

铁皮石斛野生居群基于 RAMP 标记的遗传多样性评价

沈洁^{1,2}, 徐慧君¹, 袁英惠¹, 韩丽¹, 侯北伟¹, 丁小余^{1*}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046; 2. 连云港师范高等专科学校, 江苏 连云港 222000)

摘要: 本文运用 RAMP 标记 16 对引物组合, 对铁皮石斛 9 个野生居群的 112 个样本进行了检测, 共得到 123 条扩增带, 其中 86 条 (占 69.92%) 具有多态性, 每对引物组合可扩增出 3~8 条多态性带, 平均 5 条, 表明铁皮石斛不同居群间存在较丰富的遗传多样性; 铁皮石斛居群间遗传相似系数的变化范围为 0.250~0.813, 平均值为 0.550。利用 RAMP 扩增条带数据进行聚类分析, 可将 9 个铁皮石斛野生居群划分为 3 个类群, 聚类结果表现出较好的地域相关性, 显示 RAMP 标记可以有效地评价铁皮石斛野生居群的遗传多样性及遗传结构。

关键词: 铁皮石斛; 居群; 遗传多样性; RAMP

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 09-1156-05

Evaluation of genetic diversity of *Dendrobium officinale* wild populations based on RAMP markers

SHEN Jie^{1,2}, XU Hui-jun¹, YUAN Ying-hui¹, HAN Li¹, HOU Bei-wei¹, DING Xiao-yu^{1*}

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China;

2. Lianyungang Teachers College, Lianyungang 222000, China)

Abstract: Random amplified microsatellite polymorphism (RAMP) markers were used to access the genetic diversity among 112 samples of nine populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. Using 16 informative primers, 123 bands were amplified and 86 (69.92%) were polymorphic. The polymorphic bands from three to eight could be detected for each RAMP primer, with a mean of 5, indicating abundant genetic diversity among populations. Genetic similarity coefficients ranged from 0.250 to 0.813. UPGMA dendrogram illustrated 9 populations clustered into 3 groups, and the cluster pattern showed correlation with the locations of the *D. officinale* populations. These results were supported by the previous conclusions that were achieved by other molecular markers, and RAMP is proved to be effective for evaluating the genetic diversity of wild populations of *Dendrobium officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; population; genetic diversity; RAMP

RAMP (random amplified microsatellite polymorphism) 是一种建立在 PCR 基础上的 DNA 分子标记技术, 由 Wu 等^[1,2]于 1994 年提出并应用。与 SSR (simple sequence repeats) 相比^[3], RAMP 操作简单, 不

需克隆、测序来设计特殊双引物; 与 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 相比^[4], RAMP 更能真实反映品种间的亲缘关系, 且更适合遗传背景尚不太清楚的物种。RAMP 标记不仅被成功应用于蕺菜属 (*Houttuynia*)^[5]、仲彬草属 (*Kengyilia*)^[6]、赖草属 (*Leymu*)^[7]等属植物的遗传多样性研究, 还被应用于无花果 (*Ficus carica*)^[8]、海枣 (*Phoenix dactylifera*)^[9]、赤豆 (*Vigna angularis*)^[10]等栽培种种内的遗传多样性及遗传关系的研究以及植物资源的鉴定^[11,12]。

收稿日期: 2011-05-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870234); 国家基础人才培养基金资助项目 (J0730650); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2008431).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85891605, E-mail: dingxynj@263.net

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)

是我国兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 珍稀濒危特有种, 主要分布于云南、广西、广东、贵州、湖南、浙江、福建、江西等南方省份。铁皮石斛作为药材应用历史悠久, 在我国被列为“中华九大仙草”之首, 为《神农本草经》中的上品, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、抗癌防老等功效^[13, 14]。近年来, 由于铁皮石斛保健品和药品的开发, 致使铁皮石斛野生资源日趋匮乏, 铁皮石斛处于极度濒危状态^[15], 利用分子遗传标记研究其野生居群的遗传多样性和遗传结构, 直接关系到铁皮石斛保护策略能否得到正确的制定^[16, 17]。

鉴于铁皮石斛野生资源濒临灭绝, RAMP 技术尚未应用于铁皮石斛野生居群的遗传多样性分析, 本文拟采用 RAMP 技术, 对铁皮石斛野生居群进行遗传多样性及亲缘关系的分析, 为铁皮石斛野生资源的合理保护和可持续利用提供理论依据。

材料与方法

材料 本实验所用材料为 2006 年 9 月至 2007 年 12 月采自我国铁皮石斛主产区, 云南、广西等省区的原始森林及自然保护区, 共 9 个野生居群, 合计 112 个样本, 材料信息详见表 1。实验材料由丁小余教授鉴定, 保存于南京师范大学生命科学学院植物资源与环境研究所。

基因组 DNA 制备 取各居群硅胶干燥的叶片, 采用改良的 CTAB 法^[18]提取各样品的总 DNA。用紫外吸收法测定各样品 DNA 模板的浓度, 并将样品稀释至 25 ng·μL⁻¹用于 RAMP-PCR 分析。

引物筛选 利用 5'端锚定的低聚核苷酸 GC(CA)₄和 GT(CA)₄与 30 个十聚体随机引物组成 60 对引物组合对材料进行扩增筛选, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。从中筛选出扩增条带清晰的 16 对引物组合用于 9 个居群 DNA 样品的扩增(表 2)。

Table 1 Origin and sampling size of *Dendrobium officinale* used in the present study

Code	Sampling locality	Latitude	Longitude	Sample size
ZYD	Yandang of Zhejiang Province	28°21'59"	121°02'16"	15
JNF	Nanfeng of Jiangxi Province	27°13'53"	116°22'01"	12
GSG	Shaoguan of Guangdong Province	24°51'37"	113°14'12"	11
HCZ	Cenzhou of Hunan Province	25°37'19"	113°06'50"	12
GSD	Sandu of Guizhou Province	25°58'04"	107°26'52"	13
GTE	Tian'e of Guangxi Province	24°58'32"	107°06'43"	15
GLY	Leye of Guangxi Province	24°47'38"	106°33'31"	12
GXL	Xilin of Guangxi Province	24°35'18"	105°13'23"	12
YGN	Guangnan of Yunnan Province	24°05'58"	105°07'17"	10

Table 2 Primers combinations used for RAMP analysis

Primers combination	Primer sequence	Total band	Polymorphic band	Percentage of polymorphic bands/%
GC(CA) ₄ +S65	GC(CA) ₄ +GATGACCGCC	9	5	55.56
GC(CA) ₄ +S68	GC(CA) ₄ +TGGACCGGTG	7	4	57.14
GC(CA) ₄ +S94	GC(CA) ₄ +GGATGAGACC	8	5	62.5
GC(CA) ₄ +S103	GC(CA) ₄ +AGACGTCCAC	10	7	70
GC(CA) ₄ +S134	GC(CA) ₄ +TGCTGCAGGT	9	8	88.89
GC(CA) ₄ +S344	GC(CA) ₄ +CCGAACACGG	5	5	100
GC(CA) ₄ +S359	GC(CA) ₄ +GGACACCACT	7	5	71.43
GC(CA) ₄ +S366	GC(CA) ₄ +CACCTTTCCC	10	7	70
GC(CA) ₄ +S412	GC(CA) ₄ +GGGACGTTGG	11	8	72.73
GC(CA) ₄ +S436	GC(CA) ₄ +AAGCGACCTG	9	5	55.56
GT(CA) ₄ +S65	GT(CA) ₄ +GATGACCGCC	6	5	83.33
GT(CA) ₄ +S68	GT(CA) ₄ +TGGACCGGTG	10	6	60
GT(CA) ₄ +S94	GT(CA) ₄ +GGATGAGACC	4	3	75
GT(CA) ₄ +S96	GT(CA) ₄ +AGCGTCCTCC	7	5	71.43
GT(CA) ₄ +S412	GT(CA) ₄ +GGGACGTTGG	5	4	80
GT(CA) ₄ +S471	GT(CA) ₄ +AACGCGTCGG	6	4	66.67
Total		123	86	69.92
Mean		8	5	

RAMP-PCR 条件及程序 RAMP-PCR 扩增条件经过比较和优化最终确定为 25 μL 的反应体系: $1\times$ PCR buffer, $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GC(CA)₄ 或 GT(CA)₄ 引物, $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 随机引物, 25 ng DNA 模板和 1 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa)。PCR 程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 36~40 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 45 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

RAMP-PCR 产物鉴定 RAMP-PCR 产物检测参照 Wei 等^[5]的方法, 反应产物在含有 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶中以 $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电压电泳分离, 用 DL2000 的 DNA marker (TaKaRa) 作为分子量标记, 在 UVP GSD-8000 凝胶成像仪上观察并记录扩增条带。

数据处理 每个样品按照电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无进行统计, 电泳条带 (包括弱带) 存在时赋值为 “1”, 否则赋值为 “0”, 不清楚或模糊的条带忽略不计。在 NTSYS-PC (version 2.10s) 软件系统中, 按 Nei 和 Li^[19]的方法计算材料间遗传相似系数 (GS)。计算公式为: $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$, 其中 N_{ij} 为材料 i 和 j 共有的扩增片段数目, N_i (N_j) 为材料 i (j) 中出现的扩增片段数目。根据 GS 值按不加权成对群算术平均法 (unweighted pair group method with arithmetic means cluster analysis, UPGMA) 进行聚类分析^[20]。

结果

1 铁皮石斛居群 RAMP 多态性

随机选择铁皮石斛居群材料的 6 个样本对 60 对引物组合进行扩增筛选, 从中筛选出扩增产物清晰并呈现多态性的引物组合 16 对, 用于铁皮石斛 9 个居群材料的 RAMP 多态性检测 (部分扩增筛选结果见图 1), 扩增结果统计分析见表 2。9 个居群材料, 16 对 RAMP 引物组合共产生 123 条扩增带, 片段大小在 100~2 000 bp 之间, 每对引物组合扩增带变幅 4~11 条不等, 平均 8 条。123 条扩增带中, 具有多态性的扩增带有 86 条, 占 69.92%, 每对引物组合能扩增出 3~8 条多态性带, 平均 5 条。

2 铁皮石斛居群遗传相似性分析

根据 16 对 RAMP 引物组合对 9 个铁皮石斛居群材料总基因组 DNA 的扩增结果, 利用 NTSYS-pc (version 2.10s) 软件计算 9 个居群间的遗传相似系数 (GS 值), 结果见表 3。GS 值越大, 遗传相似程度越高, 遗传距离 ($GD = 1 - GS$) 越近。结果表明, 所有居群间的 GS 值的变化范围为 0.250~0.813, 平均值为 0.550。9 个居群材料中, JNF (江西南丰) 和 ZYD (浙江雁荡) 间以及 GLY (广西乐业) 和 GSD (贵州三都) 间的遗传相似性最高, 均达 0.813, 平均遗传距离最近。JNF 和 GSD 间的遗传相似性最低, 为 0.250, 平均遗传距离最远。

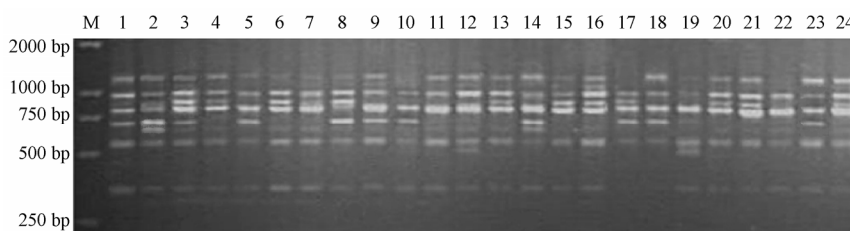


Figure 1 The amplification results of primer GC(CA)₄+S103. M: DNA marker; 1–15: Sample of population ZYD; 16–24: Sample of population JNF

Table 3 Genetic similarity (GS) values based on RAMP markers in different populations of *Dendrobium officinale*

	JNF	ZYD	GSG	HCZ	GLY	GSD	GTE	GXL	YGN
JNF	1.000								
ZYD	0.813	1.000							
GSG	0.625	0.688	1.000						
HCZ	0.563	0.625	0.688	1.000					
GLY	0.313	0.500	0.563	0.750	1.000				
GSD	0.250	0.313	0.500	0.688	0.813	1.000			
GTE	0.500	0.688	0.500	0.563	0.688	0.500	1.000		
GXL	0.625	0.563	0.500	0.438	0.438	0.625	0.375	1.000	
YGN	0.500	0.438	0.375	0.438	0.563	0.750	0.375	0.750	1.000

3 基于 RAMP 标记铁皮石斛居群的聚类分析

基于遗传相似系数, 利用 UPGMA 法对供试材料进行聚类分析, 结果显示, 利用 RAMP 标记能有效地划分铁皮石斛 9 个居群, 以所有材料间的平均遗传相似系数 0.55 为阈值, 可将供试材料划分为 3 个遗传类群——类群 I、II、III (图 2)。类群 I 包括 JNF (江西南丰)、ZYD (浙江雁荡山) 与 GSG (广东韶关) 3 个居群, 相似系数分布范围在 0.625~0.813; 类群 II 有 4 个居群, HCZ (湖南郴州)、GLY (广西乐业)、GSD (贵州三都) 与 GTE (广西天峨) 居群, 相似系数分布范围在 0.500~0.813, 说明这 4 个居群之间的遗传多态性很丰富; 来自广西西林的 GXL 和云南广南的 YGN 居群聚在一起, 构成类群 III, 遗传相似系数为 0.750。

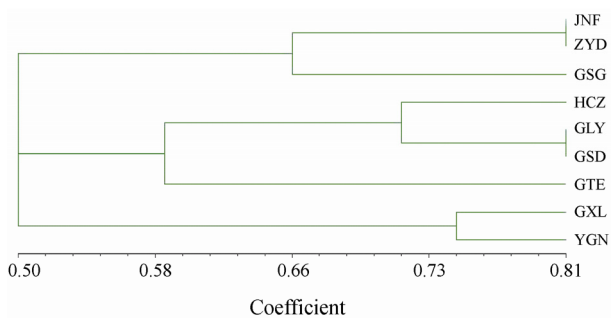


Figure 2 Dendrogram of cluster analysis based on RAMP data for populations of *Dendrobium officinale*

讨论

珍稀兰科药材铁皮石斛现已濒临灭绝, 其野生居群的遗传多样性一直是人们关注的焦点。作者曾利用 AFLP (amplified fragment length polymorphism)、SRAP (sequence related amplified polymorphism)、ISSR (inter-simple sequence repeats) 与 RAPD 标记研究了铁皮石斛野生居群的遗传多样性^[21-23], 为铁皮石斛野生资源的种质评价与保护提供了初步依据。本文则首次运用 RAMP 标记, 对铁皮石斛野生居群的遗传多样性进行研究。

RAMP 利用 5' 端锚定的与微卫星序列 (SSR) 互补的寡核苷酸和 RAPD 引物组合对基因组 DNA 中的微卫星进行随机扩增^[24], 是结合了 SSR 标记和 RAPD 标记两者优点而发展的一种新型分子标记技术。该技术不仅成本低廉、检测迅速, 且稳定性和可重复性强, 揭示的多态性高, 因此该技术已经被应用于植物种质资源检测和遗传多样性研究中。多种分子标记的联合应用, 彼此相互验证, 无疑能够更加客观地评价铁皮石斛野生资源的现状, 正确分析铁皮石

斛的遗传多样性水平, 有利于铁皮石斛野生居群保护策略的制定。

基于 RAMP 标记的遗传研究中, 多态性标记的概率差异较大。Chatti 等^[8]应用 RAMP 标记对无花果 (*Ficus carica*) 遗传多样性研究中仅仅获得了 45.65% 的多态性标记; 而 Rhouma 等^[9]对海枣 (*Phoenix dactylifera*)、Wei 等^[5]对蕺菜属 (*Houttuynia*)、Yang 等^[7]对赖草属 (*Leymus*) 的遗传多样性研究中分别获得 88.57%、97.70%、93.23% 的多态性标记不等。本研究利用 16 对 RAMP 引物组合对铁皮石斛野生居群进行 RAMP 分析, 总共获得 69.92% 的多态性标记, 并揭示了居群间的遗传差异, 说明 RAMP 标记能揭示铁皮石斛居群较高的遗传多态性, RAMP 标记是适合评估铁皮石斛遗传多样性的有效标记。

铁皮石斛 9 个居群根据 RAMP 遗传相似系数聚成 3 个类群, 且呈现地域相关性。江西南丰居群与浙江雁荡山居群聚为一支, 从地图上可以看到江西南丰与浙江雁荡山同处一个纬度, 地理位置毗邻。广东韶关居群与浙江、江西的居群聚为一类, 这 3 个居群分布地经度均较大, 分布于中国东南部。这与 Li 等^[21]利用 AFLP 分析铁皮石斛居群遗传结构的结果一致。

广西乐业、广西天峨、贵州三都及湖南郴州 4 个居群聚为一类, 其居群间的平均遗传距离随着居群间地理距离的增大而增加, 变化范围为 0.187~0.500, 类型变化比较丰富。地理上只有湖南郴州居群与其他 3 个居群相距较远, 这 4 个居群能够聚为一类的主要原因是它们所分布的 4 个地区的自然生态环境条件如海拔、年降水量、年平均气温、日照长度等相差不大。与 Ding 等^[22, 23]基于 SRAP、ISSR 和 RAPD 标记分析的结果相比, 广东韶关居群在遗传结构上与湖南郴州较近还是与东部的居群较近还有待进一步研究。

广西西林居群和云南广南居群分布于不同的省份, 但它们的平均遗传距离为 0.250, 亲缘关系较近。从地理位置上来看, 广西西林县位于广西西部, 与云南的广南县处于同一纬度, 相距仅 48.149 km。3 大类群之间, 西部的 2 个类群之间平均遗传距离较小, 亲缘关系较近。以上结果说明铁皮石斛根据 RAMP 标记划分的类群同地理分布有一定关系, 主要呈现东西分布的趋势。

遗传多样性的研究能够为植物种质资源的搜集、保存、评价和利用以及优异种质资源的创新提供重要的信息。本文利用筛选出的 16 对引物组合对 9 个铁皮石斛野生居群进行了 RAMP 研究, 获得了 69.92%

的多态性标记。结果表明, 铁皮石斛野生居群存在丰富的遗传变异, 在遗传结构上呈现东西两大组的分布趋势, 这与铁皮石斛自然繁殖能力较低、地理分布区域性、居群间基因交流少等因素有关。本文结论与作者前期运用其他分子标记得出的结果相吻合, 说明 RAMP 标记可以为铁皮石斛野生居群保护策略的制定提供理论依据。

References

- [1] Wu KS, Jones R, Danneberger L, et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 3257–3258.
- [2] Davila JA, Sanchez de la Hoz MP, Loarce Y, et al. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA coefficients of parentage to determine genetic relationships in barley [J]. *Genome*, 1998, 41: 477–486.
- [3] Xie ML, Hou BW, Han L, et al. Development of microsatellites of *Dendrobium officinale* and its application in purity identification of germplasm [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 667–672.
- [4] Ding G, Ding XY, Shen J, et al. Genetic diversity and molecular authentication of wide population of *Dendrobium officinale* by RAPD [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 1028–1032.
- [5] Wei W, Zheng YL, Li C, et al. Genetic diversity among the germplasm resources of the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAMP markers [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2005, 52: 473–482.
- [6] Zhang L, Zheng YL, Wei YM, et al. The genetic diversity and similarities among *Kengyilia* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP) [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2005, 52: 1011–1017.
- [7] Yang RW, Zhou YH, Zhang Y, et al. The genetic diversity among *Leymus* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP) [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2006, 53: 139–144.
- [8] Chatti K, Saddoud O, Salhi-Hannachi A, et al. Analysis of genetic diversity and relationships in a Tunisian fig (*Ficus carica*) germplasm collection by random amplified microsatellite polymorphisms [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49: 386–391.
- [9] Rhouma S, Dakhlaoui-Dkhil S, Salem AOM, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships in date-palms (*Phoenix dactylifera* L.) as assessed by random amplified microsatellite polymorphism markers (RAMPOs) [J]. *Sci Hortic*, 2008, 117: 53–57.
- [10] She YH, Rong TZ, Su SQ, et al. Genetic diversity analysis on the cultivated Adzuki bean germplasm resources using RAMP molecular markers [J]. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2006, 32: 217–222.
- [11] Sala F, Arencibia A, Castiglione S, et al. Somaclonal variation in transgenic plants [J]. *Acta Hort*, 2000, 530: 411–419.
- [12] Liu H, Yan GJ, Finnegan PM, et al. Development of DNA markers for hybrid identification in *Leucadendron* (proteaceae) [J]. *Sci Hortic*, 2007, 113: 376–382.
- [13] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典, 2000 年版) [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 70.
- [14] Jie ZH. Flora of China, Vol. 19 (中国植物志, 第十九卷) [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [15] Ding XY, Wang ZT, Xu LS. Study on sequence difference and SNP phenomenon of rDNA ITS region in F type and H type population of *Dendrobium officinale* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2002, 27: 85–89.
- [16] Amos W, Balmford A. When does conservation genetics matter [J]. *Heredity*, 2001, 87: 257–265.
- [17] Allendorf FW, Luikart G. Conservation and the Genetics of Populations [M]. Malden, MA: Blackwell Publishing Ltd, 2007.
- [18] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11–15.
- [19] Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979, 76: 5269–5273.
- [20] Rohlf FJ. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1 [M]. New York: Exeter Software, 2000.
- [21] Li X, Ding XY, Chu B, et al. Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP [J]. *Genetica*, 2008, 133: 159–166.
- [22] Ding G, Zhang DZ, Ding XY, et al. Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* based on SRAP analysis [J]. *Plant Syst Evol*, 2008, 276: 149–156.
- [23] Ding G, Li X, Ding XY, et al. Genetic diversity across natural populations of *Dendrobium officinale*, the endangered medicinal herb endemic to China, revealed by ISSR and RAPD markers [J]. *Russ J Genet*, 2009, 45: 375–382.
- [24] Wu KS, Tanksley SD. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice [J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 241: 225–235.