

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);宁夏回族自治区物种专项(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'-CGCGCATGGTGGATCACAATCC-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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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

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,拓扑结构的可靠性用 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。

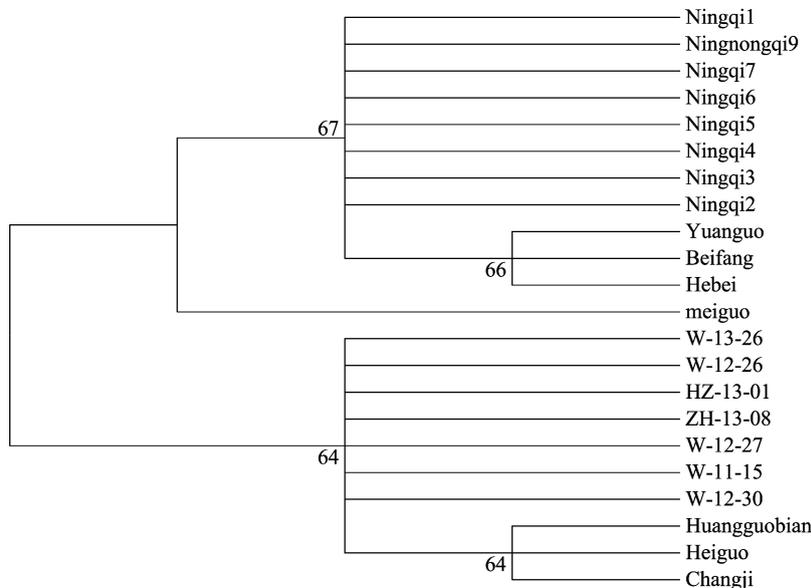


图1 枸杞属植物*psbA-trnH*序列MP系统发育树

### 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.