

万如,王亚军,安巍,等. 基于 *psbA-trnH* 序列条形码鉴定 21 份枸杞属植物[J]. 江苏农业科学,2019,47(1):56-59.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.013

# 基于 *psbA-trnH* 序列条形码鉴定 21 份枸杞属植物

万如,王亚军,安巍,李彦龙,秦 坚,赵建华,马婷慧,石志刚

(宁夏农林科学院枸杞工程技术研究所,宁夏银川 750002)

**摘要:**通过 DNA 条形码技术,以 *psbA-trnH* 基因为条形码编码序列对枸杞属植物 21 份试验材料进行鉴定分析,在分子水平上获得鉴定枸杞属植物的理论依据。采用 Clustal X 比对序列,用 Mega 7.0 计算遗传变异距离并比较序列间的差异,基于 K2P 模型构建系统发育树。结果表明,*psbA-trnH* 序列的遗传距离范围为 0.000 0~0.009 2,平均遗传距离为 0.003 0,可以鉴别亲缘关系较远的枸杞属品种,并且构建的系统发育树将航天诱变种与普通栽培种分成了 2 大支,各分支内部均具有较高的自展支持率,因此,*psbA-trnH* 序列可以作为初步鉴定枸杞属植物的 DNA 条形码。

**关键词:**枸杞属;DNA 条形码;分子鉴定

**中图分类号:**S567.1<sup>+</sup>90.24 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)01-0056-04

枸杞为茄科(Solanaceae)茄族(Solaneae Reichb.)枸杞亚族(Lyciinae Wettst)枸杞属(*Lycium* L.)植物,是多年生落叶灌木<sup>[1]</sup>,其果实、根皮、叶均具有较高的药用及保健价值。该属约有 80 种,是一个世界分布属<sup>[2]</sup>,国内主要种植区域分布在宁夏、新疆、甘肃、青海等地<sup>[3]</sup>。由于各品种间常有相同的基原或近缘,其发育形态、组织结构及所含的化学成分具有高度的相似性<sup>[4]</sup>,因此传统的形态学鉴别方法已难以解决此问题。

DNA 条形码(DNA barcoding)是利用 1 个或少数几个 DNA 片段对目标物种进行识别和鉴定的一项新技术<sup>[5]</sup>,它具有操作简便、准确性高、鉴定快速等特点<sup>[6]</sup>,已成为现代生物分类学研究中引人关注的新方向和研究热点。近些年来,国内外学者对适用于鉴定植物的 DNA 条形码基因序列进行了积极的探索与研究,发现 *psbA-trnH* 基因片段进化速率快,能够积累较多变异,从而能够鉴别亲缘关系很近的物种<sup>[7-10]</sup>,因此适宜作为鉴定植物的 DNA 条形码。

本研究旨在对 21 份枸杞属植物试验材料进行 *psbA-trnH* 的序列测定,并通过序列比对、序列间差异分析及构建系统发育树,探索其在枸杞属植物中的适用性,从而为物种鉴定和分类提供依据并奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

采样时间:2017 年 6 月 14 日。采样地点:宁夏银川市

收稿日期:2017-10-31

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(编号:KJT2015014);宁夏回族自治区一二三产业(编号:NKY-16-0504);宁夏回族自治区科技支撑计划重大专项(编号:2015BY11105)。

作者简介:万如(1990—),女,宁夏中宁人,硕士,研究实习员,主要从事枸杞遗传育种研究。E-mail:289755627@qq.com。

通信作者:石志刚,硕士,研究员,主要从事枸杞遗传育种与配套栽培研究。Tel:(0951)6886707;E-mail:shizhigang76@163.com。

(芦花台)枸杞国家林木种质资源库,地处银川平原西部、贺兰山东麓,地理位置为 105°49′~106°18′E,38°08′~38°52′N,年平均蒸发量为 1 583.2 mm,年平均太阳辐射量为 146 kcal/cm<sup>2</sup>,全年平均日照时数超过 3 000 h,日照率为 69%,光能资源丰富,年平均气温差为 32℃左右,无霜期较短,降水量较少,属于中温带干旱型气候。

采样品种:在银川市枸杞国家林木种质资源库采集 21 份枸杞属植物新鲜叶片于 5 mL 冻存管中,保存于液氮中备用。样品详情见表 1。

### 1.2 试验方法

2017 年 6 月 19 日至 7 月 21 日在宁夏农林科学院枸杞工程技术研究所功能基因分析实验室进行 21 份枸杞属植物材料的基因提取及克隆工作。具体工作流程如下:

总 DNA 的提取:采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(DNA secure Plant Kit)提取 DNA。

PCR 扩增。设计如下引物:P1,5′-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3′;P2,5′-CGCGCATGCTGGATTCAATCC-3′,用以上引物对 21 个试验材料在 Bio-Rad PCR 仪上进行 PCR 扩增,扩增体系(15 μL):2×pfumix(pfumix 指浓缩 PCR 扩增预混合溶液)7.5 μL,P1 和 P2 各 0.5 μL,模板 DNA 2 μL,最后加 ddH<sub>2</sub>O 4.5 μL 补足至 15 μL。反应程序:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,36 个循环;72℃保温 10 min。将 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。

切胶回收:采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒对目标条带进行回收,并用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行回收检测,将纯化后的目标 DNA 作为测序反应的模板。

连接转化:采用 pLB 零背景快速克隆试剂盒,将回收产物连接于 T 载体(pGEM-T),再转入大肠杆菌进行培养。

阳性克隆的筛选及测序:采用蓝白斑法筛选阳性克隆,并进行菌落 PCR 及电泳检测。最后送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.3 序列统计分析方法

利用 Clustal X 进行序列比对,用 Mega 7.0 计算目标序列

表 1 枸杞属植物试验材料基本信息

编号	种英文/拉丁名	种质名称	代号	资源类型	采集地
1	Ningqi No.1 ( <i>L. barbarum</i> L.)	宁杞 1 号	Ningqi1	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
2	Ningqi No.2 ( <i>L. barbarum</i> L.)	宁杞 2 号	Ningqi2	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
3	Ningqi No.3 ( <i>L. barbarum</i> L.)	宁杞 3 号	Ningqi3	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
4	Ningqi No.4 ( <i>L. barbarum</i> L.)	宁杞 4 号	Ningqi4	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
5	Ningqi No.5 ( <i>L. barbarum</i> L.)	宁杞 5 号	Ningqi5	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
6	Ningqi No.6 ( <i>L. barbarum</i> L.)	宁杞 6 号	Ningqi6	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
7	Ningqi No.7 ( <i>L. barbarum</i> L.)	宁杞 7 号	Ningqi7	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
8	<i>L. barbarum</i> L.	宁农杞 9 号	Ningnongqi9	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
9	<i>L. barbarum</i> L. var. <i>auranticarpum</i> K. F. Ching	黄果变	Huangguobian	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
10	<i>Lycium ruthenicum</i> Murr.	黑果枸杞	Heiguo	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
11	<i>L. barbarum</i> L.	W-12-30	W-12-30	航天诱变种	银川市枸杞国家林木种质资源库
12		HZ-13-01	HZ-13-01	黑杂航天诱变种	银川市枸杞国家林木种质资源库
13		ZH-13-08	ZH-13-08	航天诱变种	银川市枸杞国家林木种质资源库
14		W-12-27	W-12-27	黑杂航天诱变种	银川市枸杞国家林木种质资源库
15		W-11-15	W-11-15	黑杂航天诱变种	银川市枸杞国家林木种质资源库
16		W-13-26	W-13-26	野生资源航天诱变种	银川市枸杞国家林木种质资源库
17		W-12-26	W-12-26	黑杂航天诱变种	银川市枸杞国家林木种质资源库
18	<i>Lycium chinense</i> Mill. var. <i>potaninii</i> (Pojark.) A. M. Lu	北方枸杞	Beifang	引进品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
19		圆果枸杞	Yuanguo	选育品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
20		河北枸杞	Hebei	引进品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
21		昌吉枸杞	Changji	引进品种	银川市枸杞国家林木种质资源库
22		外类群	Meiguo		

的碱基组成、序列间的碱基变异频率和序列间的转换颠换频率及其比率。通过比较序列种内和种间差异的分布,利用 Mega 7.0 构建系统发育树,评价各序列的鉴定效果。

2 结果与分析

2.1 序列测定结果

测得 21 份枸杞属植物叶绿体 *psbA-trnH* 间隔序列共 21 条,在美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站上进行 BLAST 相似性检索,均有较好的匹配程度,确认为目标序列,检索比对结果表明测序结果可靠准确。

2.2 序列信息分析

利用 Mega 7.0 软件对目标序列进行分析,结果显示,21 份枸杞属植物材料的 *psbA-trnH* 间隔序列的长度均在 546 ~ 565 bp 之间,其中,北方枸杞和河北枸杞的 *psbA-trnH* 序列最长,达到 565 bp,其次是黄果变、黑果枸杞、宁农杞 5 号、昌吉枸杞及 6 个航天诱变种,长度均为 555 bp,宁杞 1 号至宁杞 7 号,宁农杞 9 号及圆果枸杞序列长度最短,为 546 bp。21 份枸杞属植物材料的 G + C 含量也存在差异,变异范围为 30.3% ~ 31.4%。为使试验结果更加清晰,加入外类群的分析,在 NCBI 上进行枸杞属植物 *psbA-trnH* 间隔序列的 BLAST 检索,找到外类群美国枸杞的序列信息,长度为 513 bp,G + C 含量为 29.9% (表 2)。

2.3 序列比对分析

经过序列比对,发现 21 条序列之间不仅发生了转换和颠换,而且存在碱基或片段缺失现象。除了北方枸杞与河北枸杞,其他 19 种枸杞属植物均在 185 bp 处存在 19 个碱基的缺失,与 7 个航天诱变种、黑果枸杞、黄果变以及昌吉枸杞相比,

表 2 序列碱基组成及长度

序号	种质名称	代号	G + C 含量 (%)	总长度 (bp)
1	宁杞 1 号	Ningqi1	31.0	546
2	宁杞 2 号	Ningqi2	31.0	546
3	宁杞 3 号	Ningqi3	31.0	546
4	宁杞 4 号	Ningqi4	31.0	546
5	宁杞 5 号	Ningqi5	31.0	546
6	宁杞 6 号	Ningqi6	31.0	546
7	宁杞 7 号	Ningqi7	31.0	546
8	宁农杞 9 号	Ningnongqi9	31.0	546
9	黄果变	Huangguobian	31.2	555
10	黑果枸杞	Heiguo	31.2	555
11	W-12-30	W-12-30	31.4	555
12	HZ-13-01	HZ-13-01	31.4	555
13	ZH-13-08	ZH-13-08	31.4	555
14	W-12-27	W-12-27	31.4	555
15	W-11-15	W-11-15	31.4	555
16	W-13-26	W-13-26	31.4	555
17	W-12-26	W-12-26	31.4	555
18	北方枸杞	Beifang	30.3	565
19	圆果枸杞	Yuanguo	31.1	546
20	河北枸杞	Hebei	30.3	565
21	昌吉枸杞	Changji	31.4	555
22	外类群	Meiguo	29.9	513

其他 11 种枸杞均在 496 bp 处存在 9 个碱基的缺失。利用 Mega 7.0 软件计算表明,在 21 种枸杞属植物的 *psbA-trnH* 序列中,保守位点(C)为 566 个,变异位点(V)数量为 8 个,其中简约位点(Pi)4 个,自裔位点(S)4 个,其转换/颠换值(R)

为 0.2。

2.4 遗传距离分析

在 21 份试验材料 *psbA-trnH* 序列比对的基础上,借助 Mega 7.0 计算 Kimura 2-parameter 遗传距离。结果表明,21 种枸杞的遗传距离为 0.000 0~0.009 2 cM,其中遗传距离最小(0.000 0 cM)的组合有 4 个,分别是河北枸杞与北方枸杞和圆果枸杞、黄果变与黑果枸杞、宁杞 1 号至宁杞 7 号与宁农杞 9 号、7 个航天诱变种,其亲缘关系最为接近,而昌吉枸杞与北方枸杞、圆果枸杞、河北枸杞之间的遗传距离最大(0.009 2 cM),亲缘关系最远,它们的平均遗传距离为 0.003 0 cM(表 3)。

表 3 21 份枸杞属植物成对比较时的遗传距离

枸杞材料	遗传距离(cM)										
	Beifang	Yuanguo	Hebei	W-12-30	W-13-26	W-12-26	HZ-13-01	ZH-13-08	W-12-27	W-11-15	
Beifang	—										
Yuanguo	0.000 0	—									
Hebei	0.000 0	0.000 0	—								
W-12-30	0.005 5	0.005 5	0.005 5	—							
W-13-26	0.005 5	0.005 5	0.005 5	0.000 0	—						
W-12-26	0.005 5	0.005 5	0.005 5	0.000 0	0.000 0	—					
HZ-13-01	0.005 5	0.005 5	0.005 5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—				
ZH-13-08	0.005 5	0.005 5	0.005 5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—			
W-12-27	0.005 5	0.005 5	0.005 5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—		
W-11-15	0.005 5	0.005 5	0.005 5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—	
Heiguo	0.007 4	0.007 4	0.007 4	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8
Huangguobian	0.007 4	0.007 4	0.007 4	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.001 8
Changji	0.009 2	0.009 2	0.009 2	0.003 6	0.003 6	0.003 6	0.003 6	0.003 6	0.003 6	0.003 6	0.003 6
Ningqi1	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7
Ningqi2	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7
Ningqi3	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7
Ningqi4	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7
Ningqi5	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7
Ningqi6	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7
Ningqi7	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7
Ningnongqi9	0.001 8	0.001 8	0.001 8	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7	0.003 7

枸杞材料	遗传距离(cM)										
	Heiguo	Huangguobian	Changji	Ningqi1	Ningqi2	Ningqi3	Ningqi4	Ningqi5	Ningqi5	Ningqi7	Ningnongqi9
Beifang											
Yuanguo											
Hebei											
W-12-30											
W-13-26											
W-12-26											
HZ-13-01											
ZH-13-08											
W-12-27											
W-11-15											
Heiguo	—										
Huangguobian	0.000 0	—									
Changji	0.001 8	0.001 8	—								
Ningqi1	0.005 5	0.005 5	0.007 4	—							
Ningqi2	0.005 5	0.005 5	0.007 4	0.000 0	—						
Ningqi3	0.005 5	0.005 5	0.007 4	0.000 0	0.000 0	—					
Ningqi4	0.005 5	0.005 5	0.007 4	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—				
Ningqi5	0.005 5	0.005 5	0.007 4	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—			
Ningqi6	0.005 5	0.005 5	0.007 4	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—		
Ningqi7	0.005 5	0.005 5	0.007 4	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—	
Ningnongqi9	0.005 5	0.005 5	0.007 4	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	—

2.5 枸杞属 MP 树鉴定

根据 21 个枸杞品种的序列测定结果,采用最大简约数法(maximum parsimony,简称 MP)构建 MP 系统发育树,模型为 Kimura 2-parameter,拓朴结构的可靠性用 1 000 次重复的自

展检测(bootstrap analysis)来评估(图1)。*psbA-trnH* 条形码序列的聚类图分成了2大支,宁杞1号到宁杞7号、宁农杞9号、圆果枸杞、北方枸杞、河北枸杞及外类群美国种聚为1大支,其中宁杞1号至7号与宁农杞9号处于同一分支,亲缘关系最近,圆果枸杞、北方枸杞与河北枸杞为同一支,亲缘关系

最近,外类群美国品种单独为1支,与上述11个品种的亲缘关系最远。航天诱变种与黄果变、黑果枸杞和昌吉枸杞聚为1大支,与其他品种亲缘关系较远,其中7个航天诱变种聚为同一支,亲缘关系最近,黄果变、黑果枸杞、昌吉枸杞聚为同一支,与上述7个品种的亲缘关系较远。

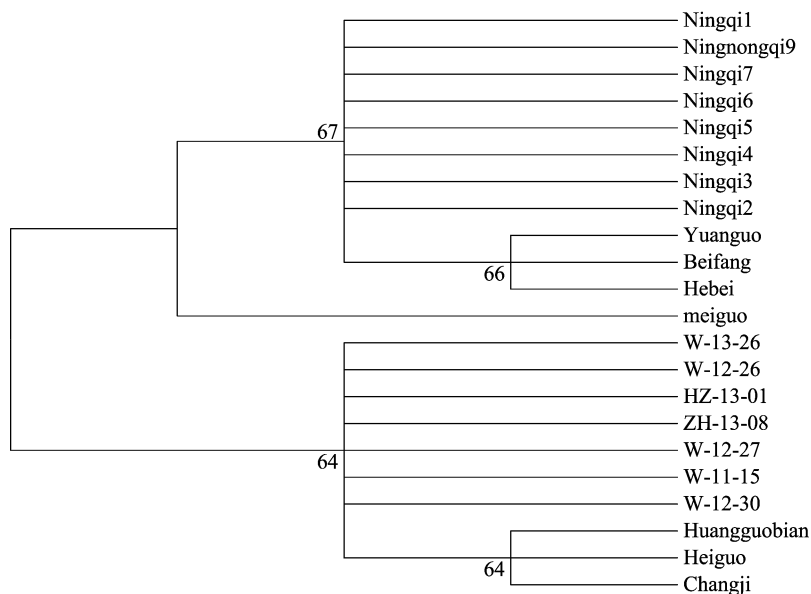


图1 枸杞属植物*psbA-trnH*序列MP系统发育树

### 3 结论与讨论

由于枸杞属种质资源较为丰富,起源驯化有多种途径,栽培历史悠久,属内种间杂交现象普遍<sup>[11]</sup>,且诸多地方品种无科学命名,导致品种资源类型多且名称乱,因此鉴定评价枸杞属种质资源具有深刻的意义<sup>[12]</sup>。本研究中21份种质材料属于枸杞属近缘种,在遗传多样性鉴定评价过程中,农艺性状易受环境和栽培技术的影响不易鉴别,细胞学性状多态性不丰富,此外同工酶性状有器官特异性且受生长发育阶段的影响,具有一定的局限性<sup>[13]</sup>。而分子标记法的出现,为资源鉴定评价提供了新的方法<sup>[14-15]</sup>。本研究利用叶绿体间隔序列*psbA-trnH*的保守区设计引物,扩增出完整序列片段,并对扩增产物进行序列测定。经分析得出21份枸杞属种质资源的*psbA-trnH*序列长度范围为546~565 bp,共有8个变异位点,虽然序列过于保守,但其系统发育树将21份种质材料分成2大类,普通栽培种与圆果枸杞、北方枸杞、河北枸杞聚成1支,航天诱变种与黑果枸杞、黄果变、昌吉枸杞聚为1支,且各分支内部具有较高的自展支持率,表明依据*psbA-trnH*序列的差异可以鉴定亲缘关系较远的枸杞属种质,而亲缘关系较近的种质资源还需进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 袁宝财,达海莉,李晓瑞. 宁夏枸杞的生物学特性及开发利用前景[J]. 河北林果研究,2001,16(2):151-153.  
[2] 石志刚,杜慧莹,门惠芹. 枸杞种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京:中国林业出版社,2012.  
[3] 苏宇静,贺海明,孙兆军. 中国枸杞资源及其在食品工业中的应用现状和开发前景[J]. 食品科学,2002,23(8):292-294.

[4] 石志刚,万如,李彦龙,等. 宁夏枸杞主要品种*psbA-trnH*的DNA条形码鉴定的初步研究[J]. 农业科技与装备,2016(6):1-2,7.  
[5] 于杰,闫化学,鲁振华,等. 基于matK和rbcL DNA序列条形码鉴定橘柑及其近缘属植物[J]. 园艺学报,2011,38(9):1733-1740.  
[6] Stoeckle M, Waggoner P, Ausubel J. Barcoding life: ten reasons. identifying species by DNA[J]. Consortium for the Barcode of Life, 2004:1-2.  
[7] 陈士林,姚辉,宋经元,等. 基于DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2007,9(3):7-12.  
[8] 陈士林. 中药DNA条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012.  
[9] 宁淑萍,颜海飞,郝刚,等. 植物DNA条形码研究进展[J]. 生物多样性,2008,16(5):417-425.  
[10] 刘宇婧,刘越,黄耀江,等. 植物DNA条形码技术的发展及应用[J]. 植物资源与环境学报,2011,20(1):74-82,93.  
[11] 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.  
[12] 李小刚,王有科,李捷,等. 基于nrDNA-ITS序列的10种枸杞属植物亲缘关系研究[J]. 中国农学通报,2014,30(25):128-135.  
[13] 石志刚,万如,李彦龙,等. 基于ITS条形码序列的枸杞属植物鉴定[J]. 湖北农业科学,2016,55(22):5966-5968.  
[14] 任海,吕小红,杜萌. 多抗水稻分子标记辅助育种方法[J]. 江苏农业科学,2017,45(19):154-158.  
[15] 李红,张敏,肖千明,等. 基于ISSR-PCR分子标记的滑菇遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):39-41.