

石志刚,马婷慧,万 如,等. 基于 ITS 条形码序列早期筛选枸杞种内杂交种[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):138-139.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.035

基于 ITS 条形码序列早期筛选枸杞种内杂交种

石志刚,马婷慧,万 如,李彦龙,王亚军
(宁夏农林科学院,宁夏银川 750002)

摘要:利用核糖体内转录间隔区(ITS)条形码序列,对枸杞杂交育种种内杂交种进行早期筛选研究。采用改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取枸杞叶片 DNA,利用合成的特异引物对其 DNA 中的 nrDNA ITS 区进行扩增、克隆,对目的片段进行测序分析。结果表明:以宁夏枸杞种内的品种宁杞 1 号、宁杞 2 号、白花枸杞作为父母本,选配杂交组合,基于 ITS 条形码序列对其种内杂交育种产生的杂交后代进行聚类分析,分析杂交后代与父母本的亲缘关系与差异,对其杂交后代进行早期筛选。由结果可知,基于 ITS 条形码序列可以作为早期筛选杂交育种后代的方法之一,对建立分子标记辅助育种技术、缩短育种周期具有重要意义。

关键词:枸杞属;ITS 序列;DNA 测序;筛选;杂交育种

中图分类号: S337;S567.1⁺90.351 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)06-0138-02

枸杞是我国重要的“药食同源”功能型特色植物资源,经济、生态、社会效益显著^[1]。宁夏是枸杞的原产地和主产区,截至 2015 年年底,宁夏枸杞种植规模达到 5.71 万 hm²,占全国种植总面积的 42.5%;枸杞干果产量 13 万 t,占全国总产量的 48%;年出口量 6 500 t,出口额 7 000 万美元,占全国出口量的 65%,出口额的 58%;枸杞生产总值突破 50 亿元。宁夏地区自 20 世纪 60 年代就已经开展枸杞新品种育种工作,目前宁夏农林科学院自主选育出宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号、宁杞 5 号、宁杞 6 号、宁杞 7 号、宁农杞 9 号等 10 余个新品种,国内科技工作者也选育出柴杞 1 号、蒙杞 1 号、精杞 1 号等新品种。但是枸杞育种在整体上与其他作物育种相比,还存在许多不足和缺陷,主要体现在以下几点:(1)实用生产型品种相对偏少,在生产中大面积推广应用的品种仅有宁杞 1 号、宁杞 4 号、宁杞 5 号和宁杞 7 号等 4 个新品种,并且其用途相对单一,不能很好地适应枸杞产业多元化发展的方向;(2)育种手段相对单一,育种周期长、速度慢。近年来,分子标记技术发展很快,对于深入了解植物基因的多态性、有针对性地选择亲本、对杂种后代进行早期鉴定等方面,都能提供更为有效的判断依据,从而提高育种效率^[2]。通过群体选优、杂交育种、细胞融合等技术,建立多样化育种理论体系和技术体系,培育多用途的枸杞新品种,对于提升枸杞产业的研究水平和枸杞产业可持续发展意义重大。本研究以枸杞杂交育种亲本和杂交品系为试验材料,通过对其种内杂交育种产生的杂交后代进行基于核糖体内转录间隔区(ITS)条形码序列的聚类分析,分析杂交后代与父母本的亲缘关系与差异,以期对其杂交后代进行早期筛选。

收稿日期:2016-06-07
基金项目:国家自然科学基金(编号:31360471);宁夏回族自治区育种专项(编号:2013NYYZ0103);宁夏回族自治区科技创新领军人才专项。
作者简介:石志刚(1976—),男,宁夏贺兰人,硕士,副研究员,研究方向为枸杞遗传育种与配套栽培。E-mail:shizhigang76@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以宁夏枸杞种内的品种宁杞 1 号、宁杞 2 号、白花枸杞作为父母本,以通过种内杂交育种产生的杂交后代 05-04-17-b、05-04-31-b、05-06-27-b、05-38-36、05-31-01、05-32-31 作为试验材料,材料名称、来源等见表 1。

表 1 材料代号、名称和来源

代号	名称与来源
Ningqi2	宁杞 2 号
Baihua	白花
05-04-31-b	宁杞 1 号×宁杞 2 号
05-38-36	宁杞 2 号×宁杞 1 号
05-32-31	宁杞 1 号×白花
Ningqi1	宁杞 1 号
05-04-17-b	宁杞 1 号×宁杞 2 号
05-06-27-b	宁杞 1 号×宁杞 2 号
05-31-01	宁杞 1 号×白花

1.2 试验方法

枸杞叶片 DNA 提取参照文献[3]的方法进行,采用改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法。PCR 扩增引物设计、扩增程序、反应体系及目的片段的克隆参照笔者所在研究组前期的报道^[4]。

1.3 枸杞杂交育种父母本和杂交后代的亲缘关系分析
采用 MEGA 4.0 分析软件对 ITS 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

宁夏枸杞不同品种间杂交种中,整个 ITS 序列长度变异范围为 559~631 bp,平均为 595 bp;整个 ITS1 序列长度变异范围为 198~252 bp,平均为 224 bp;整个 5.8SnrDNA 序列长度变异范围都为 154 bp;整个 ITS2 序列长度变异范围为 207~225 bp,平均为 217 bp。ITS 区、分区长度及 G+C 含量

变异见表 2。

宁夏枸杞种内不同杂交种植物 ITS 序列特征如表 3 所示。整个 ITS 区排序后的总长度为 631 bp,其中 ITS1、5.8S、ITS2 排序后的长度分别为 252、154、225 bp。将 gap(空位)作 missing(缺失)处理时,由于 5.8SDNA 序列过于保守,不适合用作系统发育分析,因而在本研究中利用 ITS1、ITS2 区序列

进行统计发育分析。整个转录间隔区(ITS1 + ITS2)对位排列后总长度为 477 bp,共有 173 个变异位点,变异位点数分别为 114、59 个,占 36.3%;保守位点数 304 个,占 63.7%;有 10 个信息位点,占 2.1%,69 个转换位点,15 个颠换位点,其中 ITS1 区的信息位点所占比例高于 ITS2 区,而 ITS1 区的转换/颠换值高于 ITS2 区(表 3)。

表 2 宁夏枸杞种不同品种间杂交种的 ITS 区序列长度和 G + C 含量

代号	名称	ITS1		5.8S		ITS2		ITS 区	
		长度 (bp)	G + C 含量 (%)	长度 (bp)	G + C 含量 (%)	长度 (bp)	G + C 含量 (%)	总长度 (bp)	G + C 含量 (%)
Ningqi2	宁杞 2 号	198	55.6	154	51.3	207	58.0	559	55.3
Ningqi1	宁杞 1 号	252	68.3	154	55.8	225	69.3	631	65.6
Baihua	白花	198	55.6	154	52.0	207	58.0	559	55.5
05-04-17-b	宁杞 1 号 × 宁杞 2 号	198	55.6	154	51.3	207	58.0	559	55.3
05-04-31-b	宁杞 1 号 × 宁杞 2 号	233	64.4	154	53.9	224	60.7	611	60.4
05-06-27-b	宁杞 1 号 × 宁杞 2 号	241	66.8	154	55.8	225	67.5	620	64.4
05-38-36	宁杞 2 号 × 宁杞 1 号	198	55.6	154	51.3	207	57.9	559	55.3
05-31-01	宁杞 1 号 × 白花	251	68.6	154	55.8	225	69.3	630	65.7
05-32-31	宁杞 1 号 × 白花	251	69.3	154	55.8	225	69.3	630	66.0
平均		224	62.2	154	53.7	217	63.1	595	60.4

表 3 宁夏枸杞种不同品种间杂交种的 ITS 区序列特征

序列	保守位点		变异位点		信息位点		单个位点(%)		转换位 点/颠 换位点
	保守位点数/总碱 基数	比重 (%)	变异位点数/总碱 基数	比重 (%)	信息位点数/总碱 基数	比重 (%)	单个位点数/总碱 基数	比重 (%)	
ITS1	138/252	54.8	114/252	45.2	7/252	2.8	107/252	42.4	37/5
ITS2	166/225	73.8	59/225	26.2	3/225	1.3	56/225	24.9	32/10
合计	304/477	63.7	173/477	36.3	10/477	2.1	163/477	34.2	69/15

2.2 亲缘关系分析

对 ITS 区碱基序列进行聚类分析,从图 1 中可以看出亲缘关系与差异。

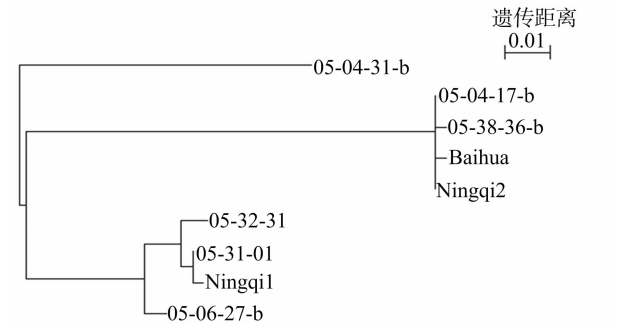


图1 N-J 聚类结果

3 讨论

05-06-27-b、05-4-31-b、05-4-17-b 具有相同的父母本,是宁杞 1 号 × 宁杞 2 号,基于 ITS 序列分析可知,05-4-17-b 父本聚在一起,而其他 2 个具有父母本的序列特征,从 ITS 序列可以初步判断 3 个杂交种为真杂种。

05-31-01、05-32-31 具有相同的父母本,是宁杞 1 号 × 白花,基于 ITS 序列分析可知,05-31-01 与母本 ITS 序列基本一致,初步可以判定它不含父本的基因,是否为杂交后代有待进一步确定;而 05-32-31 同时具有父母本的序列特征,初步判定其是真杂交后代。

05-38-36 是宁杞 2 号 × 宁杞 1 号,基于 ITS 序列分析,杂种与母本具有完全一致的序列特征,初步可以判定它不含父本的基因,是否为杂交后代有待进一步确定。

枸杞是多年生灌木,成龄期在 4 年以上,杂交群体的保存目前多采用活体方法,占用大量的土地资源和人力,随着杂交育种工作的开展,杂交群体的保存和早期鉴定对于提高育种、缩短育种周期尤为重要,亟需通过杂交后代的早期鉴定来克服和缓解庞大的杂交群体规模所带来的困难和压力。基于 ITS 序列差异,从聚类图可以初步判断父母本与杂交后代之间亲缘关系的远近,而且结合它们在植物学性状、细胞学性状、同工酶性状等方面的差异,可以作为枸杞早期筛选杂交后代的依据之一。

参考文献:

[1]石志刚,郭文林,门惠芹. 枸杞不同种质的 nrDNA ITS 序列分析研究[M]. 北京:中国林业出版社,2012:1-5.
[2]张汉明,许铁峰,秦路平,等. 中药鉴别研究的发展和现代鉴别技术介绍[J]. 中成药,2000,22(1):101-110.
[3]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(1):11-14.
[4]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 and Technology, 2008, 36(16):6687-6689.