

一种鉴定菜用枸杞的新方法——nrDNA ITS 测序法

石志刚, 安巍, 焦恩宁, 赵建华, 王亚军 (宁夏枸杞工程技术研究中心, 宁夏银川 750002)

摘要 [目的]拟从分子水平对菜用枸杞进行鉴定。[方法]利用 nrDNA ITS(核糖体 DNA 基因内转录间隔区)碱基序列测定的方法对 5 份菜用枸杞资源进行碱基序列测定并分析序列差异。[结果]首次获得 5 种菜用枸杞 nrDNA ITS 区碱基序列, 整个 ITS 序列长度变异范围为 628~632 bp, 平均为 630 bp, 共有 79 个变异位点, 占 12.5%, 保守位点 553, 占 87.5%。基于 nrDNA ITS 序列差异的品种聚结果与依据形态指标的是划分结果相符。[结论]nrDNA ITS 区测序分析可作为分子水平鉴定菜用枸杞不同种质来源的又一途径。

关键词 枸杞属; ITS 序列; DNA 测序; 鉴定

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)-20-08486-02

An New Method of Identification on Edible *Lycium* Linn. Germplasm Resources——nrDNA ITS Sequencing

SHI Zhi-gang et al (Ningxia Wolfberry Engineering and Technology Research Center, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract [Objective] The study aimed to identify *Lycium* Linn. at molecular level. [Method] The nrDNA ITS sequence of 5 edible *Lycium* Linn. germplasm resources were investigated. [Result] The nrDNA ITS regions of five edible *Lycium* Linn. germplasm resources were sequenced. The whole sequences varied from 628 bp to 632 bp, with the average length of 630 bp. Total 79 variation sites were observed in the sequences, which accounts for 12.5%. [Conclusion] Sequence analysis based on nrDNA sequencing provides a new approach to identify edible *Lycium* Linn. germplasm resources.

Key words *Lycium* Linn.; ITS sequence; DNA sequencing; Identification

枸杞作为蔬菜利用已逾两千年^[1], 是一种营养丰富, 色香味俱佳的特色蔬菜。目前对菜用枸杞分类仅依据形态指标划分为大叶枸杞和细叶枸杞^[2]。ITS 区位于 rDNA 的 18S 和 26S rDNA 之间, 被 5.8S rDNA 分为 ITS1 和 ITS2, 是一段高度重复的序列片段, 且由于 ITS 区进化极快, 其差异可存在于单株之间^[3-5], 因此近年来已被国内外学者广泛用于鉴别同属植物相似种以及混淆种^[6]。但目前有关菜用枸杞 nrDNA ITS 的研究还未见报道, 仅对菜用枸杞的品种选育^[7]、配套栽培和主要生长特性及品质开展了研究。鉴于此, 笔者以 5 种菜用枸杞为试验材料, 开展其 nrDNA ITS 序列分析研究, 探索适宜于枸杞 nrDNA ITS 序列分析的优化技术体系, 从而为建立分子水平的菜用枸杞鉴定标准提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 收集保存于宁夏农林科学院枸杞中心枸杞

种质资源圃内的 5 个菜用枸杞种质。宁夏枸杞(宁杞 1 号小叶枸杞)、宁杞菜 1 号、中国枸杞(小叶枸杞)、北方枸杞变种、蔓生枸杞(大叶枸杞)。

1.2 试验方法 DNA 提取参照文献[8]的方法进行。nrDNA ITS 序列的扩增及克隆等操作见该研究组前期报道^[9]。然后根据测序结果进行 ITS 区变异信息分析, 并使用 MEGA4.0 软件对供试材料进行聚类。

2 结果与分析

2.1 菜用枸杞 ITS 区序列长度信息 测序得到 5 种菜用枸杞的 ITS 区碱基序列, 整个 ITS 序列长度变异范围为 628~632 bp, 平均为 630 bp; ITS1 序列长度变异范围为 250~253 bp, 平均为 251 bp; 5.8S 序列长度均为 154 bp; ITS2 序列长度变异范围为 224~225 bp, 平均为 225 bp。ITS 区和分区长度及 G+C 含量变异如表 1。

表 1 菜用枸杞不同种质的 ITS 区序列长度和 G+C 含量
Table 1 The length and (G+C) content of five edible *Lycium* Linn resources

| 名称 Name | ITS1 | | 5.8S | | ITS2 | | ITS | |
|---|------------------|----------|------------------|----------|------------------|----------|------------------|----------|
| | 长度//bp Length | (G+C)//% | 长度//bp Length | (G+C)//% | 长度//bp Length | (G+C)//% | 长度//bp Length | (G+C)//% |
| 宁杞 1 号 ^[9] Ningqi No. 1 | 252 | 68.3 | 154 | 55.8 | 225 | 69.3 | 631 | 65.6 |
| 宁杞菜 1 号 Ningqicai No. 1 | 253 | 69.1 | 154 | 55.8 | 225 | 68.9 | 632 | 65.8 |
| 中国枸杞 ^[9] Chinese wolfberry | 251 | 68.5 | 154 | 55.8 | 224 | 67.0 | 629 | 64.9 |
| 北方枸杞变种 ^[9] Northern wolfberry | 251 | 69.0 | 154 | 55.8 | 225 | 69.8 | 630 | 66.0 |
| 蔓生枸杞 Mansheng wolfberry | 250 | 59.6 | 154 | 52.6 | 224 | 62.1 | 628 | 58.8 |
| 平均值 Average | 251 | 66.9 | 154 | 55.2 | 225 | 67.4 | 630 | 64.2 |

2.2 菜用枸杞 ITS 区序列变异信息 测序得到 5 种菜用枸杞的 ITS 区碱基序列, 整个 ITS 区排序后的总长度为 632 bp, 其中 ITS1, 5.8S 和 ITS2 排序后的长度分别为 253、154 和 225

bp。将 gap(空位)作 missing(缺失)处理时, 共有 79 个变异位点, ITS1、5.8S 及 ITS2 区分别为 43、9 和 27 个, 占 12.5%; 保守位点 553, 占 87.5%; 59 个转换位点, 15 个颠换位点, 其中 ITS1 区的变异位点所占比例略高于 ITS2 区, 而 ITS2 区的转换/颠换比值高于 ITS1 区。5 种菜用枸杞 ITS 序列特征如表 2 所示。

基金项目 宁夏自然科学基金资助项目(NZ0769)。

作者简介 石志刚(1976-), 男, 宁夏贺兰人, 助理研究员, 从事枸杞种质资源与遗传改良研究。

收稿日期 2008-05-14

表 2 5 种菜用枸杞 ITS 区序列特征

Table 2 The characteristics of ITS sequences in five edible *Lycium* Linn resources

| 序列 | 保守位点//% | 变异位点//% | Si/sv |
|-----------------|----------------|---------------|-------|
| Sequence | Conserved site | Varied site | |
| ITS1 | 210/253 (83.0) | 43/253 (17.0) | 30/9 |
| 5.8S | 145/154 (94.2) | 9/154 (5.8) | 6/3 |
| ITS2 | 198/225 (88.0) | 27/225 (12.0) | 23/3 |
| 全长 Total length | 553/632 (87.5) | 79/632 (12.5) | 59/15 |

2.3 菜用枸杞亲缘关系分析 利用 MEGA4.0 分析软件对 5 种菜用枸杞的 ITS 区碱基序列进行聚类分析,结果见图 1。从聚类图中可以看出,各分支内部具有较高的自展支持率;“宁杞菜 1 号”是运用杂种培育得来的,“宁杞 1 号”(*L. barbarum*)是其亲本之一,该图很好地说明基于 ITS 序列分析可以比较亲缘关系的远近。表明基于 ITS 序列差异可对 5 种菜用枸杞进行划分,且划分结果与依据形态划分的大叶枸杞与细叶枸杞的结果相符。



图 1 基于 nrDNA ITS 区的菜用枸杞品种聚类图

Fig. 1 Phylogenetic tree among the edible *Lycium* Linn resources based on nrDNA ITS sequence

3 讨论

目前分子标记用于枸杞属植物研究的种类和数量都十

(上接第 8443 页)

节能力均为芽鞘调节能力最强,根次之,叶子最弱。而不耐盐品种沧麦 071 芽鞘渗透调节能力最强,叶次之,根最弱; H8706-34 则是芽鞘最强,根次之,叶子最弱。

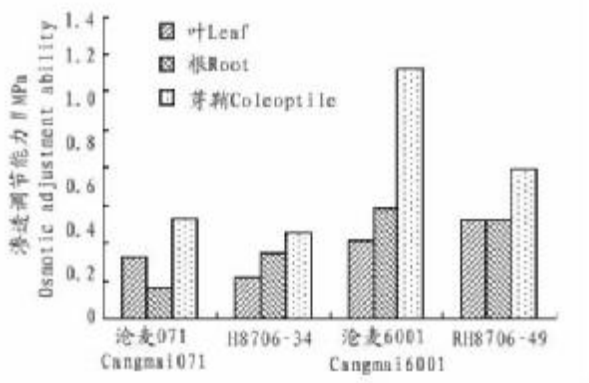


图 2 盐胁迫下不同小麦品种的渗透调节能力

Fig. 2 Osmotic adjustment ability of different wheat cultivars under salt stress

3 讨论

(1) 渗透调节是植物适应盐渍等胁迫的主要生理机制之一^[6-7]。在水分胁迫下,植物既要从小水势变低的介质中继续吸水以维持体内水分平衡,又要维持膨压基本不变来保证体内生理生化过程的正常运转,通过渗透调节主动降低渗透势是一种重要的调节方式。在高盐条件下,其根系吸水受阻。

分有限,尤其是在菜用枸杞品种的鉴定上更是如此。该文利用真核细胞中 18S, 5.8S, 28S rDNA 基因的保守区序列,自行设计引物成功扩增出整个 ITS 区,并完成了扩增产物的 DNA 碱基序列的测定,得到 5 个菜用枸杞种质材料 ITS 区的完整序列并成功鉴定出供试品种之间的差异。从聚类图中可以看出,各分支内部具有较高的自展支持率。该研究表明,基于 nrDNA ITS 区序列分析可作为分子水平鉴定菜用枸杞种质资源的又一途径。

参考文献

- [1] 安巍, 焦恩宁, 石志刚, 等. 枸杞规范化栽培及加工技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2005.
- [2] 孙虹. 两个菜用枸杞品种的生长特性及品质分析, 亚热带植物科学, 2005, 34(3): 27-29.
- [3] AINOUNCE M L, BAYER R. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): Insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. Genome, 1997, 40(5): 730-743.
- [4] Allice L A, Campbell C S. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences[J]. Amer J Bot, 1999, 86(1): 81-97.
- [5] AINOUCHE M L, BAYER R. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): Insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. Genome, 1997, 40: 730-743.
- [6] 汪小全, 洪德元. 植物分子系统学近五年的研究进展[J]. 植物分类学报, 1997(35): 465-480.
- [7] 李润淮, 石志刚, 安巍, 等. 菜用枸杞新品种宁杞菜 1 号[J]. 中国蔬菜, 2002(5): 48.
- [8] SCOTT O R, AMOLD J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues[J]. Plant Molecular Biology, 1985, 5: 69.
- [9] SHI Z G, AN W, FAN Y F, et al. Preliminary Studies on Identification of *Lycium* Linn. Germplasm Resources by nrDNA ITS Sequencing[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 35-38.

盐浓度越高,其根系吸水越难,会造成植物水分亏缺^[8-9]。该研究发现,盐处理条件下,4 个小麦品种的饱和渗透势均呈现下降趋势,且耐盐品种的下降幅度均高于敏盐品种,表明胁迫状态下,不同品种小麦均可通过降低渗透势来维持自身的需要,但耐盐品种的降低程度要明显高于不耐盐品种。

(2) 通常情况下,人们鉴定不同小麦品种的耐盐性强弱,多采用叶片进行饱和渗透势的测定^[10]。该研究发现,小麦的芽鞘同样具有一定的渗透调节能力,并且明显高于叶子的调节能力,所以,小麦芽鞘的渗透调节能力同样可作为耐盐鉴定的指标之一。

参考文献

- [1] 张宝泽, 赵可夫. 植物抗性生理研究[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1991: 7-14.
- [2] 陈德明. 盐渍环境中的植物耐盐性及其影响因素[J]. 土壤学进展, 1994, 22(5): 22-29.
- [3] 赵可夫. 中国盐渍土[M]. 北京: 科学出版社, 1993: 325-344.
- [4] 马东建. 几种盐生植物对盐胁迫反应的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2004.
- [5] 赵可夫. 植物抗盐生理[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993.
- [6] 朱志华. 耐盐性鉴定及其研究[M]// 庄巧生, 杜振华. 中国小麦育种研究进展. 北京: 中国农业出版社, 1996: 287-293.
- [7] 孙兰菊, 岳国峰, 王金霞, 等. 植物耐盐机制的研究进展[J]. 海洋科学, 2001, 25(4): 28-31.
- [8] 李树华, 许兴, 惠洪霞, 等. 不同小麦品种(系)对盐碱胁迫的生理及农艺性状反应[J]. 麦类作物学报, 2000, 20(4): 63-67.
- [9] 肖雯, 贾恢先, 蒲陆梅. 几种盐生植物抗盐生理指标的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(5): 818-825.
- [10] 黎裕. 植物抗旱育种及其进展[J]. 世界农业, 1984(3): 18-19.