

甘肃枸杞属植物的 RAPD 分析

陈刚, 刘津, 马志刚*, 程亚坤, 王响元 (兰州大学药学院, 甘肃兰州 730000)

摘要 [目的]研究甘肃枸杞属植物种间亲缘关系。[方法]提取甘肃省内分布的枸杞属植物的基因组 DNA, 用 RAPD 方法检测其 DNA 多态性, 并用 UPGMA 聚类法对其种间关系进行分析。[结果]从 80 条 10 碱基的随机引物中筛选出了 28 条适用于枸杞属植物 RAPD 分析的引物。在 6 份种质材料中共扩增出了 171 条带, 其中 118 条为多态性条带, 多态性条带的比例为 69.0%; 遗传相似性系数在 0.39~0.70 之间, 平均值为 0.59。[结论]聚类分析显示 6 份甘肃枸杞属种质材料中宁夏枸杞、北方枸杞和截萼枸杞亲缘较近, 中国枸杞和新疆枸杞亲缘较近, 黑果枸杞与其他种质间遗传距离较远。

关键词 枸杞; RAPD; DNA 指纹图谱; 聚类分析

中图分类号 S567.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)04-01459-03

Analysis of Wolfberry (*Lycium L.*) in Gansu by RAPD

CHEN Gang et al (College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract [Objective] To study the genetic relationship among species in *Lycium L.* of Gansu Province. [Method] The genomic DNA was extracted from *Lycium L.* in Gansu Province and its polymorphism and genetic relationship were analyzed by RAPD and UPGMA cluster method. [Result] 28 primers were screened from 80 random primers of 10 bases for RAPD analysis of 6 samples. By using 28 primers, a total of 171 bands were obtained and 118 (69.0%) showed polymorphism. The genetic similarity coefficients were between 0.39 and 0.70 and the average value was 0.59. [Conclusion] Cluster analysis indicated that the closer relationship was between *L. chinense* Mill. and *L. dasystemum* Pojark., *Lycium barbarum L.*, *L. chinese* Mill. var. *potaninii* (Pojark.) A. M. Lu and *L. truncatum* Y. C. Wang were clustered together. *L. ruthenicum* Murr. is highly divergent from other species.

Key words *Lycium L.*; RAPD; DNA fingerprint; Cluster analysis

枸杞系茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium L.*)多年生落叶灌木, 是一种重要的药用植物, 其叶、果、根皮均可入药。2010 版药典收录了宁夏枸杞(*Lycium barbarum L.*)的干燥成熟果实为中药枸杞子(*Lycii Fructus*)的药典品种, 并收录中国枸杞(*Lycium chinense* Mill.)和宁夏枸杞的干燥根皮为中药地骨皮(*Lycii Cortex*)的药典品种^[1]。枸杞子中的主要有效成分枸杞多糖(*Lycium barbarum polysaccharides*, LBP)对人体肝脏具有保护作用, 可降低血脂含量, 防止粥样动脉硬化, 促进骨髓造血干细胞的增殖, 加快疲劳肌肉的恢复, 加强淋巴细胞的调控而增强免疫功能并抑制肿瘤。至今, 枸杞多糖已成为保健食品中的一种重要功能性添加剂^[2]。枸杞嫩叶可食用, 种子可榨油, 油为半干性, 可用做润滑油的原料, 枝叶还可作为饲料^[3-4]。枸杞属植物全世界约分布有 80 个种, 其中中国分布有 7 种 3 变种共 10 个分类群^[5], 野生种主要分布于宁夏、青海、甘肃、内蒙古、新疆、河北等西北及华北地区, 尤其在黄河两岸的引黄灌区、黄土高原及荒漠干旱地区分布广泛。作为常异花授粉植物, 枸杞多为自交不亲和, 基因型高度杂合, 一粒种子的繁育就能产生强分离的后代群体^[6]。枸杞药材的种植和繁育一直采用营养繁殖方式, 从而造成枸杞没有完整的系谱记录, 给枸杞道地药材的鉴别、遗传育种和种质资源利用带来了极大的困难。

DNA 随机扩增多态性分析技术(RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA)是 DNA 分子标记技术(或称 DNA 指纹技术)的一种, 可直接分析植物 DNA 的多态性, 找出特

有的 DNA 标记, 在 DNA 分子水平上鉴别植物, 使得种质资源鉴定从着眼于表观提高到分子水平, 从而克服近缘植物因在形态上基本一致而给传统药用植物鉴别带来的困难^[7]。RAPD 具有操作简单、成本较低、所需 DNA 样品量少等优点, 被广泛用于资源品种鉴定和遗传多样性研究^[8-9]。笔者对适用于甘肃境内分布的 6 个分类群枸杞属植物的 RAPD 多态性引物进行筛选, 利用 RAPD 分子标记技术鉴定甘肃枸杞属植物的不同分类群, 并对其亲缘关系进行分析, 以期枸杞属植物的种质资源保护和选育奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 植物材料。以枸杞嫩叶为材料提取基因组 DNA。枸杞叶片取自甘肃各地区的野生枸杞植株(表 1), 采后放入便携液氮罐中, 待用。

表 1 6 份枸杞种质的名称和来源

编号	名称	来源	主要特征
1	新疆枸杞	张掖	茎、枝灰白或灰黄
2	北方枸杞	武威	雄蕊长于花冠
3	截萼枸杞	张掖	花萼裂成截头
4	中国枸杞	兰州	花萼 3~4 齿裂
5	宁夏枸杞	兰州	花萼 2 中裂
6	黑果枸杞	靖远	果实紫黑色

1.1.2 试剂与引物。Golden Easy PCR System 购自天根生化科技(北京)有限公司; 10 碱基随机引物购自上海生工生物工程有限公司; Agarose (Biowest); GoldenView I 型核酸染色剂购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 仪器设备。PCR 仪(MyCycler™ Thermal Cycler, BIO-RAD, Inc, USA); 电泳仪(Tanon™ EPS 300 型, 上海天能科技有限公司); 电泳槽(BL29-DYCP-31DN 型, 北京六一仪

作者简介 陈刚(1987-), 男, 宁夏银川人, 硕士研究生, 研究方向: 生药质量鉴定与开发利用研究, E-mail: chengang198703@gmail.com。* 通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事药用植物资源开发与综合利用研究, E-mail: mazhigang@lzu.edu.cn。

收稿日期 2012-12-27

器厂);组织研磨仪(QIAGEN™ Tissue Lyser II, Inc, GER); Thermo Scientific Heraeus Biofuge Primo R 台式离心机; Tanon-4200SF 凝胶图像分析系统; BIOER MB-102 震荡型恒温金属浴。

1.2 方法

1.2.1 枸杞基因组 DNA 的提取与检测。用 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法大量提取基因组总 DNA:分别称取冷冻保存的枸杞叶片 0.5 g,用组织研磨仪研成碎末,加入 700 μl 的 2 \times CTAB[0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2.5 mol/L NaCl, 0.02 mol/L EDTA (pH 8.0), 2% CTAB, 2% PVP] 提取液,于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温 1 h,中间晃动几次;加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)混匀,静置 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,再抽提一次;加入 350 μl NaCl (5 mol/L) 和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的异丙醇 400 μl ,摇匀并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中沉淀 2 h; 12 000 r/min 离心 10 min,管底可见絮状 DNA 沉淀,用 1 ml 75% 乙醇洗涤 2 次后风干,风干后用 50 μl TE[10 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.01 mol/L Na₂-EDTA (pH 8.0)] 溶解。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳对所提 DNA 进行检测,条带清晰可见的放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 PCR 扩增及检测。PCR 扩增体系(25 μl):模板 DNA 1 μl ,引物浓度 0.35 $\mu\text{mol/L}$,Taq DNA 聚合酶 1 U, 2 \times Reaction Mix 12 μl , ddH₂O 补齐。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 45 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, Tanon-4200SF 凝胶图像分析系统拍照。

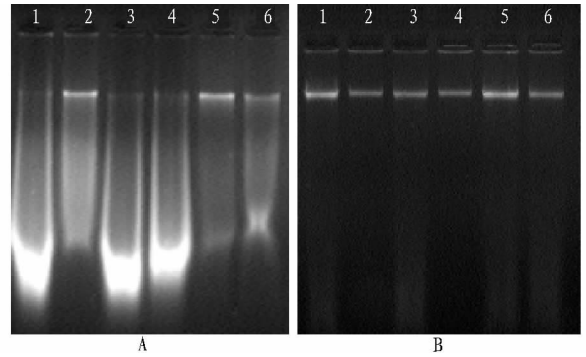
1.2.3 RAPD 引物筛选。每个引物任选 2 个种的枸杞 DNA 为模板进行 RAPD 引物筛选,每个引物扩增 2 次,产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,选取扩增条带数多、稳定、清晰的引物。

1.2.4 条带统计与分析。统计扩增出的条带数,选取分子量在 100~1 000 bp 的 DNA 条带,将每个条带看做是一个遗传位点,谱带按 0/1 系统记录,相同迁移位置有条带记为“1”,无带记为“0”,所得数据用 NTsys2.10e 软件进行相似性计算和聚类分析,应用算术平均数的非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA) 构建聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 质量检测 该试验在参考 CTAB 法基础上适当改进,在加入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的异丙醇前加入 350 μl 的 NaCl(5 mol/L) 溶液,使 DNA 得以充分沉淀并防止其降解,由图 1 可知,改进方法后得到的 DNA 电泳带很清晰,基本无降解拖尾现象(图 1B),因此试验选取改进后所得到的 DNA 进行 RAPD 分析。

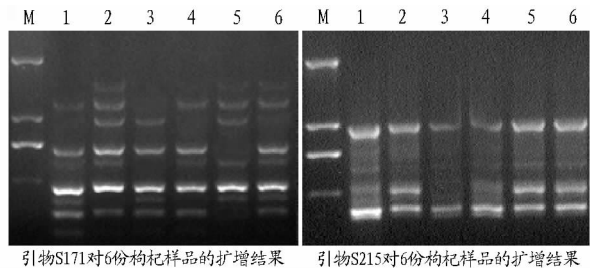
2.2 扩增产物的多态性 该研究 80 条引物中共筛选出 28 条适于枸杞属的 RAPD 引物; 28 个引物在 6 份种质中共扩增出 171 条带,其中 118 条为多态性条带,多态性条带比例达 69.0%,平均每个引物产生 6.1 条带和 4.2 条多态性带;不同



注:A 为 CTAB 法提取的枸杞 DNA 样品凝胶电泳检测结果;B 为改进 CTAB 法提取的枸杞 DNA 样品凝胶电泳检测结果;1~6 为枸杞品种编号。

图 1 枸杞基因组 DNA 电泳图谱

引物扩增的总带数和多态性带数的差异性较大,产生总多态性带数最多的引物是 S171,产生了 8 条多态性扩增条带(图 2);产生总带数最少的是 S28 和 S125,仅 3 条。多态性比例最高达 100%,最低为 22.22%。每条引物的多态带为 2~8 条,分子量大小在 100~1 000 bp 之间(表 2)。



注:M 为标准分子量,1~6 为品种编号。

图 2 引物 S171 和 S215 对 6 份枸杞种质材料的 RAPD 扩增图谱
表 2 28 条引物对 6 份枸杞种质的扩增结果

引物	总带数	多态性带数	多态性位点频率//%	引物	总带数	多态性带数	多态性位点频率//%
S2	4	2	50.00	S171	9	8	88.89
S6	4	3	75.00	S183	6	5	83.33
S7	5	2	40.00	S195	9	7	77.77
S8	6	5	83.33	S206	7	3	42.86
S10	5	3	60.00	S215	6	3	50.00
S21	9	2	22.22	S218	8	7	87.50
S22	4	2	50.00	S230	8	7	87.50
S24	5	2	40.00	S251	4	4	100.00
S26	7	6	85.71	S317	6	5	83.33
S28	3	2	66.66	S337	4	3	75.00
S36	8	6	75.00	S350	8	7	87.50
S40	4	2	50.00	S356	9	6	66.66
S125	3	3	100.00	S367	9	4	44.44
S155	7	6	85.71	S374	4	3	75.00
总数	171	118	69.00	平均	6.1	4.2	69.00

2.3 聚类分析结果 利用 NTsys2.10e 软件计算不同种质间的遗传相似系数,再根据遗传相似系数采用 UPGMA 聚类方法对供试枸杞种质资源进行聚类分析,结果发现这 6 种枸杞资源的相似性系数在 0.39~0.70 之间,平均值为 0.59。其中宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)和中国枸杞(*L. chinese* Mill.)之间相似性系数最小,仅为 0.39,亲缘关系最远;宁夏

枸杞和北方枸杞 [*L. chinese* Mill. var. *potaninii* (Pojark.) A. M. Lu] 之间相似性系数最大, 达 0.70, 亲缘关系最近。从聚类结果(图 2)可看出, 以阈值为 0.56 划分时, 6 份枸杞种质材料可分为 3 类: 第 1 类为宁夏枸杞、北方枸杞和截萼枸杞 (*L. truncatum* Y. C. Wang); 第 2 类为黑果枸杞 (*L. ruthenicum* Murr.); 第 3 类为中国枸杞和新疆枸杞 (*L. dasystemum* Pojark.)。RAPD 分子标记的聚类结果与枸杞属形态分类基本相似, 能将种间关系划分清楚。

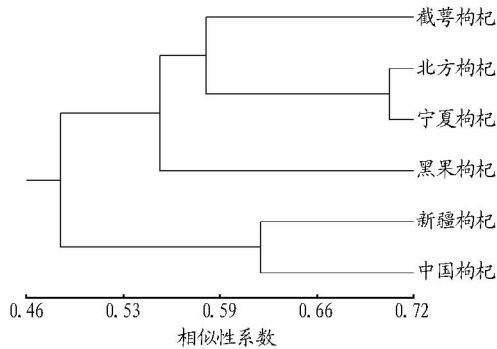


图 3 6 份枸杞种质的聚类分析结果

3 结论与讨论

DNA 提取质量是影响 RAPD 试验结果的重要因素之一, 因此, 该试验采用了优化的 CTAB 法提取枸杞叶片的全基因组 DNA。通常用于枸杞叶片 DNA 的提取方法易造成 DNA 的降解或丢失^[10], 而该试验在沉淀 DNA 时, 在加入异丙醇的同时加入适量的 5 mol/L NaCl 溶液, 不仅加快了 DNA 的沉淀速率, 也减少了杂质吸附, 所得到的 DNA 纯度高, 完整性好(图 1)。将所得到的基因组 DNA 用于 PCR, 产物的条带数多于传统 CTAB 法, 且条带更清晰。该试验在研磨叶片时用到了组织研磨仪, 组织研磨仪一次最多可快速研磨样品 80 份, 如果需要大量提取植物组织样本 DNA 时, 参考该方法, 可提高工作效率。

聚类分析结果显示 6 份枸杞种质材料中宁夏枸杞、北方枸杞和截萼枸杞亲缘较近; 中国枸杞和新疆枸杞亲缘较近, 黑果枸杞与其他种质间遗传距离较远。前人研究报道北方枸杞与中国枸杞的亲缘关系在传统分类上较近^[11], 而该试验 RAPD 分子标记的聚类结果反而较远。该试验从 80 条随机引物中筛选出了 28 条适用于枸杞 RAPD 分析的引物, 但

这些引物在检测效率上相差较大, 特异性条带比例从 22.22% ~ 100.00%。大部分引物在不同种质间扩增出的条带差异较小, 只有少部分引物可将绝大多数种质区分开。由此可看出, 该试验所筛选的适用引物数量还不够, 如果增加引物数量, 可在一定程度上增加试验结果的准确性。RAPD 对反应条件十分敏感, 易受到各种因素的影响, 包括模板的质量和浓度、PCR 的扩增条件、基因组的复杂性等, 因此试验的重复性较差^[12]。目前枸杞的遗传背景还不清楚, 所以用 RAPD 技术对其基因组 DNA 进行指纹图谱分析, 从而进行地道品种鉴别、遗传多样性及亲缘关系研究是目前最有效的方法之一^[13-14]。该研究运用 RAPD 分析技术对甘肃枸杞属植物的种类和亲缘关系进行了研究, 为此后该属植物的育种工作和开发利用提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 232-234.
- [2] 方建国, 丁水平, 田庚元. 枸杞多糖药理作用与临床应用[J]. 医药导报, 2004, 23(7): 484-485.
- [3] 王亚军, 安巍, 石志刚, 等. 枸杞药用价值研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(30): 13213-13214.
- [4] DONG H F, REN Y L. Analysis on Chemical Compositions in Chinese Wolfberry from Different Producing Areas [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(9): 1870-1872.
- [5] 路安民. 中国枸杞属的分类研究[M]//宁夏枸杞研究. 银川: 宁夏人民出版社, 1999: 3-10.
- [6] 李彦龙, 樊云芳, 戴国礼, 等. 枸杞种质遗传多样性 AFLP 分析[J]. 中草药, 2011, 42(4): 770-773.
- [7] 李军, 郭晏海, 秦雪梅. DNA 随机扩增多态性分析技术在枸杞道地药材鉴别中的应用[J]. 中医药研究, 2002, 18(3): 48-49.
- [8] DENG L Q, ZHANG K, HUANG K F, et al. RAPD analysis for genetic diversity of nineteen common and tartary buckwheat varieties [J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(1): 65-69.
- [9] MEI Z Q, LI C H, GONG S. RAPD Analysis of *Litchi chinensis* Sonn. from Different Origins of China [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(1): 64-67.
- [10] 思彬彬, 尚洁, 马艳辉. 枸杞叶片 DNA 不同提取方法比较[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 6872, 6875.
- [11] 王晓宇, 陈鸿平, 银玲, 等. 中国枸杞属植物资源概述[J]. 中药与临床研究, 2011, 2(5): 1-3, 50.
- [12] 胡裕清, 赵树进. RAPD 技术及其在植物研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(5): 74-77.
- [13] YIN X L, FANG K T, LIANG Y Z, et al. Assessing phylogenetic relationships of *Lycium* samples using RAPD and entropy theory [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(10): 1217-1224.
- [14] SI B B, WANG Z. Identification of No. 1 and Male Sterility of *Lycium barbarum* L. by ISSR - PCR Molecular Marker Technique [J]. Medicinal Plant, 2011, 2(3): 17-18.

(上接第 1448 页)

- [10] XU F, PALMER A E, YAVER D S, et al. Targeted Mutations in a *Trametes villosa* Laccase Axial perturbations of the T1 copper [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(18): 12372-12375.
- [11] AHN M Y, ZIMMERMAN A R, MARTÍNEZ C E, et al. Characteristics of *Trametes villosa* laccase adsorbed on aluminum hydroxide [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(1): 141-148.
- [12] 张田田, 沈明浩. PLACKETT - BURMAN 设计和响应面法优化火红密孔菌发酵产漆酶培养基[J]. 食品工业科技, 2011, 32(9): 223-226.

- [13] 马正飞, 殷翔. 数学计算方法与软件的工程应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 225-240.
- [14] NILADEVI K N, SUKUMARAN R K, JACOB N, et al. Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology [J]. Microbiological Research, 2009, 164(1): 105-113.
- [15] LIU L H, LIN Z W, ZHENG T, et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44(6/7): 426-433.