有限公司; RAPD 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; DNA Marker(λ DNA/*Hind* III)、100 bp plus DNA ladder、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司; *Taq* DNA polymerase 和 4 × dNTP mix 购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.2.2 仪器 离心机、电热恒温水浴锅、移液枪、紫外分光光度计、*icycler*TM Thermal Cycle 型 PCR 仪、水平电泳仪、UVP 凝胶成像系统等。

1.3 实验方法

1.3.1 苦丁茶冬青 DNA 的提取及 DNA 池的构建 采用李娟玲等^[10]改良的 CTAB 法提取苦丁茶冬青基因组 DNA,用紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,采用 $w = 0.8\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。将样品稀释成 $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,分别等量混合 10 份雌、雄性种质材料的 DNA,分别构成雌、雄性 DNA 样品池。

1.3.2 利用正交设计对苦丁茶冬青 RAPD 体系进行优化 参考张凤琴等^[11]的方法选取影响苦丁茶冬青 RAPD-PCR 反应体系的 5 个因素(DNA 模板、 Mg^{2+} 、引物、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs),比较其适宜的浓度范围(见表 1),选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表在 4 个水平上进行实验(见表 2) 2 次重复。RAPD-PCR 扩增程序参考张凤琴等^[11]的方法设定。

表 1 苦丁茶冬青 RAPD-PCR 反应体系正交组合试验设计的因素与水平

水平	因素				
	DNA/ng	$\text{Mg}^{2+}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	引物/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	dNTPs/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U
1	20	1.0	0.1	150	1.0
2	40	1.5	0.2	200	1.5
3	60	2.0	0.3	300	2.0
4	80	2.5	0.4	400	2.5

表 2 RAPD-PCR 体系优化正交试验设计 $L_{16}(4^5)$

编号	DNA/ng	$\text{Mg}^{2+}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	引物/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	dNTPs/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U
1	20	1.0	0.1	150	1.0
2	20	1.5	0.2	200	1.5
3	20	2.0	0.3	300	2.0
4	20	2.5	0.4	400	2.5
5	40	1.0	0.2	300	2.5
6	40	1.5	0.1	400	2.0
7	40	2.0	0.4	150	1.5
8	40	2.5	0.3	200	1.0
9	60	1.0	0.3	400	1.5
10	60	1.5	0.4	300	1.0
11	60	2.0	0.1	150	2.5
12	60	2.5	0.2	200	2.0
13	80	1.0	0.4	200	2.0
14	80	1.5	0.3	150	2.5
15	80	2.0	0.2	400	1.0
16	80	2.5	0.1	300	1.5

1.3.3 退火温度及循环次数的确定 根据引物的理论退火温度,设置 5 个温度梯度对其退火温度进行优化。参考张凤琴等^[11]的方法,设置 5 个循环次数对苦丁茶冬青的 RAPD-PCR 反应的循环次数进行优化。

1.3.4 在雌、雄 DNA 样品池间筛选出有差异的引物 采用经正交优化后的苦丁茶冬青 RAPD 实验条件和扩增程序对 91 条 RAPD 引物进行筛选,筛选出背景干净、条带清晰明亮、无拖尾的引物和剔除无法对苦丁茶冬青扩增以及扩增效果差的引物。分别以苦丁茶冬青雌、雄 DNA 样品池的 DNA 混样作为模板,对有效引物再做进一步筛选,选出能在雌、雄 DNA 样品池中扩增出有差异性片段的引物。

1.3.5 用单样验证雌、雄 DNA 样品池间有差异的引物 分别用组成雌、雄 DNA 样品池的 DNA 单样(包括雌、雄种质材料的 DNA 单样各 10 份)对雌、雄 DNA 样品池间有差异的引物进行验证,找出与苦丁茶冬青性别相关的 RAPD 标记。

2 结果与分析

2.1 苦丁茶冬青基因组 DNA 质量检测及雌、雄基因池的构建

采用经改良的 CTAB 法提取的 DNA 呈无色絮状沉淀。其电泳结果显示:条带完整,带型清晰明亮,无拖尾现象(见图 1)。经分光光度计检测的苦丁茶冬青基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 均约为 1.8,说明苦丁茶冬青基因组 DNA 的纯度高,用这种方法提取的苦

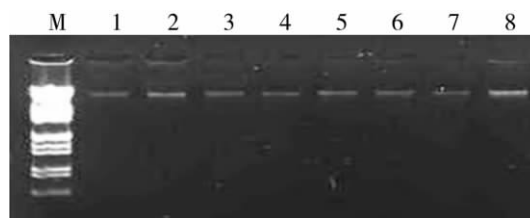


图1 苦丁茶冬青基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果
M 为 λ DNA/*Hind*Ⅲ, 1~8 为苦丁茶冬青 DNA

丁茶冬青 DNA 能满足 RAPD-PCR 分析实验要求。选取 C-020, C-026, C-031, C-083, C-037, C-040, C-071, C-084, C-075, W-074, 共计 10 份雌性苦丁茶冬青种质材料的 DNA, 等量混合, 组成雌性 DNA 样品池; 选取 C-013, C-021, C-025, C-034, C-059, C-061, C-078, C-092, C-094, C-115, 共计 10 份雄性苦丁茶冬青种质材料的 DNA, 等量混合, 组成雄性 DNA 样品池。

2.2 RAPD-PCR 实验条件正交设计结果直观分析 正交设计优化的 RAPD-PCR 产物电泳结果见图 2。参照何正文等^[12]的方法,依据条带的多少及其明亮程度和背景的清晰度对 PCR 扩增结果依次打分。将电泳条带数量丰富、清晰、稳定的最佳组合记 16 分,最差的组合计 1 分(见表 3)。

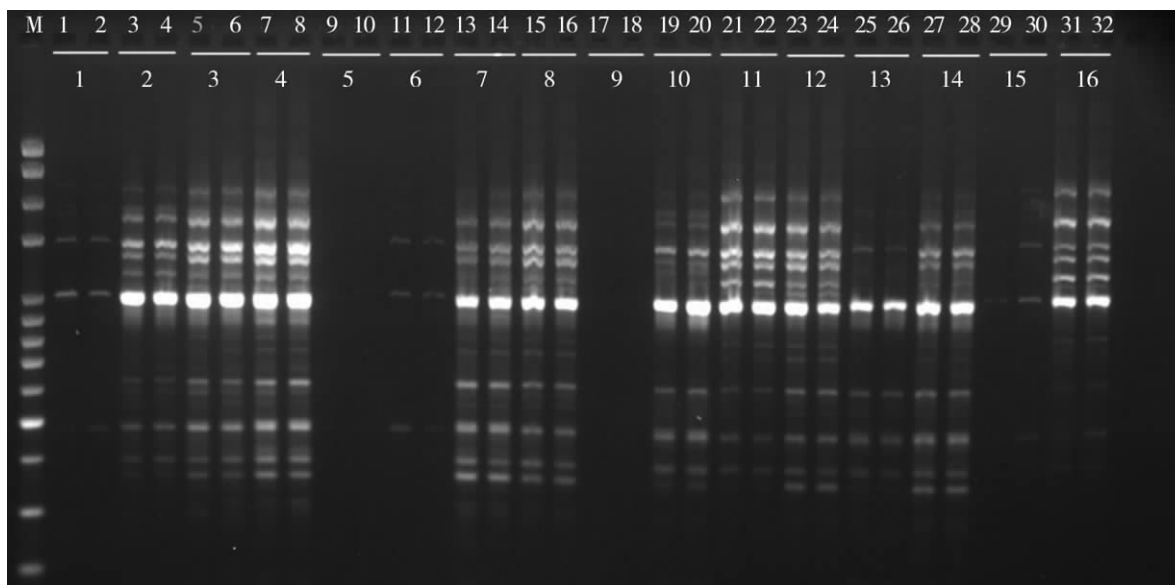


图2 正交实验结果

泳道 M 为分子质量标准(100 bp plus DNA ladder) 泳道 1~2 为 1 号组合,泳道 3~4 为 2 号组合,以此类推

表 3 各正交组合的评分

重复	各处理的评分															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I	5	12	14	15	1	4	9	13	1	7	11	16	6	10	3	8
II	5	12	14	15	1	3	9	13	1	7	11	16	6	10	4	8
总计	10	24	28	30	2	7	18	26	2	14	22	32	12	20	7	16

参照刘新亮等^[13]的方法,首先对试验结果进行极差分析,极差 R 反映了影响因素对反应体系的影响大小, R 值越大,说明相关因素对实验体系的影响越显著。由表 4 可知,各因素水平的变化对苦丁茶冬青 RAPD-PCR 反应的影响从大到小依次为: Mg^{2+} > 模板 DNA > dNTPs > *Taq* DNA 聚合酶 > 引物。

表 4 正交设计实验结果的极差分析

评分项	因素					Y
	DNA	Mg^{2+}	引物	dNTPs	<i>Taq</i> DNA	
K_1	92.00	26.00	55.00	80.00	57.00	8.44
K_2	53.00	65.00	65.00	84.00	60.00	
K_3	70.00	64.00	76.00	60.00	79.00	
K_4	55.00	104.00	74.00	46.00	74.00	
k_1	11.50	3.25	6.88	10.00	7.13	
k_2	6.63	8.13	8.13	10.50	7.50	
k_3	8.75	8.00	9.50	7.50	9.88	
k_4	6.88	13.00	9.25	5.75	9.25	
R	4.87	9.75	2.62	4.75	2.75	

2.3 RAPD-PCR 实验条件正交设计结果方差分析

2.3.1 模板 DNA 用量对 RAPD-PCR 反应的影响 DNA 模板用量是影响 RAPD-PCR 扩增效果的 1 个重要因子。在一定范围内,PCR 的产量会随着模板浓度的升高而增加,但当模板浓度过高时,有可能导致非特异性产物的出现,从而影响 PCR 扩增结果^[14]。经多重比较分析后发现,本试验中 DNA 模板用量为 20 ng 时,与 DNA 模板用量为 40、60、80 ng 处理水平间的差异均达到显著水平(见图 3),故本实验的 PCR 确定 DNA 模板用量为 20 ng。

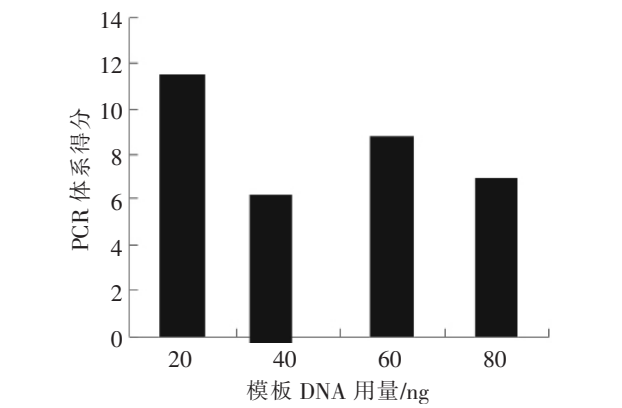


图 3 DNA 模板用量对 RAPD-PCR 的影响

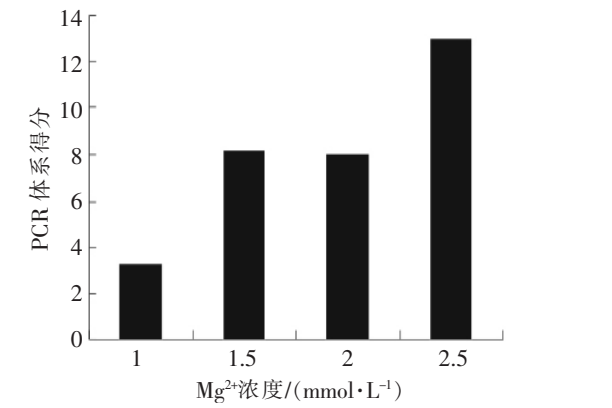


图 4 Mg^{2+} 浓度对 RAPD-PCR 的影响

2.3.2 Mg^{2+} 浓度对 RAPD-PCR 反应的影响 Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响。它不仅影响 *Taq* 酶的活性,还能与反应液中的 dNTPs、模板 DNA 及引物结合,影响引物与模板的结合效率,模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[15]。经多重比较分析后,发现本试验 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol·L⁻¹ 时与 Mg^{2+} 浓度为 1.0、1.5 和 2.0 mmol·L⁻¹ 处理水平的差异均达到显著水

平(见图4)。故确定 PCR 体系中的 Mg^{2+} 浓度为 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 引物浓度对 RAPD-PCR 反应的影响 引物浓度关系到 PCR 扩增产物的质量,浓度太低,其与 DNA 模板结合位点就少,不能进行有效的扩增;浓度太高则会促使引物错误地引导非特异性产物二聚体的生成^[16]。经多重比较分析后发现,本试验中引物浓度为 $0.3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与引物浓度为 0.1 、 0.2 、 0.3 、 $0.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理水平的差异均达到显著水平(见图5),故选择引物浓度为 $0.3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

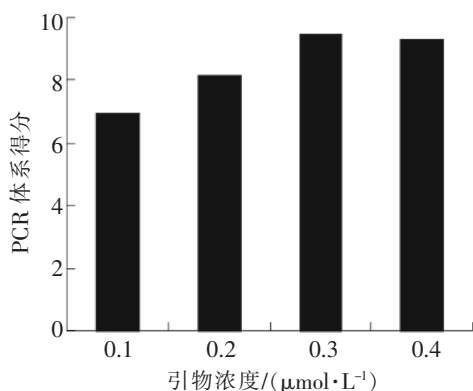


图5 引物浓度对 RAPD-PCR 的影响

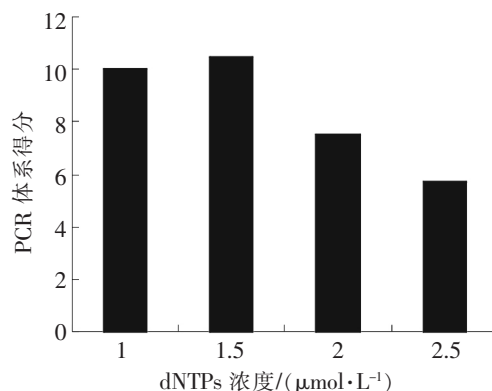


图6 dNTPs 浓度对 RAPD-PCR 的影响

2.3.4 dNTPs 浓度对 RAPD-PCR 反应的影响 dNTPs 浓度过高,可能会导致聚合酶掺入错误,影响扩增的特异性,还会与 *Taq* DNA 聚合酶竞争 Mg^{2+} ,从而使 Mg^{2+} 总量下降,影响聚合酶的活性;如果 dNTPs 浓度过低则会使 dNTPs 过早消耗使产物单链化。本实验 dNTPs 浓度为 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,PCR 效果显著好于其他水平(见图6),故选用 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 dNTPs 浓度。

2.3.5 *Taq* DNA 酶用量对 RAPD-PCR 反应的影响 在 PCR 反应中 *Taq* DNA 聚合酶的浓度过高会使试验成本增加,且会导致非特异性产物增加;浓度过低时,酶在 PCR 过程中过早消耗完,导致产物合成率下降。在本实验中,*Taq* DNA 聚合酶为 2 U 时,扩增效果与其他水平具有显著性差异(见图7),这说明 *Taq* DNA 聚合酶对苦丁茶冬青的 RAPD 实验有较大影响,故采用 2.0 U 为 *Taq* DNA 聚合酶用量。最终确定本实验的 RAPD 反应体系为: $25 \text{ } \mu\text{L}$ 反应体系组成: $10 \times \text{buffer}$ $2.5 \text{ } \mu\text{L}$, Mg^{2+} $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, DNA 模板 20 ng , 引物 $0.3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* 酶 2.0 U , dNTPs $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

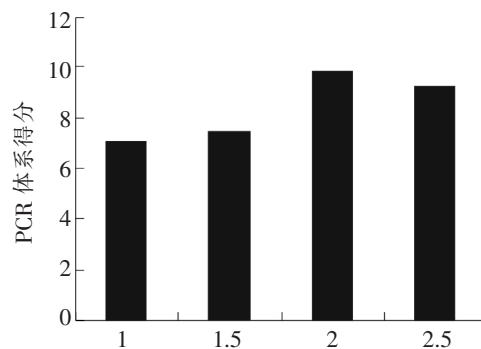


图7 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 RAPD-PCR 的影响

2.3.6 PCR 扩增程序参数对 RAPD-PCR 反应的影响 引物退火温度偏低,会导致电泳图谱的背景模糊,且条带偏弱;引物退火温度偏高,会导致扩增产物少,且不利于长片段产物的扩增。本实验选用 AU04 引物,循环次数为 40,参考 AU04 理论 T_m 值,设置 33 、 34 、 35 、 36 、 $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 5 个温度梯度,测定 RAPD 合适的退火温度。结果(见图8)表明,5 个退火温度的扩增效果均良好,无显著差异。由于在允许的温度范围内,较高的温度会提高反应特异性,减少非特异性产物的生成,因此,本实验选用 $36 \text{ } ^\circ\text{C}$ 作为退火温度。

RAPD-PCR 循环次数不够,扩增产物少,会导致部分谱带不能够被检测;过多的循环次数可导致一些非特异性的产物干扰,发生错配的比例会上升,引起弥散现象。本实验选用 AU04 引物,退火温度为 $36 \text{ } ^\circ\text{C}$,设置 25 、 30 、 35 、 40 、 $45 \text{ } ^\circ\text{C}$ 5 个循环参数,测定 RAPD 合适的循环次数。实验结果(见图9)表明:25 次循环时,无法检测到扩增产物;30 次和 35 次循环时,扩增产物产量不足,条带较弱且部分条带缺失;40 次和 45 次循环时,扩增产物亮度高,清晰度高。由于在可以检测到扩增片段的条件下,循环次数以较少为好,因此,确定 40 次循环为本实验的最佳反应参数。由此确定最佳的 RAPD-PCR 扩增程序为: $94 \text{ } ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min , 然后 $94 \text{ } ^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $36 \text{ } ^\circ\text{C}$ 退火 30 s , $72 \text{ } ^\circ\text{C}$ 延伸 120 s , 进行 40 个循环,最后 $72 \text{ } ^\circ\text{C}$ 延伸 10 min ; $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 保存。

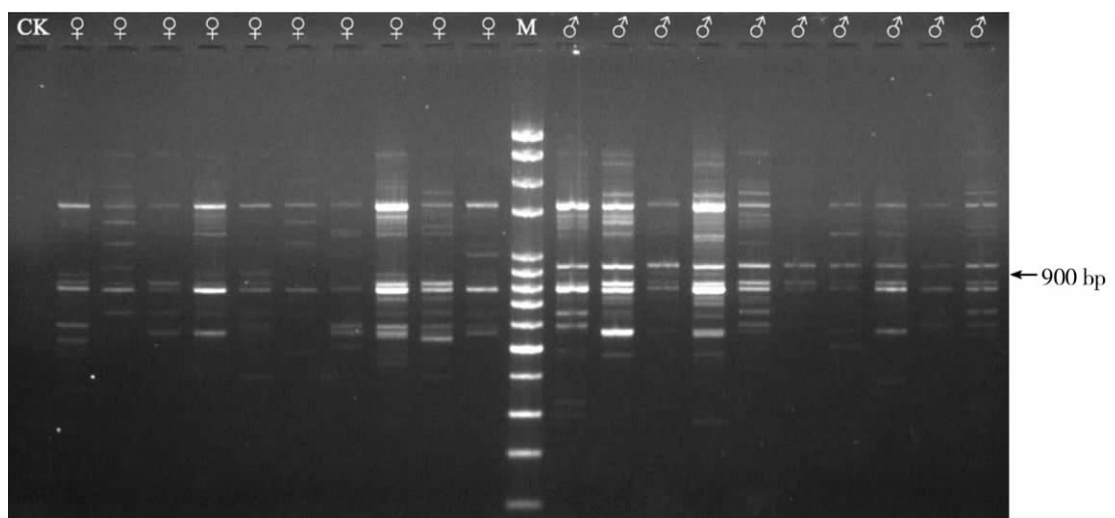


图 11 S164 引物在 20 份苦丁茶冬青种质材料中的扩增结果

M 为相对分子质量标准, ♀: 雌性种质材料, ♂: 雄性种质材料

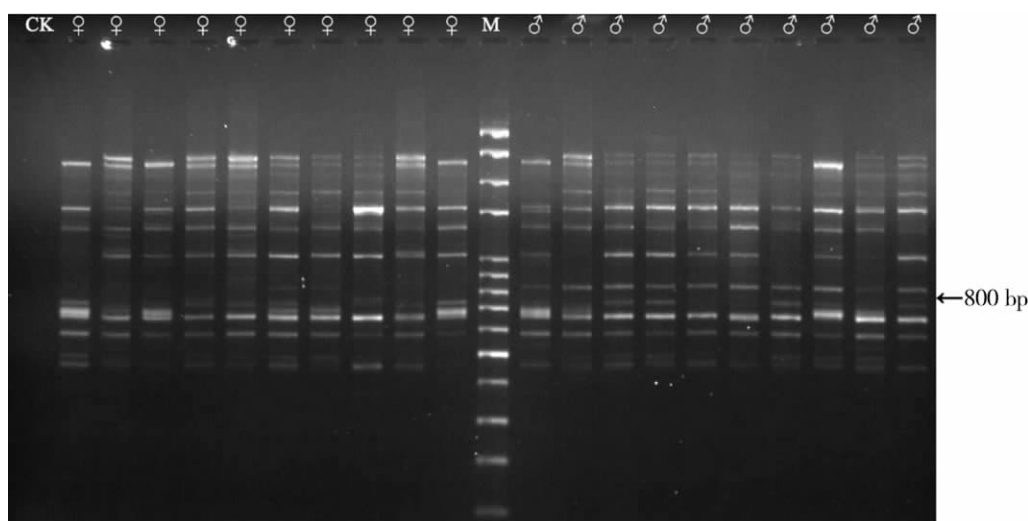


图 12 S191 引物在 20 份苦丁茶冬青种质材料中的扩增结果

M 为相对分子质量标准, ♀: 雌性种质材料, ♂: 雄性种质材料

RAPD 标记具有成本低、操作简单等特点, 在种质资源遗传多样性分析^[18] 和基因标记^[19] 等方面有广泛的应用。但由于其在显示特异性标记的同时还显示了其他信息, 专一性不强, 且稳定性差, 不易重复等显著缺点限制了它的发展。在 RAPD 标记基础上进一步发展的 SCAR 标记十分稳定, 专一性强, 有效地解决了 RAPD 标记的上述问题^[20]。将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记是当前分子标记的一个重要研究方向, 将本研究获得的 RAPD 片段进行测序, 并根据测序结果设计 SCAR 引物, 从而将其转化为 SCAR 标记, 这将是苦丁茶冬青性别早期鉴定的下一步研究方向。

参考文献:

- [1] 刘国民. 中国木犀科代茶植物的多样性与开发状况[J]. 贵州科学, 2003, 21(1/2): 69-77.
- [2] 郑道君, 刘国民, 何声进, 等. 苦丁茶冬青不同种质材料的酯酶同工酶分析[J]. 广西植物, 2009, 29(2): 242-249.
- [3] 刘国民. 话说绿色黄金[J]. 热带林业, 1997, 25(1): 37-39.
- [4] 刘国民. 海南岛野生苦丁茶树的发现及其植物学特征特性的观察[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1997, 15(2): 129-133.
- [5] 王晓梅, 宋文芹, 刘松, 等. 与银杏性别相关 RAPD 标记[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2001, 34(3): 116-117.

- [6] 侯万伟 樊军锋 周飞梅 等. 与毛白杨性别相关的 RAPD 标记[J]. 中南林业科技大学学报 2008 3(6): 80–83.
- [7] HORMAZA J I, DOLLO L, POLITO V S. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis[J]. TheorAppl Genet 1994 89(1): 9–13.
- [8] 秦瑞云 杨金华 贾彦彦 等. 菠菜性别相关的 RAPD 标记[J]. 江西农业大学学报 2009 31(6): 1121–1126.
- [9] 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.
- [10] 李娟玲 刘国民 贾媛 等. 一种高效提取鹧鸪茶基因组 DNA 的方法[J]. 中国农学通报 2010 26(8): 69–73.
- [11] 张凤琴 徐立新 周鹏 等. 苦丁茶冬青的 RAPD 影响因素及实验条件的优化[J]. 云南植物研究 2003 25(3): 347–353.
- [12] 何正文 刘运生 陈立华 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报 1998 23(4): 403–404.
- [12] 刘新亮 德英 赵来 等. 喜垂穗披碱草 ISSR 反应体系的正交优化[J]. 草业科学 2001 28(5): 738–745.
- [14] 乔燕春 林顺权 杨向晖 等. 均匀设计在枇杷 ISSR-PCR 反应体系优化中的应用[J]. 基因组学与应用生物学 2009 28(1): 123–126.
- [15] 杨水莲 刘卫东 马涛 等. 假俭草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 草原与草坪 2009(1): 11–14.
- [16] 董莉娜 苏雪 孙坤 等. DNA 分子标记在雌雄异株植物性别鉴定中的应用[J]. 广西植物 2006 26(1): 63–68.
- [17] 景建洲 金红 李东亮 等. 谭清苏铁性别连锁的 RAPD 和 SCAR 分子标记[J]. 生物工程学报 2007 23(6): 1097–1101.
- [18] 钟准钦 吴建设 陈诗林 等. 观赏向日葵种质资源遗传多样性 RAPD 分析[J]. 分子植物育种 2009 7(1): 73–78.
- [19] 高金萍 王超 刘英 等. 结球甘蓝抗 TuMV 基因的 RAPD 和 SCAR 标记研究[J]. 植物病理学报 2008 38(5): 549–552.
- [20] 任朝兴 黄建昌 肖艳 等. 番木瓜雄性性别的 RAPD 和 SCAR 标记[J]. 果树学报 2007 24(1): 72–75.

RAPD Markers Linked to the Male Character of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng

LUO Yi-qi, LI Juan-ling, LIU Guo-min, CHENG Shan-han, PAN Xue-feng, ZAI Li-yan

(Kudingcha Research Institute, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: An orthogonal design was made to optimize RAPD-PCR amplification system of *Ilex kudingcha* in 5 factors (DNA template, Mg^{2+} , primer, dNTPs, *Taq* polymerase) at 4 levels, respectively. Through comprehensive analysis, an optimized RAPD-PCR reaction system, was established: $10 \times$ buffer 2.5 μ L, 20 ng DNA template, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$, $0.3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ primers, 2.0 U *Taq* polymerase, and $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs in the 25 μ L reaction system, and the optimized RAPD-PCR amplification program: predenaturing at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, then denaturing at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, elongation at 36 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s and extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 120 s, running for 40 cycles, and final extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The products were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Furthermore, a total number of 91 random primers were screened in the RAPD-PCR. Polymorphic fragments were detected with 24 primers in female and male DNA samples pools. Two male-associated fragments (S164-900 and S191-800) were respectively generated with S164 primer and S191 primer. Repeated experiments indicated that these RAPD markers appeared stably in male individuals. So these RAPD markers can be applied to identify the sex of the young plantlets of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng at the early stage.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; RAPD marker; optimization; sex identification

《热带生物学报》第一届编委会常务编委

刘国民，男，1955年生，湖南祁东县人，教授，博士，博士研究生导师。1989年获云南农业大学农学硕士学位；1992年获湖南农学院农学博士学位。1993年2月分配到海南大学农学院工作至今，现任海南大学教授、海南大学苦丁茶研究所所长、博士/硕士研究生导师、海南省植物学会副理事长、海南省博士·院士产业促进会常务理事等职。历任海南大学农学系主任、海南大学农学院副院长、海南大学作物遗传育种学硕士点负责人、海南大学野生动植物保护与利用重点学科及硕士点负责人、海南大学种质资源学学科负责人等职。近年来主要从事作物种质资源、植物组织培养、生物化学及资源植物学等方面的教学和科研工作。先后主持过国家支撑计划项目、国家科技基础条件平台建设项目、国家自然科学基金项目、海南省自然科学基金项目和海南省教育厅自然科学研究项目等多项科研课题；出版著作3部；发表学术论文70余篇。1999年，《编好教材为新办专业服务》获甘肃省高校教学成果二等奖(第二完成人)；2004年，“水稻TB系统两系不育系组培快繁的研究”获海南省科技进步奖二等奖(第一完成人)。在苦丁茶种质保存与创新利用、苦丁茶栽培与加工技术、苦丁茶种质资源的遗传多样性与分子标记等方面做了大量工作，为我国苦丁茶的学科发展和产业发展作出了较大贡献。



《热带生物学报》第一届编委会常务编委

胡碧煌，男，1963年7月生，湖南常德人，教授，博士生导师。现任海南大学海洋学院制药工程系主任。1983年7月毕业于北京医学院药学专业，获理学学士学位；1986年7月毕业于北京医科大学(现为北京大学医学部)生药学专业，获医学硕士学位；1999年5月毕业于美国罗德岛大学药学院，获药理学博士学位；美国西北大学医学院生物材料研究方向博士后，在美国学习和工作15年。主要从事天然药物化学、多肽药物化学和医药用生物材料的研究。有5项国际和美国专利申请，2项美国专利授权，1项中国专利申请，1项中国专利授权。曾为2项美国NIH课题共同负责人(Co-PI)，现主持1项国家自然科学基金面上项目。为Journal of the American Chemical Society, Biomacromolecules, Analytical Chemistry等杂志审稿，为英国牛津大学出版社出版的专著《高分辨色谱》撰写一个章节。发表期刊学术论文23篇。其中8篇发表在全国一级学会主办的中文核心期刊上，14篇被SCI收录，影响因子5以上论文7篇；发表国际会议论文16篇，其中6篇被ISTP收录，1篇被EI收录。现为科技部国际科技合作计划评价专家库同行专家，国家自然科学基金评审专家，第二批海南省高层次创新创业人才入选者。

