

不同地区主要栽培宁夏枸杞 品种的 RAPD 分析*

魏玉清^{1,2}, 许兴², 王璞¹

(1 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100094;

2 宁夏农科院 宁夏农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002)

[摘要] 利用 RAPD 分子标记技术, 从 400 条 10 碱基的随机引物中筛选出了 40 条适用于枸杞 RAPD 分析的引物, 选取其中 9 条引物对 10 份不同来源的宁夏枸杞材料进行了扩增, 检测了宁夏不同地区种植的宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 主栽品种和新育成的枸杞品系基因组 DNA 的多态性, 并对其遗传背景进行了初步分析。结果表明, 宁夏不同地区主要栽培的宁夏枸杞品种遗传上无明显差异, 但新品系大果枸杞与标准宁杞 1 号在基因组上有差异; 同时构建了主要推广品种宁杞 1 号的 RAPD 图谱。

[关键词] 宁夏枸杞; RAPD; 遗传多样性

[中图分类号] S567

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0091-05

RAPD analysis of *Lycium barbarum* L. cultivated in different areas of Ningxia

WEI Yu-qing^{1,2}, XU Xing², WANG Pu¹

(1 College of Agriculture and Biotechnology, China Agriculture University, Beijing 100094, China;

2 Ningxia Agricultural Biotechnology Key Laboratory, Ningxia Academy of Agriculture
and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002, China)

Abstract RAPD (random amplified polymorphic DNA) was used to appraise the genetic diversity of *Lycium barbarum* L. gathered from different areas of Ningxia. 40 oligonucleotide primers from 400 oligonucleotide primers were selected for the RAPD analysis. The 10 DNA samples from different places were amplified by 9 selected primers. The result indicates that there are no significant genetic differences among the 10 DNA samples, but the new bred material shows several different strips from the main variety Ningqi No. 1. A DNA fingerprint of Ningqi No. 1 was built by the RAPD techniques.

Key words: *Lycium barbarum* L.; RAPD; genetic diversity

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 系茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium*) 多年生落叶灌木^[1], 主要分布于西北地区的宁夏、新疆、内蒙等地。宁夏枸杞叶、花、籽和根均可入药, 据《本草纲目》中记载: “春采枸杞叶, 名天精草; 夏采花, 名长生草; 秋采子, 名枸杞子; 冬采根, 名地骨皮”^[2]。宁夏枸杞是我国重

要的药用植物资源和药食同源的名贵中药材, 具有增强免疫力、防衰老、抗肿瘤、抗氧化等多方面的药理作用^[3]。宁夏枸杞是惟一被载入《中国药典》的枸杞品种, 且中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局已对宁夏枸杞实施原产地域保护^[4]。宁夏枸杞市场需求量很大, 但来源混乱且真伪难辨, 以次充好

* [收稿日期] 2005-12-22

[基金项目] 宁夏自然科学基金重点项目 (zh01)

[作者简介] 魏玉清 (1969-), 男, 宁夏同心人, 副研究员, 在读博士, 主要从事药用植物栽培研究。E-mail: weiyuqing@126.com

[通讯作者] 王璞 (1957-), 男, 山西朔州人, 教授, 博士, 主要从事作物栽培与耕作学研究。

现象时常发生,严重影响了宁夏枸杞的声誉,并有可能危害患者身体健康。因此,迫切需要解决宁夏枸杞的品种鉴别问题。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性DNA)是建立在PCR基础上的一种分子标记方法^[5-6]。它利用一系列不同的随机排列的寡核苷酸链为引物,对所研究植物的基因组DNA进行PCR扩增,扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离,经溴化乙锭染色来检测产物DNA片段的多态性。主要用于不同亲缘物种间的分类、遗传距离、系统发育和亲缘关系等方面的研究。RAPD技术最适合于种下水平遗传型检测,包括野生天然居群的遗传结构分析、种质资源的评估、栽培植物品种的鉴定等,可用于鉴定中药正品及其混淆品和不同产地同种中药材。RAPD技术在枸杞上的应用研究较少,Cheng等^[7]以枸杞果实为材料对台湾市场上销售的商品枸杞进行了RAPD初步分析;Zhang等^[8]运用RAPD技术对收集的6种枸杞属植物样品进行分析,获得了枸杞属不同种的特异性DNA指纹图谱;李军等^[9]利用RAPD技术对

来自宁夏和内蒙古的枸杞进行了鉴定。宁夏枸杞为常异花授粉植物,上述研究由于受样品来源的限制,样品背景不详,缺乏标准对照样品,样品的代表性和结果准确性受到质疑,所用RAPD引物的多态性位点相对较少,但其方法有借鉴之处。

本研究以宁夏不同地区主要栽培宁夏枸杞品种的幼嫩叶片为材料,筛选适合宁夏枸杞RAPD分析的反应条件和引物,对不同地区栽培的宁夏枸杞基因组DNA进行RAPD分析,并构建了主栽品种枸杞1号的分子标记图谱,以期对宁夏枸杞品种的鉴定和保护以及宁夏枸杞的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 供试宁夏枸杞共10份,其来源代号见表1。在宁夏同心县、中宁县、银川市和惠农县等地区枸杞示范田中选取树龄一致的枸杞树3株,用消毒剪刀剪取嫩枝新叶20g,迅速放入便携式液氮罐中,冷冻保存,待用。

表1 宁夏枸杞的来源和代号

Table 1 Codes and sources of 10 *Lycium barbarum* samples in RAPD

代号 Code	来源 Sources	代号 Code	来源 Sources
A	同心县清水河 Qingshuihe of Tongxing county	F	中宁县田滩 Tiantan of Zhongning county
B	惠农县黄渠拐 Huangquguai of Huinong county	G	宁夏农科院生物室 Biotechnological center of NAAS
C	宁夏农科院园林场 Horticulture park of NAAS 1	H	标准枸杞 1 号 Standard Ningqi No. 1
D	宁夏农科院园林场 Horticulture park of NAAS 1	I	大果枸杞 0105(1) Daguogouqi 0105 1
E	中宁县舟塔 Zhouta of Zhongning county	J	大果枸杞 0105(2) Daguogouqi 0105 2

1.1.2 试剂 引物来自Operon公司(由上海生物工程公司合成);PCR扩增所用的Taq酶、dNTPs、Mg²⁺、10×Buffer,均为北京天为时代公司产品;电泳检测所用琼脂糖为上海生物工程公司进口分装。

1.2 枸杞基因组DNA提取

采用PATERSON方法^[10],并进行了部分修改优化。取冷冻保存的枸杞叶片5~7片放入研钵中,加液氮研磨成粉状,加入0.5mL(65℃)CTAB DNA裂解缓冲液(用前加入0.1%抗坏血酸,0.2%β巯基乙醇,调pH至8.0)。迅速混匀,65℃水浴40~50min;加入等体积的氯仿与异戊醇混合物(体积比24:1),慢慢混匀,4000r/min离心10min,抽提蛋白2次,然后抽取上清液至1.5mL离心管中,加入0.6倍体积的冰冻异丙醇,轻轻左右振荡至出现白色絮状沉淀,即为枸杞DNA,4000r/min离

心2min,除去上清液后加入0.5mL体积分数70%乙醇洗涤2~3次,用0.3mL无水乙醇脱水1次,自然风干5~8min;加入0.3mLTE溶液(10mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 0.01mol/L Na₂-EDTA, pH 8.0),-20℃保存待用。

1.3 引物筛选

在确定的RAPD扩增方案下,对400条10碱基的随机引物进行了筛选。先利用1个DNA样品对10碱基的随机引物进行初筛,对扩增出谱带且谱带清晰的引物可用于下一步复筛。共选取96个10碱基长度的寡核苷酸随机引物(由上海博亚生物技术公司合成),分别扩增2个DNA样品,从中筛选出扩增性强、重复性好的40个引物,用于宁夏枸杞样品基因组DNA的扩增。

1.4 PCR 扩增

基本反应体系: 10 倍反应缓冲液 2 μ L (100 mmol/L pH 8.3 Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 10~40 mmol/L MgCl₂, 0.01% Gelatin), Taq 聚合酶 1 U, dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各 100 μ mol/L, 引物 0.5 μ mol/L, DNA 模板 20 ng, 最后用超纯水补足至 20 μ L; 矿物油覆盖。在 PTC-200™ 扩增仪上进行 PCR 扩增。扩增反应条件为: 94 预变性 2 min; 预扩增程序 94 20 s, 36 30 s, 72 1 min, 4 个循环; 扩增程序 94 20 s, 40 30 s, 72 1 min, 38 个循环; 72 延伸 10 min; 最后在 4 保存。扩增产物经含有溴化乙锭的 1.2% 琼脂糖凝胶在 1×TBE 缓冲液中电泳分离, 最后在紫外灯下用 UVP 摄像系统拍照记录结果。

PCR 扩增模板 DNA 样品代号及来源见表 1,

不同地区宁夏枸杞品种 PCR 扩增的 9 个引物编号及序列见表 2, 宁杞 1 号 RA PD 图谱扩增的 29 个引物编号及序列见表 3。

表 2 不同地区宁夏枸杞所用引物

Table 2 Sequences of selected primers		
博亚编号 Biasia code	Operon 编号 Operon code	序列 5'3' Sequence 5'3'
BA 0001	B-01	GTTTCGCTCC
BA 0002	B-02	TGATCCCTGG
BA 0003	B-03	CATCCCCCTG
BA 0020	B-20	GGACCCCTTAC
BA 0320	X-20	CCCA GCTA GA
BA 0331	Z-11	CTCA GTCGCA
BA 0337	Z-17	CCTTCCCACT
BA 0345	J-O5	CTCCA TGGGG
BA 0347	J-07	CCTCTCGACA

表 3 宁杞 1 号 RA PD 图谱扩增的引物

Table 3 Codes and Sequences of selected primers

序号 No.	博亚编号 Biasia code	序列 5'3' Sequece 5'3'	序号 No.	博亚编号 Biasia code	序列 5'3' Sequece 5'3'
1	BA 0001	GTTTCGCTCC	16	BA 0037	GACCGCTTGT
2	BA 0004	GGACTGGAGT	17	BA 0038	AGGTGACCGT
3	BA 0005	TGCGCCCTTC	18	BA 0040	GTTGCGATCC
4	BA 0006	TGCTCTGCCC	19	BA 0041	ACCGCGAAGG
5	BA 0007	GGTGACGCA G	20	BA 0042	GGACCCAACC
6	BA 0008	GTCCACACGG	21	BA 0043	GTCGCCGTCA
7	BA 0011	GTA GACCCGT	22	BA 0046	ACCTGAACGG
8	BA 0012	CCTTGACGCA	23	BA 0053	GGGGTGACGA
9	BA 0013	TTCCCCCGCT	24	BA 0054	CTTCCCCAAG
10	BA 0018	CCACA GCA GT	25	BA 0056	AGGGCGTAAG
11	BA 0019	ACCCCGAAG	26	BA 0059	CTGGGGACTT
12	BA 0021	CAGGCCCTTC	27	BA 0060	ACCCGGTCAC
13	BA 0023	AGTCA GCCAC	28	BA 0071	AAA GCTGCGG
14	BA 0024	AATCGGGCTG	29	BA 0318	GACTAGGTGG
15	BA 0027	GAAACGGGTG			

2 结果与分析

2.1 不同地区宁夏枸杞品种的 RA PD 分析结果

RA PD 分析结果(图 1)显示, 同一引物对来自不同地区的宁夏枸杞 DNA 样品的扩增结果具有高度的同源性, 说明不同地区种植的宁夏枸杞品种在遗传基础上是一致的; 不同引物的扩增条带均不相同, 说明所选引物具有很好的多态性。

从图 1 可以看出, 大果枸杞除扩增出与宁夏其

他不同地区样品相同的条带外, 还扩增出与其他不同地区样品不同的带, 其中引物 BA 0002 对大果枸杞明显较其他地区样品多扩增出 1 条带(图 1 上部箭头所指), 引物 BA 0347 对大果枸杞明显较其他地区样品少扩增出 1 条带(图 1 下部箭头所指)。说明来源于不同地区的枸杞样品 A-G 与标准宁杞 1 号遗传上是同源的; 而新品系大果枸杞与标准宁杞 1 号在基因组 DNA 水平上有差异。

2.2 宁杞 1 号 RAPD 图谱

本研究筛选出了 40 条随机引物, 适合用于宁夏枸杞 RAPD 分析, 利用所筛选出的 29 条 10 碱基随

机引物对标准宁杞 1 号枸杞品种进行了扩增, 扩增图谱如图 2 所示(其引物代号和碱基序列见表 3)。

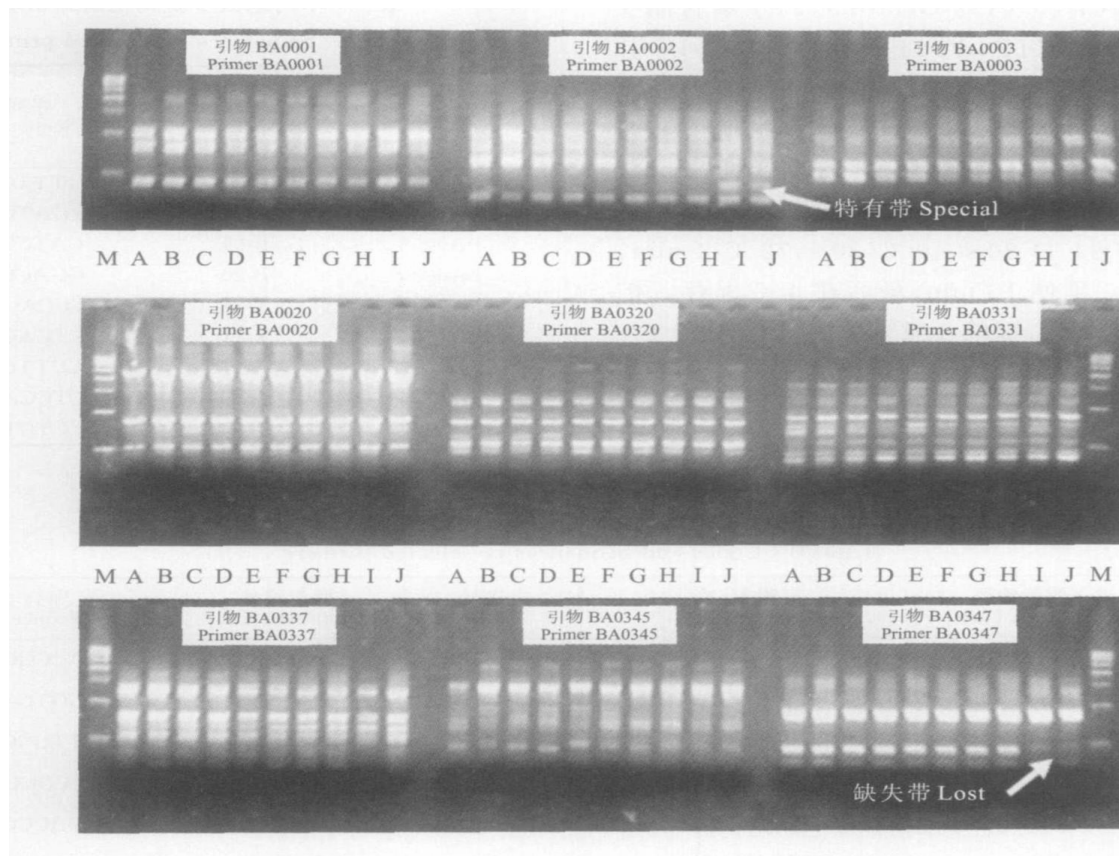


图 1 不同地区 10 个宁夏枸杞品种 DNA 样品的 RAPD 结果

M. M arker, 分子量分别为 500, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 3 500, 4 000; A ~ J. 为不同来源宁夏枸杞材料

Fig 1 *Lycium barbarum* L. RAPD patterns in different regions of Ningxia (9 primers, 10 DNA samples)

M. M arkers molecular weight 500, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000, 3 500, 4 000;

A - J. D ifferent sources of 10 *Lycium barbarum* L. samples

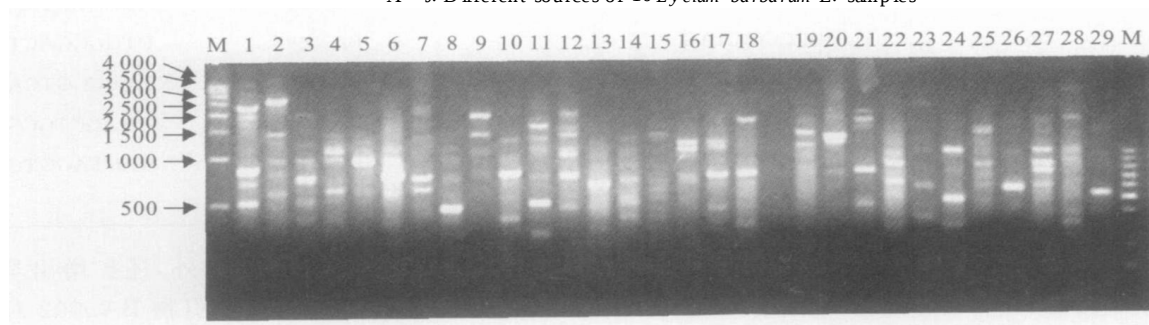


图 2 宁杞 1 号 RAPD 图谱(29 种引物)

M. M arker 分子量; 1~ 29 引物

Fig 2 RAPD patterns of *Lycium barbarum* L. variety: Ningqi No. 1 (29 primers)

M. M arker molecular weight; 1~ 29 Primers

3 讨 论

生产中调查发现, 宁夏不同地区生产的宁夏枸

杞存在很大的质量差别, 传统上认为中宁县生产的宁夏枸杞质量上乘, 最为地道。本研究利用 RAPD 技术对来自宁夏不同地区的宁夏枸杞材料和新育成

的枸杞新品系的遗传背景进行了初步分析, 结果显示: 宁夏不同地区种植的枸杞品种遗传基础是一致的, 并且与标准宁杞 1 号在遗传上具有高度的同源性, 说明宁夏枸杞质量差别的原因不是遗传差异造成的, 环境因素(气候、土壤等)是影响宁夏不同地区宁夏枸杞质量差别的主要原因。筛选出了 40 条适用于宁夏枸杞 RAPD 分析的引物, 构建了宁夏枸杞主要栽培品种宁杞 1 号的分子标记指纹图谱, 为在 DNA 水平上进行枸杞品种鉴定和保护研究奠定了基础。

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.) 属于常异花授粉植物, 天然异交率在 40% 以上^[3], 生产中主要采用扦插苗无性繁殖方式进行大量繁殖, 有利于品种特性的保持和优良品种的推广。Zheng 等^[7]、Zhang 等^[8]和李军等^[9]的研究中所采用的枸杞样品均为市场销售的商品枸杞果实, 其种子基因组 DNA 不能完全代表植株的基因组 DNA, 因此其研究结果的代表性有待商榷, 但其研究方法值得借鉴。本研究所用的宁夏枸杞试验材料均来源于宁夏不同市、县当地优质枸杞示范田枸杞新鲜叶片, 保证了取样的代表性和品种纯度, 这一点通过本试验的结果也得到了证实。大果枸杞是在宁杞 1 号的基础上新育成的品系, 其在植株形态、果实大小以及产量等各方面与宁杞 1 号有很大差别, 通过 RAPD 分子标记技术证明了二者在基因组 DNA 水平上的区别。

致谢: 北京市农林科学院蔬菜中心王建设研究员对本研

究给予了热心的指导和帮助, 在此表示诚挚的感谢!

[参考文献]

- [1] 赵可夫, 李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 268-271.
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 2111-4114.
- [3] 白寿宁. 宁夏枸杞研究[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1998: 63-65; 420-424; 520-523.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局公告(2004 年第 54 号)[N]. 中国质量报, 2004-05-28.
- [5] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [6] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 7213-7218.
- [7] Cheng Kur-ta, Chang Hsien-chang, Huang Her, et al. RAPD analysis of *Lycium barbarum* medicine in Taiwan market[J]. Bot Bull Acad Sin, 2000, 41: 11-14.
- [8] Zhang K Y B, Leung H W, Yeung H W, et al. Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA [J]. Planta Med, 2001, 67: 379-381.
- [9] 李 军, 郭晏海, 秦学梅, 等. DNA 随机扩增多态性在枸杞道地药材鉴别中的应用[J]. 中医药研究, 2002, 18(3): 48-49.
- [10] Paterson A H, Lander E S, Hewitt D J, et al. Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms[J]. Nature, 1998, 335: 721-726.