

利用 RAMP-PCR 技术对枸杞 10 个品种资源的分析

梁海永, 刘兴菊, 杨敏生
(河北农业大学林学院, 河北保定 071000)

摘要:以枸杞为材料,建立基因组DNA的有效提取方法,并对10个枸杞品种进行RAMP技术分析研究。结果表明,利用10对引物共扩增出87个条带,其中多态性条带53个;多态性条带比率33.3%~81.9%,10个枸杞品种间的遗传距离为0.1111~0.8333;研究表明,利用RAMP进行枸杞的品种DNA指纹分析是可行的。

关键词:枸杞;基因组DNA;RAMP标记;种质资源

中图分类号:S567.1

文献标志码:A

论文编号:2011-0289

Analysis of *Lycium chinense* Variety Revealed by RAMP-PCR Method

Liang Haiyong, Liu Xingju, Yang Minsheng

(Forestry College, Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071000)

Abstract: To develop valid methods of DNA extraction for *Lycium chinense* for RAMP analysis and research. The result showed that: ten primers were applied to amplification. A total of 87 DNA bands were detected. 53 bands among which were polymorphic. The rate of polymorphic bands was 33.3%–81.9%. 10 *Lycium chinense* cultivars genetic distances were from 0.1111 to 0.8333. In the study, the RAMP markers can be used for the studies of fingerprint of *Lycium chinense* sensitively.

Key words: *Lycium chinense*; RAMP marker; genomic DNA; germplasm

0 引言

枸杞(*Lycium chinense*)为茄科枸杞属的多年生落叶灌木,又名枸杞子,原产中国,具有600多年的栽培历史。同时枸杞果实具有保健功效而被列入药食同源植物,是中国传统的名贵药材和出口创汇产品。但枸杞在长期的人工栽培和自然繁衍中,由于各种原因,因而在品种品系上出现了混杂,给枸杞品种选育、品种资源鉴定、遗传多样性以及亲源关系进行研究和评价带来了困难。

20世纪90年代以来,随着分子遗传学技术的发展,尤其是PCR技术为核心的分子标记,如随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA、特异性扩增子多态性(specific amplification polymorphism, SAP)、简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)、扩增片段长度多态性(amplified

fragment length polymorphism, AFLP)等多种标记得到了广泛应用^[1]。它主要以DNA为分析对象、遗传多态性表现为核苷酸序列的任何差异,包括单个核苷酸的变异^[2];不受季节、环境的限制,数量多;多态性高,利用大量引物可完成覆盖基因组的分析。现已发展了多种DNA标记技术,为不同的研究目标提供了技术手段^[3]。RAMP(random amplified microsatellite polymorphism)是利用5'锚定的低聚核苷酸GC(CA)₄和GT(CA)₄与RAPD引物发展的一种分子标记。对基因组DNA中的微卫星进行随机扩增^[4]。它比RAPD更能揭示物种的遗传关系,更适合遗传背景尚不太清楚物种的遗传多样性研究。RAMP技术已在仲彬草属、红花、鹅观草属、小豆、甘蔗、大麦等种质资源的研究中得到应用^[5-6]。近年来枸杞的分子标记研究已有一些报道,孙晓东等^[7]对枸杞DNA的提取与分析。严奉坤、魏玉清等^[8-9]对

基金项目:国家林业局行业公益项目“北方主要林木品种指纹库构建及分子鉴定技术研究”(201104039)。

第一作者简介:梁海永,男,1973年生,河北滦县人,高级实验师,硕士,主要从事林业生物技术研究。通信地址:071000 河北省保定市河北农业大学林学院, Tel: 0312-7528746, Email: lianghy@hebau.edu.cn。

收稿日期:2011-01-28, 修回日期:2011-03-24。

宁夏主栽枸杞品种与河北枸杞利用RAPD技术进行了鉴别。郑可大等^[10]对20个台北市场枸杞商品,张艳波等^[11]收集了6种枸杞属植物也运用RAPD技术进行分析。但RAPD技术反应中退火温度低、稳定性较差,本试验尝试利用RAMP技术进一步对10个枸杞品种进行了鉴定与分析,并初步应用到枸杞品种鉴定与遗传多样性分析。

1 材料和方法

1.1 材料

10个枸杞材料:‘长果1号’、‘长果3号’、‘中宁1号’、‘中宁4号’、‘中宁5号’、‘长果0号’、‘南皮1号’、‘圆果1号’、‘圆果2号’、‘海兴2号’

试剂:所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。*Taq*DNA聚合酶及dNTP购自大连宝生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 采用改良的CTAB法^[12]。取200 mg鲜净枸杞叶片1.5 mL离心管中,加入700 μ L DNA提取液研磨碎,并加1 mL洗涤液及30 μ L β -巯基乙醇,充分摇匀后置冰上5 min,于4 $^{\circ}$ C, 12000 g离心8 min后,洗涤一次,弃上清,再加700 μ L预热的高盐CTAB缓冲液,充分混匀后,于65 $^{\circ}$ C水浴60 min,其间颠倒几次。然后于室温冷却4~5 min,取上清,加等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),混匀抽提,室温静置5 min,于室温12000 g离心8 min。上清液移于一新的1.5 mL离心管中,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),充分混匀后室温静置5 min,室温12000 g离心8 min,取上清,重复加等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提,取上清加入等体积氯仿抽提一次,取上清液,加入2倍体积的无水乙醇(-20 $^{\circ}$ C),轻轻混匀后在-20 $^{\circ}$ C沉淀30 min以上,12000 g离心10 min,将所得沉淀风干后溶于100 μ L水中,置4 $^{\circ}$ C冰箱备用。

1.2.2 PCR反应体系优化 枸杞DNA基因组RAMP-PCR 20 μ L反应中最优条件为Mg²⁺浓度为3.0 mmol/L,引物浓度为1.5 μ mol/L,dNTPs的浓度为0.15 mmol/L,*Taq*DNA酶为1.5 U。

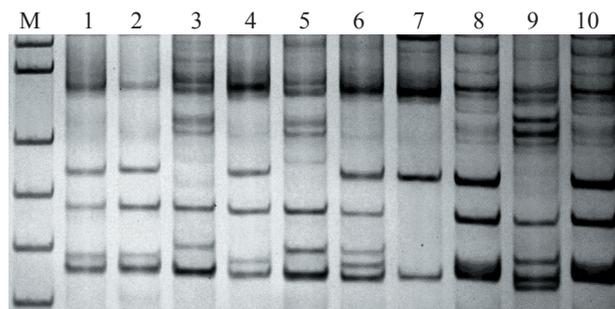
1.3 PCR扩增反应与电泳

扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 4 min,95 $^{\circ}$ C 50 s,47 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,42个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。反应产物采用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,190 V电泳1 h左右,取出进行AgNO₃染色:0.2% AgNO₃银染10 min;去离子水冲洗两遍后,用显色液(1.5%NaOH,0.4%甲醛,1% Na₂SO₃ 250 μ L)显色,直至条带清晰为止,10%乙醇0.5%乙酸固定;照相并记录。

2 结果与分析

2.1 10个枸杞品种鉴定的RAMP分析

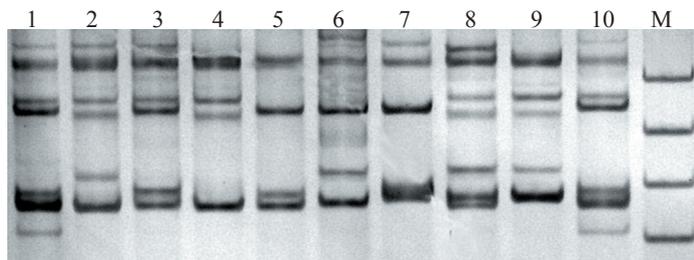
从20对引物中选取10对扩增条带清晰、重复性好、特异性高的引物,对10个不同的枸杞品种进行RAMP扩增,对各引物扩增产生的条带进行统计分析。从扩增结果(图1、图2)来看,RAMP引物得到的扩增产物片段大小基本上在100~500 bp之间。



M:100 bp DNA Marker; 1.‘长果1号’; 2.‘长果3号’; 3.‘中宁1号’; 4.‘长果0号’; 5.‘中宁5号’; 6.‘中宁4号’; 7.‘南皮1号’; 8.‘圆果1号’; 9.‘圆果2号’; 10.‘海兴2号’

图1 采用的引物组合有 ramp2-s438 部分扩增结果

利用10条引物进行扩增结果见表1,可以看出,不同引物在不同材料中扩增条带的多态性也不同,引物



M:100 bp DNA Marker; 1.‘长果1号’; 2.‘长果3号’; 3.‘中宁1号’; 4.‘长果0号’; 5.‘中宁5号’; 6.‘中宁4号’; 7.‘南皮1号’; 8.‘圆果1号’; 9.‘圆果2号’; 10.‘海兴2号’

图2 采用的引物组合有 ramp2-s386 部分扩增结果

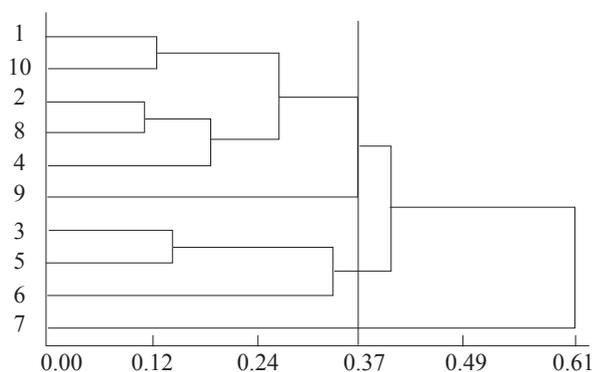
RAMP2-S438 扩增的多态性最高(81.9%),而引物 RAMP1-S381 扩增的多态性最低(33.3%),其余引物的多态性介于两者之间。选用12对引物中10条引物在所有枸杞品种中都可扩增出条带,多态性明显,因而选取多态性高的引物对10个不同枸杞品种进行种间鉴定。

表1 10个有效引物在枸杞品种中的扩增情况

引物组合	总的扩增带数	多态性扩增带数	多态性条带的比例/%
RAMP1-S381	9	3	33.3
RAMP1-S438	6	3	50
RAMP1-S485	8	5	62.5
RAMP2-S381	8	6	75
RAMP2-S438	11	9	81.9
RAMP2-S485	9	5	55.6
RAMP2-S1181	9	7	77.8
RAMP1-S1181	9	6	66.7
RAMP1-S386	10	4	40
RAMP2-S386	8	5	62.5

2.2 10个枸杞品种的遗传关系分析

对10个枸杞材料的RAMP扩增的100~500 bp范围内条带分别赋值,同一位置有带的记为1,无带的记为0。按照Nei和Li方法计算遗传相似系数^[13]。根据2对引物对10个枸杞品种基因组DNA的随机扩增结果,通过计算,建立树状聚类图。结果表明,10个枸杞品种间的遗传距离为0.1111~0.8333;其中,2号和8号间遗传距离最小,为0.1111,7号和其他品种间遗传距离均较大,尤其是与9号的遗传距离最大,为0.8333。根据扩增结果将参试的10个品种3个聚类,在遗传距离



1.‘长果1号’;2.‘长果3号’;3.‘中宁1号’;4.‘长果0号’;
5.‘中宁5号’;6.‘中宁4号’;7.‘南皮1号’;8.‘圆果1号’;
9.‘圆果2号’;10.‘海兴2号’

图3 基于RAMP标记的10个枸杞品种的聚类图

0.37处做结合线,可将其划分为3类:第1类包括1号、2号、4号、8号、9号、10号品种;第2类为3号、5号、6号品种;第3类为7号品种。

3 结论与讨论

生产中应用栽培的枸杞品种较多,不同品种质量上存在明显的区别。完善枸杞的DNA分子指纹鉴定方法,为枸杞品种鉴定和保护研究奠定了基础。本研究利用RAMP技术,对来自不同地区的枸杞材料和新育成的品系进行了初步分析。结果显示多数引物扩增均具有多态性,多态性最高为81.9%,多态性最低为33.3%。实验中最少通过2对引物可以对10个枸杞品种进行鉴定;聚类分析结果表明10个枸杞品种间的遗传距离为0.1111~0.8333;根据扩增结果将参试的10个品种可划分为3类:第1类包括1号、2号、4号、8号、9号、10号品种,这些枸杞主要起源于河北沧州地区;第2类为3号、5号、6号品种,这3个品种均为宁夏枸杞;第3类为7号品种,虽然在沧州南皮地区选育,但遗传背景明显与前2类不同。该品种的起源有待于进一步证实。结果也说明了枸杞品种的遗传基础具有明显的地域特征。这也与中宁枸杞在河北地区栽培通常不能正常开花结实,保证了当地种植资源的纯正性有关。

目前对枸杞DNA基因组的研究仅有关于RAPD分子标记的报道,但RAPD分子标记存在可重复性差、结果不稳定的等缺点。枸杞中RAMP技术进行DNA指纹研究,与其他学者一样也体现了比RAPD结果稳定、多态性水平高的特点^[14]。RAMP标记也发现枸杞栽培种内有较高的遗传变异。说明各栽培类型在不同生态条件下,产生了丰富的遗传变异。RAMP可以更好的反应栽培种内的遗传关系,这在多种植物的研究中都得到了验证^[15]。RAMP标记揭示DNA的多态性较高,但确定枸杞属内栽培种的系统演化方面,还需扩大引物组合与品种数量进行深入研究。

参考文献

- [1] Wu K S, Jones R, Danneberger L, et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning[J]. Nucl Acids Res,1994,22(15): 3257-3258.
- [2] 罗文永,胡骏,李晓方.微卫星序列及其应用[J].遗传,2003,25(5): 615-619.
- [3] 王军,葛玉香,贺普超. RAPD标记在山葡萄种质鉴定中的应用[J].植物研究,2004,24(4):473-476.
- [4] 尚海英,郑有良,魏育明,等.应用RAMP标记研究黑麦属遗传多样性[J].农业生物技术学报,2003,11(6):566-571.
- [5] 张利,周永红,魏育明,等.应用RAMP分子标记探讨柃草属的种间关系[J].高技术通讯,2003(4):28-33.

- [6] 林菊生.现代细胞分子生物学技术[M].北京:科学出版社,2004, 368-370.
- [7] 孙晓东,李军,施京红.枸杞基因组DNA的提取与分析[J].陕西中医,2003,24(12):1129-1131.
- [8] 严奉坤,许兴,魏玉清,等.枸杞基因组DNA提取及指纹图谱分析[J].时珍国医国药,2007,18(1):46-48
- [9] 魏玉清,许兴,王掌军,等.宁夏不同地区主要栽培枸杞的RAPD分析[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,18(1):60-65.
- [10] Cheng K T, Chang H C, Huang H, et al. RAPD analysis of *Lycium bararum* medicine in Taiwan market[J]. Bot Bull Acad Sin,2000,41: 11-14.
- [11] Zhang K Y B, Leung H W, Yeung H W, et al. Differentiation of *Lycium bararum* from its related *Lycium* species using random amplified poly-morphic DNA[J]. PlantaMed, 2001, 67: 379-382.
- [12] 李先进,彭正松,张正英,等.四种药用蕨类DNA提取的比较研究[J].绵阳师范学院学报,2008,27(8):85-87
- [13] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001:30-41.
- [14] 孔秋生,李锡香,向长萍,等.萝卜种质资源亲缘关系的RAPD分析[J].植物遗传资源学报,2004,5(2):156-160.
- [15] 吕秀兰,张光伦,廖明安,等.葡萄品种遗传关系的RAMP分析[J].四川农业大学学报,2004,22(2):133-137.