

利用 nrDNA ITS 探讨雄性不育“YX-1”与宁夏枸杞的亲缘关系

石志刚, 安巍, 曹有龙

(宁夏枸杞工程技术研究中心 宁夏 银川 750002)

摘 要: 采用改进 CTAB 法提取枸杞叶片 DNA, 利用合成的特异引物对其 DNA 中 nrDNA ITS 区进行扩增、克隆, 对目的片段测序分析。利用 nrDNA ITS(核糖体 DNA 基因内转录间隔区)序列, 探讨枸杞雄性不育材料“YX-1”与其它 7 份宁夏枸杞材料的亲缘关系。结果表明: 首次测序得到了枸杞雄性不育材料和其它 7 份枸杞种质的 nrDNA ITS 区碱基序列, 整个 ITS 序列长度变异范围为 559~633 bp, 平均为 612 bp, 初步从基于 ITS 序列得出的 NJ 聚类图可以判断枸杞雄性不育“YX-1”在 DNA 水平与其他 7 个枸杞品种存在差异, 其与四倍体 88024 亲缘关系较近。基于 nrDNA ITS 区序列分析可作为探讨枸杞雄性不育材料“YX-1”亲缘关系的一种新方法。

关键词: 枸杞属; ITS 序列; DNA 测序; 鉴定

中图分类号: S 665.903.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0001-03

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)是我国名贵道地药材^[1,2], YX-1 是枸杞雄性不育种质个体^[3], 由于道地药材与非道地药材常有相同的基原或为近缘, 使得它们在外在形态、习性、组织构造以及所含的化学成分方面具有高度的相似性, 传统的鉴定方法已难以准确鉴别。ITS 区序列指 DNA 基因的内转录间隔区序列, 包括 ITS1、5.8S 及 ITS2 3 个区段。该序列不出现在成熟核糖体中, 自然选择压力较小, 因此能累积更多变异, 从而能更好的鉴别亲缘关系很近的物种。利用 ITS 区序列测定鉴定道地药材应用较多, 能够鉴别同属植物相似种以及药用植物混淆种^[4-6]。目前已有的试验仅对 YX-1 的生殖发育进行了研究, 传统的细胞学鉴定方法已难以准确对其遗传背景进行分析, 有关枸杞 nrDNA ITS 的研究也未见报道。因此, 现开展枸杞 nrDNA ITS 序列分析研究, 以寻找雄性不育种质个体“YX-1”与枸杞主要种质材料的 ITS 序列差异作为切入点, 探讨“YX-1”的遗传背景, 为从分子水平鉴定枸杞雄性不育材料的亲缘关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以收集保存在宁夏农林科学院枸杞中心枸杞种质资源圃内的 7 份枸杞种质(宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 2

1 号、大麻叶、小麻叶、88028、88024)和 1 份枸杞雄性不育材料“YX-1”为试材。

1.2 试验方法

采用 CTAB 法^[7]进行枸杞叶片 DNA 提取方法。依据 GenBank 数据库中已发表的茄科植物 nrDNA ITS 序列, 自行设计如下引物: P1(5'-AACCTGCGGAAGGATCATGTGC'-3'), P2(5'-TGATATGCTTAACTCAGCGGTA-3'), 以上述引物对 8 个供试材料的基因组 DNA 基因 PCR 扩增, 扩增体系为: 2.5 μ L 10 \times PCR buffer (Mg^{2+}), 0.5 μ L dNTPs (2.5 μ M each), P1 和 P2 (20 μ M each)各 1 μ L, Taq 酶 1.5 U, 模板 DNA 50 ng, 加双蒸水补足 25 μ L。PCR 反应程序为: ①95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; ②95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s(退火温度可在 58~60 $^{\circ}$ C 之间调节), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 36 次循环; ③72 $^{\circ}$ C 保温 7 min; ④4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 胶回收试剂盒(购于北京博大生物技术有限公司产品)对约 650 bp 的目标条带进行回收。将回收产物连接于 T 载体(pGEM-T), 转入大肠杆菌 DH5 α (购自北京天为时代科技有限公司), 采用蓝白斑法筛选阳性菌落。对阳性菌落进行 PCR 检测后送往北京奥科公司和北京六合通经贸有限公司测序, 将所获得的 ITS 序列数据, 利用 DNAMAN 在 NCBI 数据库中与已发表的 ITS 序列进行同源性比对并对不同材料的 ITS 序列进行对位排列, 利用 MEGA4.0 分析软件对 8 种枸杞材料的 ITS 区碱基序列进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ITS 区序列长度和变异信息

第一作者简介: 石志刚(1976-), 男, 本科, 助理研究员, 研究方向为枸杞遗传育种与配套栽培。E-mail: shizhigang 76@163.com。

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2006BA09B01-5)。

收稿日期: 2008-10-25

枸杞雄性不育材料“YX-1”及其它 7 个枸杞种质, 整个 ITS 序列长度变异范围为 559 ~ 633 bp, 平均为 612 bp。ITS1 序列长度变异范围为 198 ~ 254 bp, 平均为 237 bp; 5.8 S 序列长度都为 154 bp; ITS2 序列长度变异范围为 207 ~ 225 bp, 平均为 221 bp。ITS 区和分区长度及G+C 含量如表 1。

表 1 8 份枸杞种质的 ITS 区序列长度和 G+C 含量

Table 1 Lengths and G+C content of ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 of 8 <i>Lycium</i>				
名称 Name	ITS1	5.8S	ITS2	ITS 区总长
宁杞 1 号 Ningqi No1	252(68.3)	154(55.8)	225(69.3)	631 (65.6)
宁杞菜 1 号 Ningqicai No1	253(69.1)	154(55.8)	225(68.9)	632(65.8)
大麻叶 Damaye	252(68.6)	154(55.8)	225(69.3)	631(65.8)
宁杞 2 号 Ningqi No2	198(55.6)	154(51.3)	207(58)	559(55.3)
小麻叶 Xiaomaye	250(67.6)	154(55.8)	225(69.8)	629(65.5)
YX-1	241(66.4)	154(55.8)	225(68.9)	620(64.7)
88028	198(55.6)	154(51.3)	207(58)	559(55.3)
88024	254(69.3)	154(55.8)	225(69.3)	633(66)
平均 Average for all	237(65.1)	154(54.7)	221(66.4)	612(63.0)

注: 括号内为 G+C 含量。Note: G+C content in brackets.

ITS 排序后的总长度为 633 bp, 其中 ITS1, 5.8 S 和 ITS2 排序后的长度分别为 254、154 和 225 bp。将 gap (空位)作 missing(缺失)处理时。经过序列比对后, 共有 160 个变异位点, 变异位点分别为 100 和 46 个, 占 25.3%; 保守位点 473, 占 74.7%; 67 个转换位点, 31 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。8 种枸杞 ITS 序列特征如表 3。

表 2 8 份枸杞 ITS 区序列特征

Table 2 The charater of ITS sequence of 8 <i>Lycium</i>			
序列 Sequence	保守位点 Conserved sites / %	可变异点 Variable sites / %	比值 Si/ sv
ITS1	154/ 254(60.6)	100/ 254 (39.4)	37/ 19
5.8S	140/ 154(90.9)	14/ 154(9.1)	6/ 8
ITS2	179/ 225(79.6)	46/ 225(20.4)	24/ 4
total	473/ 633 (74.7)	160/ 633(25.3)	67/ 31

Note: Gap(空位)作 missing(缺失)处理 Conserved site 保守位点; Variable site; 变异位点; Si: Number of transitional pair; 转换; Sv: number of transversional pair; 颠换。

2.2 枸杞种质材料亲缘关系分析

由图 1 可知, 从聚类图中可以看出枸杞雄性不育材料“YX-1”与其它 7 个枸杞品种的亲缘关系和差别。

基于 ITS 序列得出的 NJ 聚类图表明, 枸杞雄性不育种质个体“YX-1”与其它 7 份枸杞种质材料具有明显差异。宁杞 1 号、大麻叶、小麻叶作为一个类群聚在一起, 尤其是基于 ITS 序列分析表明宁杞 1 号、大麻叶在 NJ 树中经过 1 000 次比对自展支持率达到 98%, 很好地说明“宁杞 1 号”是从传统宁夏枸杞种大麻叶优系中选优得来的事实, 说明 ITS 序列是揭示枸杞遗传背景的有效手段之一。同时基于 ITS 序列研究表明, “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, 很好地说明基于 ITS 序列分析可以比较亲缘关系的远近。基于 ITS 序列分析, “YX-1”与“宁杞 1 号”、“宁杞 2 号”ITS 序列差异较为明显, 与 88024 亲缘关系较近, 88024 是人工培育得来的四倍体, 因此有必要对“YX-1”的遗传背景和倍性做一研究, 同时枸杞雄性不育种质个体“YX-1”在鲜果干粒重方面比主栽品种“宁杞 1 号”大, 是一个较好的育种材料, 对雄性不育材料进行鉴定, 有利于揭示“YX-1”的亲缘关系和遗传背景。

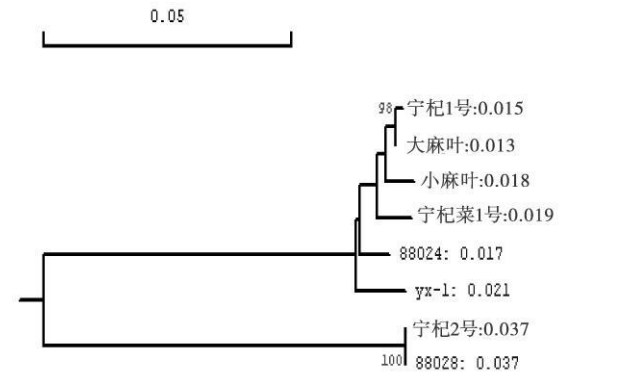


图 1 NJ 聚类图

Fig. 1 NJ Tree

No. of Taxa: 8; Gap/Missing data: Pairwise Deletion; Codon Positions: Noncoding; Distance method: Nucleotide; Kimura 2-parameter (pairwise distance); Tree making method: Neighbor joining; No. of site: 464; No. of Bootstrap replication= 1 000; SBI= 0.17116118.

3 讨论

虽然 DNA 分子标记技术在枸杞属植物鉴定等方面已有一些报道^[8,9], 主要是应用 RAPD 技术进行枸杞的鉴定, 目前分子标记用于枸杞属植物研究的种类和数量都十分有限, 尤其是还未对雄性不育材料“YX-1”进行分子生物学的鉴定。该试验利用真核细胞中 18Sr, 5.8S, 28Sr RNA 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 8 份枸杞种质材料 ITS 区的完整序列。目前枸杞属植物基因组序列绝大多数没有测定, 国内也未见报道。枸杞 nrDNA ITS 区的扩增和测序有望成为新的应用分子生物学技术鉴定品种的途径之一。

由图 1 可知, 各分支内部具有较高的自展支持率, 同时基于 ITS 序列研究表明, “宁杞 1 号”与“大麻叶”亲缘关系较近, 揭示了“宁杞 1 号”是从大麻叶群体中选优得来的事实, 很好地说明基于 ITS 序列分析可以比较亲缘关系的远近。因此, 依据 ITS 序列差异可以鉴别雄性不育材料与其它 7 份枸杞种质材料的差异, 对于揭示雄性不育材料的遗传背景有一定的借鉴, 同时研究表明基于 nrDNA ITS 区序列分析可作为分子水平鉴定雄性不

育材料“YX-1”与其它枸杞种质亲缘关系的一种新方法。

(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] 匡可任, 路安民. 中国植物志(茄科)[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 67 (1): 8-18.
- [2] 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: 5-8.
- [3] 秦垦 田英 李云翔 等. 宁夏枸杞雄性不育种质个体 YX-1 的发现与鉴定[J]. 西北植物学报, 2006, 26(9): 1838-1841.
- [4] Ainoune M L, Bayer R. On the origins of the tetraploid *B. romus* species (section *B. romus*, Poaceae); insights from internal transcribed spacer se-

quences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Genome*, 1997; 730-743.

[5] Allie 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.

[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] 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.

[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.

[9] Cheng K T, Chang H C, Huang H, et al. RAPD analysis of *Lycium-bararum* medicine in Taiwan market [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 2000, 41: 11.

Study on the Genetic Relationships of Male Sterility in *Lycium linn* and *Lycium barbarum* L. by nrDNA ITS Sequence

SHI Zhi-gang, AN Wei, CAO You-long

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

Abstract: Genomic DNA from wolfberry leaves extracted by modified CTAB method were regarded as templates for PCR amplification by synthetic specific primer, cloning and sequencing. The nrDNA ITS sequence of male sterility “YX-1” and other 7 *Lycium barbarum* L. measured in *Lycium Linn* were investigated. The study aimed to identify the genetic relationships of Male sterility in *Lycium linn*. and *Lycium barbarum* L. Result showed that the nrDNA ITS sequence of male sterility “YX-1” and other 7 germplasms measured in *Lycium Linn* was gained for the first time, the variation length of the whole ITS sequence was 559 to 633 bp and average of 612 bp, based on nrDNA ITS sequence, male sterility “YX-1” of *Lycium Linn*. had difference with other 7 *Lycium barbarum* L., genetic relationships were closer to 88024, a tetraploid on molecule level, the ITS sequence may be one proach to determine the germplasm in *Lycium Linn*. Sequence analysis based on nrDNA sequencing provided a new approach to identify the genetic relationships of Male sterility in *Lycium Linn*. and *Lycium barbarum* L.

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

纳米技术将广泛运用于农业

纳米技术是一项在微观领域进行的工程技术,有可能用于设计通过杀死细菌或阻止氧气穿透来阻止食物和饮水的塑料包装被污染;也可能被用来保存食物营养;农民也能利用该技术确保肥料在正确的时间缓慢释放;还可以用来探测害虫或污染物。

纳米技术正在逐渐被视为食品领域的转基因(GM)技术的“接班

人”。虽然纳米技术仍处在初级阶段,但已经开始走向实用化,包括可以阻止二氧化碳从瓶中泄漏,用纳米粒子制造的瓶子;用微小的银粒子制成的储物罐,它具有抗菌特性,可以杀死其间出现的任何细菌等。

在美国,也有人正在测试研发用于追踪农业动物的“纳米传感器”,以便在流行疾病危害整个动物之前探测到疾病。

然而,这项技术仍然很有争议,环保主义者认为其对人体健康的影响目前还处于未知状态,纳米技术食物需要在英国获得授权。英国皇家环境污染委员会最近得出结论说,没有证据表明纳米技术危害人类健康,但英国政府仍在持续资助相关研究,以解答纳米技术对环境或健康有何影响的问题。