

DOI:10.11937/bfyy.201702023

枸杞种质遗传多样性 SCoT 分析

杨 辉¹, 周 旋², 王学琴¹, 康 磊¹, 梅 杰¹, 杨 剑¹

(1. 宁夏科技发展战略和信息研究所, 宁夏 银川 750001; 2. 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

摘 要:以 17 份枸杞种质为试材, 采用 SCoT 标记法, 分析了 17 份枸杞种质资源的遗传多样性, 以期枸杞种质资源的深度开发与利用提供参考。结果表明: 从 42 条引物中筛选出 7 条重复性好、条带清晰的引物进行 PCR 扩增, 共扩增出 32 条条带, 其中 30 条条带具有多态性, 多态性比率为 93.47%; UPGMA 聚类分析显示, 17 份枸杞种质间遗传相似系数在 0.30~1.00, 平均相似系数为 0.80, 在遗传相似系数为 0.72 时, 可将 17 份枸杞资源分成四大类。表明采用 SCoT 标记法能够揭示枸杞种质间的遗传多样性。

关键词:枸杞; SCoT; 遗传多样性

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0095-04

枸杞(*Lycium bararum* L.)是我国重要传统名贵植物, 该属在全球有 80 余种, 并离散分布于南美洲、北美洲、澳洲、欧亚大陆、太平洋岛屿和南非等地域。其中, 欧亚大陆约有 10 种, 主要分布在中亚; 非洲南部分布约 20 种; 北美洲南部约 20 种; 南美洲南部分布最多, 达 30 余种, 热带地区未发现分布^[1]。我

国有枸杞属的 7 个种 3 个变种, 其中宁夏枸杞和中国枸杞分布最广泛, 宁夏枸杞主要分布在我国西北地区, 中国枸杞主要分布在华东地区^[2]。近年来, 分子标记技术快速发展为研究枸杞种质资源基因型鉴定的有力工具。目前先后采用 RAPD^[3]、AFLP^[4-6]、ISSR^[6]、SSR^[7-9]和 SRAP^[10-12]等分子标记技术对部分枸杞种质的遗传多样性进行了评价, 而应用目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)标记技术对枸杞种质遗传多样性评价尚鲜见报道。

SCoT 标记技术是 COLLARD 等^[13]于 2009 年在水稻上开发一种类似 RAPD(随机引物扩增多态性)的基因型分子标记。与 RAPD 技术一样利用单

第一作者简介:杨辉(1983-), 男, 本科, 研究实习员, 现主要从事科技信息分析服务等工作。E-mail: yh_nxinfo@163.com.

责任作者:周旋(1984-), 女, 回族, 硕士, 助理研究员, 现主要从事枸杞栽培育种等研究工作。E-mail: 18695145633@163.com.

基金项目:国家科技基础条件建设资助项目(2015DT01)。

收稿日期:2016-09-26

Establishment and Optimization of ISSR-PCR System of *Pleurotus ostreatus* by PAGE Detection Technology

ZHANG Yunfeng, QU Anjiang, FU Xinmeng

(Department of Life Sciences, Tangshan Normal University, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: The separation efficiency of ISSR-PCR product was detected by agarose gel electrophoresis and different concentrations of polyacrylamide gel (PAGE) electrophoresis, with *Pleurotus ostreatus* 'Tangping 26' genomic DNA as template and with primers U836 as primer. The results showed that the separation of PAGE was significantly better compared to agarose gel. Main factors which had an influence on ISSR reaction system were optimized based on the PAGE detection technology, that the optimum ISSR-PCR reaction system was 20 μ L total volume including 20 ng template, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 0.8 μ mol \cdot L⁻¹ primer, 200 μ mol \cdot L⁻¹ dNTPs, 1.0 U *Taq* enzyme, 30 cycles of amplification.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; ISSR-PCR; PAGE

引物扩增,其引物设计的核心是依赖短的保守起始序列,在翻译的起始区,都有 ATG 序列的起始密码子,引物总长度 18 nt。以基因 5'起始区域为起点,扩增 2 个基因间区域,是一种新型的与目的基因紧密连锁的基因型分子标记。该标记具有易操作、成本低和多态性丰富等特点,能有效产生于目标性状相关联的分子标记,可以有效地利用该标记进行分子标记辅助育种。自 SCoT 标记技术发展以来,已广泛应用于种质资源遗传多样性研究、遗传图谱构建和指纹图谱构建等^[14-17]领域。

该试验在前人研究基础上,采用 SCoT 标记对 17 份枸杞种质资源进行遗传多样性评价,以期为枸杞种质资源深度的开发与利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

17 份枸杞种质采自宁夏农林科学院枸杞种质资源圃(表 1)。采摘枸杞幼嫩叶片,置于液氮罐带回实验室,于-80℃冰箱保存备用。

表 1 供试材料

编号 Code	种质名称 Name	引种来源 Origin
1	DMY	宁夏
2	XMY	宁夏
3	KQ-1	宁夏
4	KQ-2	宁夏
5	KQ-3	宁夏
6	KQ-4	宁夏
7	KQ-5	宁夏
8	KQ-6	宁夏
9	KQ-7	宁夏
10	NNQ	宁夏
11	MQ	宁夏
12	HGB	青海
13	NQC	宁夏
14	HG	青海
15	ZG	江苏
16	BF	河北
17	YNN	云南

表 2 SCoT 引物及多态性扩增结果

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	总条带数 Total number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 Percentage of polymorphic/%
SCoT5	CAACAATGGCTACACGA	6	6	100.0
SCoT25	ACCATGGCTACACCGGG	5	5	100.0
SCoT26	ACCATGGCTACACCGTC	3	2	66.7
SCoT33	CCATGGCTACACCGCAG	2	1	50.0
SCoT38	CAATGGCTACCACTAAG	6	6	100.0
SCoT39	CAATGGCTACCACTACAG	6	6	100.0
SCoT40	CAATGGCTACCACTAGCG	4	4	100.0
总计 Total		32	30	
平均 Average		4.57	4.29	93.47

1.2 试验方法

试验于 2015 年 7 月在国家枸杞工程技术研究中心枸杞功能基因实验室进行。

1.2.1 DNA 提取及检测 采用天根基因组试剂盒提取枸杞叶片基因组 DNA,使用 BioPhotometer 仪器检测 DNA 浓度和纯度,利用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量完整性,将 DNA 工作液浓度调至 100 ng·μL⁻¹,保存于-4℃冰箱用于后续 PCR 扩增试验。

1.2.2 SCoT-PCR 分析 SCoT 引物参照 COLLARD 等^[13]的方法,由上海捷瑞生物有限公司合成。PCR 扩增在 PTC-200 PCR 仪上进行。扩增体系总体积为 20 μL,其中含 10×PCR buffer(含 Mg²⁺)2.0 μL、50 ng 模板 DNA、0.3 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.7 μmol·L⁻¹引物和 1.0 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序是 94℃预变性 3 min;94℃变性 1 min,50℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,35 个循环;72℃延伸 5 min,4℃保存。扩增反应结束后加入 3 μL 的 6×DNA loading buffer 离心混匀,取 5 μL 扩增产物在 1.6%琼脂糖凝胶中电泳,电泳缓冲液为 1×TAE,经 EB 染色后用 AlphaInnotech 凝胶成像仪拍照。

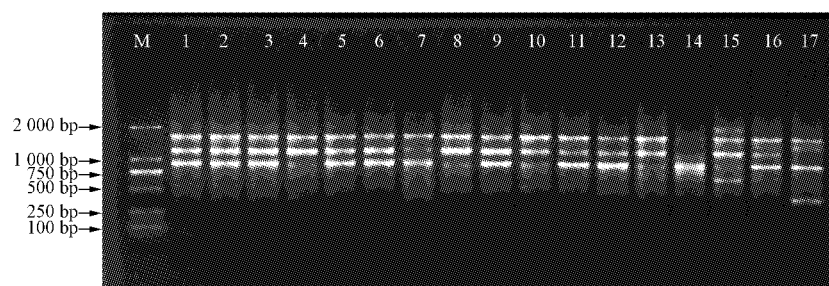
1.3 数据分析

SCoT 扩增产物按条带在相同迁移位置有带记为 1,无带记为 0,形成(0,1)二元数据矩阵。多态性比率(%)=多态性条带数/总条带数×100,利用 NTSYSpc-2.10 软件计算 17 份枸杞种质资源遗传相似系数。基于遗传相似系数,采用非加权组平均法(UPGMA)构建亲缘关系聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 SCoT 多态性分析

从 42 条引物中筛选出扩增条带清晰、多态性强的引物 7 条。这 7 条引物共扩增出 32 个 DNA 位点,其中 30 个位点具有多态性,平均多态位点比率为 93.47%(表 2)。不同引物扩增的多态性条带



注: M, DL2 000 Marker; 1~17, 供试材料。

Note: M, DL2 000 Marker; 1~17, Test materials.

图1 引物 SCoT38 扩增结果

Fig. 1 Amplification results of SCoT38 primers

1~6 条, 平均每个引物产生的多态性条带为 4.3 条。扩增片段长度介于 250~2 000 bp。引物 SCoT38 对 17 份种质资源扩增结果见图 1。

2.2 遗传相似系数分析

利用 NYSYS-pc 软件计算 17 份枸杞种质资源遗传相似系数为 0.30~1.00, 平均遗传相似系数为 0.80, 其中种质 DMY 与种质 XMY, 种质 KQ-1 与种质 DMY、XMY 遗传相似系数最大为 1.00, 说明它们之间亲缘关系较近; 种质 ZG 与 HG 的遗传相似系数最小为 0.30, 它们之间的亲缘关系最远。遗传相似系数在 0.72~1.00 所占比例最大为 73%, 说明供试枸杞种质遗传相似系数较高, 遗传基础比较狭窄, 这为今后对供试材料应用开发提供理论依据。

2.3 聚类分析

依据 SCoT 扩增所获得的 32 条 DNA 片段, 采用 Ntsys 计算遗传相似系数, 基于 UPGMA 法构建 17 份枸杞种质的分子系统树(图 2)。聚类图显示, 在遗传相似系数 0.72 的水平, 可以将 17 份枸杞种质分成四大类, 第一大类 A 组包括 13 份种质, 第二大类 B 组包括 2 份种质, 第三大类 C 组和第四大类 D 组各仅有 1 份种质。

3 讨论

SCoT 标记是一种基于翻译起始位点目标的新型分子标记技术, 扩增产生偏向候选功能基因区的显性多态性标记。多态性是分子标记遗传多样性评价的一个基本的指标。该研究从 42 条引物中筛选出 7 条具有多态性较高的引物, 平均多态率达到 93.47%, 利用这些引物能从部分种质材料中扩增出特异条带, 这些特征条带可以作为种质特征指纹图谱, 但是否与目标表型性状相关联, 还需进一步验证。

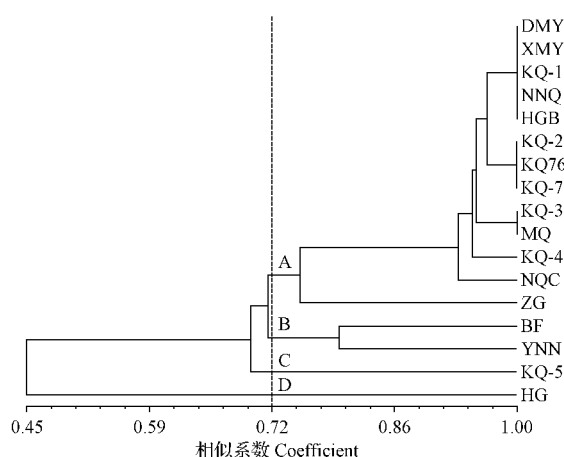


图2 17 份枸杞种质的 SCoT 聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of 17 wolfberry germplasm by SCoT molecular markers

分子标记技术是进行种质资源遗传多样性评价的有力工具, 而种质资源遗传多样性进行评价是种质资源遗传改良基础, 只有了解种质资源的亲缘关系及遗传变异信息, 才能对亲本选配提供理论指导。该研究的遗传相似系数及聚类分析表明, 供试种质间的遗传相似系数在 0.30~1.00, 而遗传相似系数大于 0.70 所占比例高达 73.%, 说明该研究枸杞种质遗传多样性较低, 其遗传基础较为狭窄。该结论与枸杞种质遗传多样性的 AFLP^[5]、SSR^[8] 分析结果相一致, 表明枸杞具有较高的遗传相似系数以及狭窄的遗传基础, 这正是枸杞育种工作所面临的问题。因此, 在进行枸杞新品种选育时, 应该发掘和利用新的优异枸杞种质资源, 拓宽枸杞的遗传基础, 从而提高枸杞种质资源利用率和扩大亲本选择范围。

参考文献

- [1] FUKUDA T, YOKOYAMA J, OHASHI H. Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): inferences from chloroplast DNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 19(2): 246-258.
- [2] 董静洲, 杨俊军, 王瑛. 我国枸杞属物种资源及国内外研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2020-2027.
- [3] CHENG K, CHANG H, HUANG H. RAPD analysis of *Lycium barbarum* medicine in Taiwan market[J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2000, 41(1): 11-14.
- [4] 李彦龙, 樊芸芳, 戴国礼, 等. 枸杞种质遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中草药, 2011, 42(4): 770-773.
- [5] 王锦楠, 陈进福, 陈武生, 等. 柴达木地区野生黑果枸杞种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物生态学报, 2015, 39(10): 1003-1011.
- [6] 阿力同·其米克, 王青锋, 杨春锋, 等. 新疆产药用植物黑果枸杞遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物科学学报, 2013, 31(5): 517-524.
- [7] ZHAO W G, CHUNG J W, CHO Y I, et al. Molecular genetic diversity and population structure in *Lycium* accessions using SSR markers[J]. C R Biol, 2010, 333(11-12): 793-800.
- [8] 胡秉芬, 张宝琳, 蔡国军, 等. 十七份中美枸杞材料的 SSR 遗传多样性[J]. 北方园艺, 2016(1): 90-94.
- [9] 邵千顺, 高磊, 南雄雄, 等. 利用 SSR 技术对十七份枸杞材料进行遗传多样性分析及标准指纹图谱构建[J]. 北方园艺, 2015(12): 91-95.
- [10] 尹跃, 曹有龙, 陈晓静, 等. 枸杞 SRAP 反应体系建立和优化[J]. 福建农林大学(自然科学版), 2013, 43(3): 297-301.
- [11] 安巍, 王亚军, 尹跃, 等. 枸杞种质资源的 SRAP 分析[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(6): 1234-1237.
- [12] LIU Z, SHU Q, WANG L, et al. Genetic diversity of the endangered and medically important *Lycium ruthenicum* Murr. revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 45: 86-97.
- [13] COLLARD B, DAVID J M. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2008, 27(1): 86-93.
- [14] BHATTACHARYA P, KUMARIA S, KUMAR S, et al. Start codon targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species[J]. Gene, 2013, 529(1): 21-26.
- [15] SATYA P, KARAN M, JANA S, et al. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species[J]. Meta Gene, 2015(3): 62-70.
- [16] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1651-1654.
- [17] 杨祥燕, 蔡元保, 黄秋伟, 等. 番木瓜主栽品种 SCoT 指纹图谱构建及遗传变异分析[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9): 1756-1761.

Genetic Diversity of Wolfberry Germplasm Based on SCoT Markers

YANG Hui¹, ZHOU Xuan², WANG Xueqin¹, KANG Lei¹, MEI Jie¹, YANG Jian¹

(1. Ningxia Science and Technology Development Strategy and Information Research Institute, Yinchuan, Ningxia 750001; 2. National Wolfberry Engineering Technology Research Center, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: Seventeen wolfberry germplasm resources were used as test materials, by using SCoT markers, the genetic diversity of 17 wolfberry germplasm resources was studied to provide reference for the further development and utilization of wolfberry germplasm resources. The results indicated that selected 7 reproducible and clear bands from 42 primers were amplified by PCR, a total of 32 bands were amplified, including 30 polymorphic bands, the polymorphic rate was 93.47%; the UPGMA cluster analysis showed that 17 genetic similarity coefficient of wolfberry germplasms was from 0.30 to 1.00, the average of the similarity coefficient was 0.80. When the genetic similarity coefficient was 0.72, the test materials could be divided into four categories. The genetic diversity of wolfberry germplasm could be revealed by SCoT markers.

Keywords: wolfberry; SCoT; genetic diversity