

基于 nrDNA ITS 测序鉴定枸杞航天突变体的初步研究

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: 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, 对经过空间诱变在鲜果千粒重发生性状变异的 3 个枸杞材料进行碱基序列测定, 结果表明: 基于 ITS 可以明确 05-12-29, 05-12-02 两个突变体在 DNA 水平发生了突变, 而 05-14-01 在 ITS 序列上变异较小, 是否是航天突变体有待进一步的研究。

关键词: 枸杞属; ITS 序列; DNA 测序; 鉴定  
中图分类号: S 129; S 665.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)10-0150-03

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)是我国名贵的地道药材<sup>[1]</sup>, 目前由于品种单一、育种手段单一、种质创新发展缓慢等因素制约了枸杞产业持续协调发展<sup>[2]</sup>。航天育种是创造新种质资源和新品种的一种有效途径<sup>[3]</sup>, 研究证明了突变株系与原始品种间在 DNA 分子水平上确实存在明显的差异<sup>[4-5]</sup>。ITS 区位于 rDNA 的 18S 和 26S rDNA 之间, 被 5.8S 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, 存在科、属、种, 甚至株之间的差异<sup>[6,7]</sup>, 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<sup>[8]</sup>, 鉴于上述研究现状, 开展枸杞 nrDNA ITS 序列分析研究, 以寻找枸杞航天突变体的 ITS 序列差异作为切入点, 对探讨航天突变体是否与原始品种的遗传物质发生变化具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

宁夏农科院枸杞中心枸杞航天育种课题组选取“宁杞 1 号”种子, 于 2003 年 11 月 3 日通过搭载第 18 颗返回式科学与技术试验卫星, 经过 18 天的轨道运行安全返回, 经过地面选育, 现已发现 3 株鲜果千粒重达 800 g 以上, 优于“宁杞 1 号”, 将 3 份材料(05-12-29, 05-14-01, 05-12-02)与母本“宁杞 1 号”作为供试材料。

1.2 试验方法

采用 CTAB 法<sup>[9]</sup>进行 DNA 提取方法。采用自行设计的引物 P<sub>1</sub>: 5'-AACCTGCGGAAGGATCATTGTC'-3'和 P<sub>2</sub>: 5'-TGATATGCTTAAACTCAGCGGTA-3'对 ITS

进行 PCR 扩增, 包括 ITS1、5.8S rDNA、ITS2 和部分 28S rDNA 序列, 序列总长度应为 680 bp 左右; 然后对 PCR 产物纯化回收、克隆转化、DNA 测序(将含有目标片段的菌落, 用 LB 液体培养基培养, 每个材料选取 3 个菌落送往北京奥科公司测序)。

2 试验结果

利用 DNAMAN 将试验测得的 ITS 序列与 NCBI 数据库中已发表的 ITS 序列进行同源性比较, 分别确定出 ITS1、5.8S 及 ITS2 序列片段。运用 DNAMAN 软件对所测得的序列进行对位排列, 结果如图 1。

3 讨论

3.1 ITS 区序列长度和变异信息

不同航天突变体材料, 整个 ITS 序列长度变异范围为 623~631 bp, 平均为 629 bp。整个 ITS1 序列长度变异范围为 245~252 bp, 平均为 250 bp。整个 5.8SrDNA 序列长度变异范围都为 154 bp。整个 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。不同航天突变体植物 ITS 序列特征如表 2 所示。

表 1 不同航天突变体植物的 ITS 区序列长度和 G+C 含量

名称	学名	ITS1(bp) (G+C)%	5.8S(bp) (G+C)%	ITS2(bp) (G+C)%	ITS 区总长 (bp)(G+C)%
ningqi1	宁杞 1 号	252(68.3)	154(55.8)	225(69.3)	631(65.6)
05-12-02	航天突变体	245(64.1)	154(53.2)	224(60.7)	623(60.2)
05-12-29	航天突变体	251(68.6)	154(55.8)	225(69.8)	630(65.9)
05-14-01	航天突变体	252(68.6)	154(55.8)	225(69.3)	631(65.8)
Average for all		250(67.4)	154(55.2)	225(67.2)	629(64.4)

表 2 不同航天突变体植物的 ITS 区序列特征

sequence	Conserved sites/%	Variable sites/%	Si/sv
ITS1	226/252(89.7)	26/252(10.3)	20/1
ITS2	199/225(88.4)	26/225(11.6)	19/4
total	425/477(89.1)	52/504(10.3)	39/5

第一作者简介: 石志刚(1976-), 男, 宁夏贺兰人, 助理研究员, 研究方向为枸杞遗传育种与配套栽培。E-mail: shizhigang76@163.com.

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(NZ0769)。

收稿日期: 2008-04-28

ningqi1	CGAAACCTGCACAGCAGAACGACCGCGAAACGCGTTTCAACACTGGGGAGCCGCGCGGGCGGGGTGCTTCGGCCCC	75
05 12-02	----- . . . . . - t - - - - - g - - a - - - - - - - - - - - t - -	70
05 12-29	-----	75
05 14-01	-----	75
ningqi1	CCCGTGTGCGCGTCTCCCCCTCGTCCCCGCGCGCGCGCCCGCGCGCGCGTCGGGTGACTAACGAACCCCGGC	150
05 12-02	- t g - - - c - t - - - - - t . - - a - - - a - - - - - - t - - - c - - a - - - - a - - - -	143
05 12-29	- - - - - c - - - - - . - - - - - t -	149
05 14-01	-----	150
ningqi1	GCGAAAAGCGCCAAAGGAATACTTAAATTGATAGCCTGCCTCTCGCGCCCCGTCCGCGGTGCACGCGGGAGGGCCT	225
05 12-02	----- g - - - - - . - - - - - - - - - - - g - - - - - a - - -	217
05 12-29	-----	224
05 14-01	----- g - - - - -	225
ningqi1	GTGCTTCTCTTGAAC. AGAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAA	299
05 12-02	- c - t - - - - - t - a - - - t - - - - t - - - - a - - - - - - a - - - -	292
05 12-29	----- . -	298
05 14-01	----- . -	299
ningqi1	ATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATT	374
05 12-02	- c -	367
05 12-29	-----	373
05 14-01	-----	374
ningqi1	AGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCAAGCATCGCGTGCGCCCCCGCGCACCGCGGCCATGCTCTGGGTCGCG	449
05 12-02	- a - - - - - - - a - - - - - a - - a - - - . - t a - - - - - a . - - c t - - - t -	440
05 12-29	-----	448
05 14-01	-----	449
ningqi1	GTG. GTGTCGCGGGGCGGATACTGGCCTCCCGTGC GCCTCGCGCTCGCGGCCGGCCTAAATGCGAGTCCACGTCG	523
05 12-02	- - c a - - - - - t t a - - - - - t - - - - - - - - - t - - - - - t - - - - -	515
05 12-29	----- . -	522
05 14-01	----- . -	523
ningqi1	ACGGACGTCACGGCAAGTG GTGTTGTAAACCAACTCTCGAAGTGTGCTGGCCATACCCGTCGCGCGTTTG GCC	598
05 12-02	- - - - - t - - - - c - - - - - - - - - - - t - - - - t - - - - - - - - -	590
05 12-29	-----	597
05 14-01	-----	598
ningqi1	TCCCGGACCTTCTTGCGCTTAGGCGCTCCGAC	631
05 12-02	- - - a - - - - - - - - - - a - - - - t - - -	623
05 12-29	- - - - - c -	630
05 14-01	-----	631

图 1 序列对位排列图

整个 ITS 区排序后的总长度为 631 bp, 其中 ITS1、5.8S 和 ITS2 排序后的长度分别为 252 bp、154 bp 和 225 bp。将 gap(空位)作 missing(缺失)处理时, 由于 5.8S DNA 序列过于保守, 因而在研究中利用 ITS1 和 ITS2 区序列进行统计分析。整个转录间隔区(ITS1 十 ITS2)对位排列后总长度为 477 bp, 共有 52 个变异位点, 变异位点分别为 26 和 26 个, 占 10.3%; 保守位点 425 占 89.1%; 39 个转换位点, 5 个颠换位点, ITS1 区的转换/颠换比值高于 ITS2 区。

3.2 聚类分析

将对位排列后的序列导入 MEGA4.0, 用邻位相接法(NJ)进行聚类分析所得系统树为有根树, 聚类图见图 2。

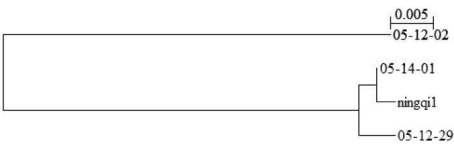


图 2 聚类图

### 3.3 基于 ITS 序列特征在航天突变体鉴别

05-12-29、05-14-01、05-12-02, 是“宁杞 1 号”经过卫星搭载, 通过地面选育, 在形态和结果性状上表现出一定变异特征的材料。基于 ITS 序列分析, 研究表明, 05-12-02 表现明显的变异, 05-12-29 变异程度居中, 05-14-01 基本与原始材料一致, 变异较小。因此, 基于 ITS 可以明确 05-12-29、05-12-02 两个突变体在 DNA 水平发生了突变, 而 05-14-01 突变体在 ITS 序列上变异较小, 是否是航天突变体有待进一步的研究。

### 4 结果

基于 nrDNA ITS 区序列差异能够作为鉴定航天突变体是否在 DNA 水平发生了变异的依据之一。

(致谢: 感谢中国林业科学研究院林业研究所卢孟柱研究员和王敏杰、赵树堂博士在技术及各方面的支持。)

#### 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] 曹有龙. 大果枸杞(宁杞 3 号)栽培技术[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 2006.
- [3] 王乃彦. 开展航天育种的科学研究工作, 为我国农业科学技术的发展做贡献[J]. 核农学报, 2002, 16(5): 257-260.
- [4] 李金国, 刘敏, 王培生, 等. 空间条件对番茄诱变作用及遗传的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2000, 13(2): 114-118.
- [5] Liu M, Zhang Z, Xue H, et al. Preliminary study on peroxidase isoenzyme detection and RAPD molecular verification for sweet pepper 87-2 carried by a recoverable satellite[J]. Acta Agriculturae Nuclatae Sinica, 1999, 13(5): 291-294.
- [6] Ainoune 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, 730-743.
- [7] Alice 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.
- [8] 汪小全. 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.
- [9] Scott O R, Arnold J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues[J]. Plant Molecular Biology, 1985(5): 69.

## Primary Study on Space Mutation of *Lycium Linn* Based on nrDNA ITS Sequences

SHI Zhi-gang, AN Wei, Jiao En-ning, ZHAO Jian-hua, WANG Ya-jun

(Ningxia Wolfberry Engineering and Technology Research Center, Yinchuan, Ningxia 750002, China)

**Abstract:** Study on the sequence of DNA of 3 *Lycium Linn* materials which were induced to change through space, and the thousand grains weight of fresh fruit of which was variation, in the nrDNA ITS. The results showed that two mutation bodies (05-12-29 and 05-12-02) distinctly took place mutate in the level, but the variation of mutation body (05-14-01) was smaller in the ITS sequence, whether was a space mutation body need a further research.

**Key words:** *Lycium Linn*; Internal transcribed spacer; Measure the sequence of DNA; Identification

## 《山西果树》2009 年征订启事

《山西果树》是由山西省农业科学院主管、山西省农业科学院果树研究所主办的综合性果树科技期刊, 被中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)、中国期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中文科技期刊数据库、北京龙源网等多个数据库收录。本刊主要设有试验研究、经验技术、调查建议、综论指导、来稿摘登、报刊摘引、咨询服务、国外果树科技、信息与广告等栏目, 主要报道果树科研新成果, 交流果树先进实用的管理经验与技术, 普及果树科学知识, 提供果树科技信息服务等, 内容丰富, 科学实用, 信息量大, 发行范围广。读者对象为广大农林院校师生、果树工作者及果农。本刊为双月刊, 16 开本, 64 页, 每逢单月 10 日出版, 每册定价 4.00 元, 全年 6 册共 24.00 元。国内外公开发行人, 全国各地邮政局均可订阅, 邮发代号 22-17; 漏订者可直接汇款《山西果树》编辑部订阅, 免费邮寄, 需挂号者每寄 1 次另加挂号费 3.00 元, 统一订 6 套以上者免收挂号费。

本刊地址: 山西省太谷县省果树研究所 邮编: 030815

电话: 0354-6215005(兼传真)、6215114 电子信箱: sxgszszs@163.com sxgsbjb@public.yz.sx.cn