

席秀利, 黄海波, 楼步青, 等. 广陈皮 DNA 提取优化及茶枝柑的 ISSR 分子鉴别[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 27–31.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.007

广陈皮 DNA 提取优化及茶枝柑的 ISSR 分子鉴别

席秀利, 黄海波, 楼步青, 詹若挺, 王浩涵

(广州中医药大学, 广东广州 510006)

摘要:为提取优化广陈皮基因组 DNA, 同时利用简单重复序列间扩增 (ISSR) 分子鉴定技术快速、准确地鉴别茶枝柑及其近缘种。对比 4 种提取方法后择优提取广陈皮 DNA; 采用正交优化茶枝柑 ISSR-PCR 反应体系, 筛选 100 条 ISSR 通用引物及其退火温度, 从而对茶枝柑及近缘种进行遗传多态性分析。结果发现, 通过对比 cCTAB 法提取陈皮基因组 DNA 产率较试剂盒法提高了 10 倍, 且电泳检测条带清晰明亮, 可为后续分子研究提供基础; 通过筛选 100 条 ISSR 通用引物, 最终筛选出 10 条适合茶枝柑及近缘种的引物, 对其进行多态性分析并获得 13 种植物聚类分析图。因此可知, cCTAB 法适合陈皮基因组 DNA 的提取, 并可为其他果皮类植物基因组 DNA 提取提供参考; ISSR 适合茶枝柑及近缘种的遗传多态性分析, 可作为其有效分子鉴别手段。

关键词: DNA 提取; ISSR; 茶枝柑; 近缘种; 遗传多态性

中图分类号: S666.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0027-05

芸香科 (Rutaceae) 柑橘属 (*Citrus*) 植物茶枝柑 (*Citrus reticulata* cv. *chachiensis*) 的成熟果皮可入药。茶枝柑的果皮晒干即为中药陈皮, 陈皮具有理气健脾、燥湿化痰之功效, 用于胸脘胀满、食少吐泻、咳嗽痰多等疾病^[1]。商业上用于制作中成药、中药饮片、陈皮茶、饮料、添加剂和香料等, 具有很高的食用兼药用价值^[2]。因其需求量巨大, 同时由于环境、地域的差异, 陈皮药材来源混杂、混伪品较多, 造成了药材质量不稳定, 难以保证临床用药的安全和有效, 因此建立科学的鉴定方法是保证陈皮质量亟需解决的问题。

1994 年, 加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等提出分子标记采用简单重复序列间扩增 (inter simple sequence repeat, 简称 ISSR)^[3]。ISSR 技术简易、快捷, 引物设计无须预知基因组序列, 只要是目标区域的长度在可扩增范围内, 就能扩增出微卫星重复序列间的 DNA 片段^[4]。ISSR 综合了其他分子标记高多态性、可重复性、低成本易操作以及无须知道基因组序列的优点, 已被广泛应用于种质收集、品种鉴定、遗传多样性以及 SSR 引物开发等研究^[5]。

本研究通过经典十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法^[6]、

mCTAB 法^[7]以及 2 种植物基因组提取试剂盒法对广陈皮药材基因组 DNA 提取进行探究, 优化适合广陈皮 DNA 的提取方法, 以期今后广陈皮的分子研究提供保障。同时, 利用 ISSR 标记对茶枝柑及近缘种进行遗传多态性分析, 得到相关物种的 ISSR 聚类分析图, 从而为茶枝柑及其近缘种植物鉴别提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料的收集包括广陈皮 (*Citrus aurantium* L.) 以及茶枝柑同属近缘 13 种, 其中茶枝柑、福橘 (*Citrus reticulata* Blanco cv. *Tangerina*) 采自广东省、福建省等地, 由广州中医药大学黄海波副教授鉴定, 凭证标本保存于广州中医药大学。采集植物新鲜幼嫩叶片, 用 75% 乙醇水溶液清洁叶表面后迅速置于硅胶密封袋中, 快速干燥后保存于 -20 °C 冰箱备用, 试验材料详细信息见表 1。

1.2 仪器和试剂

OSE-Y20 电动研磨仪 [天根生化科技 (北京) 有限公司], Arktik PCR 仪 (Thermo), T960 PCR 仪 (杭州晶格科学仪器有限公司), Power Pac Basic 电泳仪 (Bio-Rad), 离心机 (Eppendorf), Nano Drop 2000 超微量紫外分光光度计 (Thermo), Tanon-2500 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

dNTPs, ExTaqDNA 聚合酶、Mg²⁺、10 × ExTaq Buffer、DL5000Maker、琼脂糖 (TaKaRa); 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、CTAB、β-巯基乙醇 (Sigma 公司); 植物基因组提取试剂盒、

1995.

[12] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 102–110.

[13] 裴鑫得. 多元统计分析及其应用 [M]. 北京: 农业出版社, 1991: 89–188.

[14] 魏秀华, 周永红, 杨瑞武, 等. 鹅观草属三个物种及其居群间的

酯酶同工酶分析 [J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(2): 117–120, 195.

[15] 王中仁. 植物等位酶分析 [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 95–118.

[16] 葛 颀. 酶电泳资料和系统与进化植物学研究综述 [J]. 武汉植物学研究, 1994, 12(1): 71–84.

表 1 样品信息

样品编号	样品名称	学名	采样时间 (年-月-日)	采集地点
1	茶枝柑	<i>C. chachiensis</i>	2015-12-17	广东省江门市新会区新宝堂种植基地
2	橘	<i>Citrus reticulata</i>	2016-01-25	广东省梅州市平远县差干五指石
3	沙糖橘	<i>C. reticulata</i> Blanco	2016-01-27	广东省梅州市平远县热柘镇
4	红橘	<i>C. tangerinahort</i>	2016-04-29	四川省自贡市沿滩区九洪乡联合村
5	蜜橘	<i>C. reticulata</i> Blanco	2016-04-29	浙江省衢江区莲花镇山外村
6	福橘	<i>C. tangerina</i>	2016-05-07	福建三明市将乐县高塘镇赖地沙坪路
7	瓯柑	<i>C. suavisissima</i> Tanaka	2016-06-17	浙江省温州市瓯海区应塘村
8	槿柑	<i>C. poonensis</i> Tanaka	2016-06-19	浙江省台州市椒江玉岙水果场
9	山下红	<i>C. unshiu</i> Marc	2016-06-19	浙江省台州市椒江玉岙水果场
10	本地早	<i>C. succosa</i> Tanaka	2016-06-19	浙江省台州市椒江玉岙水果场
11	宫川	<i>C. unshiu</i> Marcow	2016-06-19	浙江省台州市椒江玉岙水果场
12	尤良	<i>C. unshiu</i> Marcow	2016-06-19	浙江省台州市黄岩头陀镇柑橘研究所
13	红美人	<i>C. reticulata</i> Blanco	2016-06-19	浙江省台州市黄岩头陀镇柑橘研究所

RNase,loading buffer[天根生化科技(北京)有限公司];其余为国产分析纯试剂;参考哥伦比亚大学提供的 100 条 ISSR 引物序列,由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 广陈皮 DNA 的提取 试验对比植物基因组提取试剂盒 DP305、DP320,经典 CTAB 法以及改良 CTAB 法 4 种方法后,选择优化改良 CTAB 法(cCTAB)作为最终提取陈皮基因组 DNA 的提取方法。

1.3.1.1 缓冲液配制 细胞核分离液含 0.10 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)、0.25 mol/L NaCl(5.00 mol/L)、5 mmol/L EDTA(pH 值 8.0)、2% PVP,加水定容至 100 mL;2% CTAB 缓冲液配方含 0.10 mol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)、1.40 mol/L NaCl、20.00 mol/L EDTA(pH 值 8.0)、2% CTAB、2% PVP、2% β-巯基乙醇,加水定容至 100 mL。

1.3.1.2 提取方法 称取 50 mg 干果皮,加 20 mg PVP 和 10 mg 抗坏血酸以及适量液氮于研钵中迅速研磨成粉末,将粉末迅速转入 2.0 mL 离心管中;将粉末弹至试管侧壁,加入 1.0 mL 预冷的核分离液,振荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复洗涤共 3 次;加入 0.8 mL 预热的 2% CTAB 缓冲液配方,混匀后 65 ℃ 水浴 60 min,其间每隔 10 min 摇动 1 次;取出离心管冷却到室温,加入等体积的苯酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)颠倒混匀 5 min;12 000 r/min 离心 5 min,吸上清液并置于新的 2.0 mL 离心管中;加入等体积三氯甲烷:异戊醇溶液(24:1),颠倒混匀 5 min;12 000 r/min 离心 5 min,吸上清液并置于新的 1.5 mL 离心管中;加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和等体积的预冷无水乙醇,轻轻混匀至出现丝状沉淀为止;10 000 r/min 离心 2 min,弃上清;加入 0.8 mL 预冷 70% 乙醇,轻轻弹起沉淀,静置悬浮 5 min,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清;重复上一步骤;超净台上风干乙醇;加入 100 μL TE 和 6 μL 10 mol/L RNase,37 ℃ 水浴 30 min;放置于 4 ℃ 冰箱过夜溶解后于 -20 ℃ 长期保存。

1.3.1.3 DNA 产率和质量检测 (1)琼脂糖凝胶电泳检测。用琼脂糖凝胶电泳检测 4 种提取方法提取的 DNA 片段大小、降解情况。取 5 μL DNA 原液,加 1 μL loading buffer,混匀后点入 0.8% 琼脂糖凝胶,150 V 电泳 15 min,在紫外凝胶成像仪上观察并拍照。

(2)微量分光光度计检测。取 2 μL DNA 原液,用 Nano Drop 2000 超微量分光光度计测定 DNA 的浓度及吸光度。

(3) PCR 检测。将 cCTAB 提取的 DNA 原液稀释到 50 ng/μL,用植物 DNA 条形码候选片段进行 PCR 扩增。所用引物为 trnH/psbA^[8],PCR 扩增采用 10 μL 反应体系,其中包括 1×PCR buffer(含 MgCl₂)、0.2 mmol/L dNTPs,各 0.5 μmol/L 上下游引物,0.5 U Taq DNA 聚合酶,50 ng 模板 DNA。PCR 扩增程序:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外凝胶成像仪观察并拍照。

1.3.2 ISSR 分子标记

1.3.2.1 正交优化 PCR 反应体系 选择 UBC 809 为引物,以植物基因组提取试剂盒 DP305 提取的茶枝柑叶片基因组 DNA 为模板,针对 PCR 反应的 Mg²⁺、dNTPs、ExTaq 聚合酶、Primer 和 DNA 模板的浓度共 5 个因素在 4 个水平上进行正交设计(表 2)。

表 2 茶枝柑 ISSR-PCR 反应体系优化正交设计

组别	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	Taq 浓度 (U)	引物浓度 (μmol/L)	DNA 浓度 (ng)
1	1.00	0.10	0.50	0.20	20
2	1.00	0.15	0.75	0.30	30
3	1.00	0.20	1.00	0.40	40
4	1.00	0.25	1.25	0.50	50
5	1.25	0.10	0.75	0.40	50
6	1.25	0.15	0.50	0.50	40
7	1.25	0.20	1.25	0.20	30
8	1.25	0.25	1.00	0.30	20
9	1.50	0.10	1.00	0.50	30
10	1.50	0.15	1.25	0.40	20
11	1.50	0.20	0.50	0.30	50
12	1.50	0.25	0.75	0.20	40
13	1.75	0.10	1.25	0.30	40
14	1.75	0.15	1.00	0.20	50
15	1.75	0.20	0.75	0.50	20
16	1.75	0.25	0.50	0.40	30

正交试验共 16 组,重复 3 次,PCR 反应体系为 20 μL,扩增程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 60 s,72 ℃ 90 s,40 个

循环;72 ℃ 7 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,电泳条件为 100 V、40 min,结果经凝胶成像系统拍照分析。

1.3.2.2 单因素内优化 参照正交试验体系优化的结果,对 DNA 模板浓度、Mg²⁺ 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度和 Taq DNA 聚合酶浓度用 ISSR 809 号引物进行交叉试验。反应体系参数设置如下:Mg²⁺ 设置 1.00、1.25、1.50、1.75、2.00 mol/L 5 个浓度梯度;dNTPs 设置 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mol/L 5 个浓度梯度;ExTaq 酶设置 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 U 5 个浓度梯度;引物设置 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 μmol/L 5 个浓度梯度;模板 DNA 设置 20、30、40、50、60 ng 5 个浓度梯度;1 × PCR buffer,补充 ddH₂O 至 20 μL。

1.3.2.3 引物筛选以及退火温度优化 采用优化后反应体系对哥伦比亚大学公布的 100 条 ISSR 引物在其高于 T_m 值 2 ℃ 进行筛选,选择条带数量多、间距合适、清晰的引物进行退火温度优化。使用 T960 PCR 仪,以具体引物理论 T_m 为中心温度,设定退火温度梯度范围(5 ℃),自动形成 12 个梯度温度(50.0、50.5、51.2、52.2、53.4、54.6、55.8、56.9、58.0、59.0、59.4、60.0 ℃)进行筛选,从而确定引物适宜的退火温度。

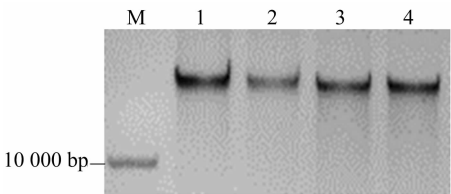
1.3.2.4 多态性筛选 采用优化后的反应体系及退火温度对茶枝柑、福橘、蜜橘 3 个不同地域的样品进行多态性筛选,选择条带清晰、间距明显且多态性比例大的引物,最终确定适合茶枝柑及近缘种的多态性引物。

1.3.2.5 数据分析 利用 Tanon-2500 凝胶成像 GIS 软件对电泳图谱同一位置 ISSR 条带的有无进行统计,清晰地出现条带记为“1”,无条带记为“0”,条带不清楚的不予统计,形成“0/1”矩阵。利用 NTSYS-pc2.10e 软件计算遗传距离,用 UPGMA 法进行聚类分析,绘制 ISSR 树状图。

2 结果与分析

2.1 陈皮 DNA 提取结果

2.1.1 陈皮基因组 DNA 经 0.8% 琼脂糖电泳检测结果 如图 1 所示,各个泳道均出现 1 条清晰的 DNA 条带,无蛋白质和 RNA 污染,无拖尾现象。



1、2、3、4均为广陈皮。图2同

图1 cCTAB 法提陈皮基因组 DNA 结果

2.1.2 超微量紫外分光光度法检测结果 如表 3 所示,cCTAB 法提取的 DNA 纯度较高,质量浓度较均匀,符合试验要求。

表 3 不同方法提取广陈皮基因组 DNA 吸光度比较

提取方法	D _{230 nm}	D _{260 nm}	D _{280 nm}	D _{260 nm} /D _{280 nm} 值	D _{260 nm} /D _{230 nm} 值	质量浓度 (ng/μL)
DP320 试剂盒	0.924	0.791	0.830	0.953	0.856	7.26
DP305 试剂盒	1.328	0.297	0.142	2.092	0.224	12.53
CTAB	1.024	0.596	0.361	1.651	0.582	22.73
mCTAB	0.678	0.407	0.241	1.689	0.600	47.67
cCTAB	2.032	2.474	1.211	2.042	1.217	123.69

2.1.3 PCR 检测 cCTAB 法提取陈皮基因组 DNA 如图 2 所示,结果检测能扩增出均一明亮条带,说明该方法提取 DNA 能为后续分子试验提供良好基础。

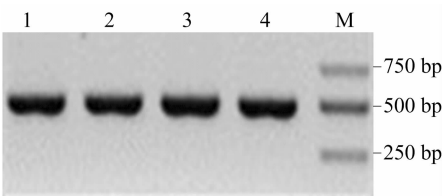
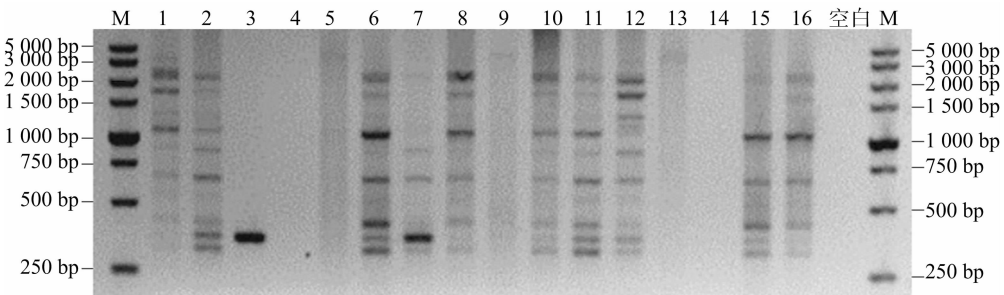


图2 陈皮 trnH/psbA-PCR 扩增产物

2.2 ISSR-PCR 结果

2.2.1 PCR 反应体系正交优化结果分析 使用引物 809 对反应体系优化的电泳结果如图 3 所示,参考何正文等的直观评价法^[9]依次对 16 个试验组结果多态性进行评分:条带数量丰富、清晰的计 16 分;涂布或无条带的计 1 分。1~16 组的平均整数计分依次为 8、12、2、1、1、14、6、11、1、12、13、16、1、1、9、10 分,依照计分原则,以第 12 组反应体系(1 × PCR buffer, 1.50 mmol/L Mg²⁺, 0.25 mmol/L dNTPs, 0.20 μmol/L 引物, 0.75 U Taq 酶,40 ng 模板 DNA)为最佳,对正交优化后的体系进行单因素优化后,得到最终反应体系:1 × PCR buffer,



1~16—正交1~16组不同体系

图3 ISSR 正交反应体系电泳结果

1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.3 mmol/L dNTPs, 0.3 μ mol/L 引物, 1.0 U *Taq* 酶, 40 ng 模板 DNA。

2.2.2 引物筛选及退火温度优化 以最佳反应体系对 100 条 ISSR 通用引物进行筛选, 重复 3 次初筛选 30 条引物, 从中

优选 15 条清晰且背景亮度合适的引物进行 12 个退火温度梯度筛选, 电泳图经 Tanon-2500 凝胶成像系统分析, 根据信号强度判断条带, 最终获得在最适退火温度下扩增的 13 条引物, 见图 4。

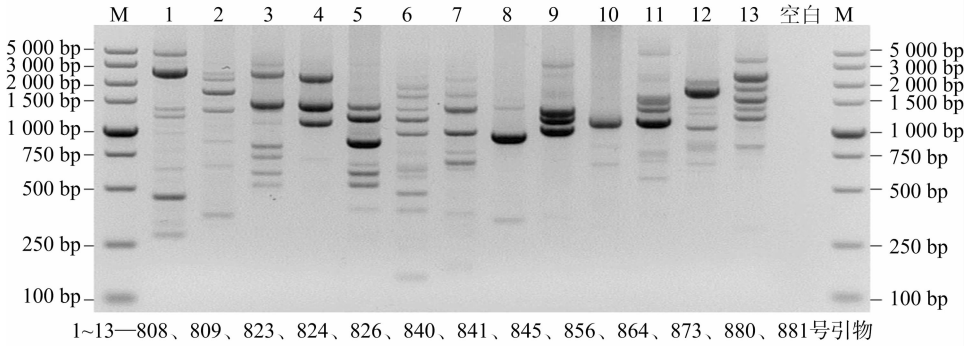


图4 茶枝柑全 ISSR 引物扩增结果

2.2.3 ISSR-PCR 扩增的多态性分析 以茶枝柑、福橘、蜜橘 3 个地域差异大的样品进行多态性筛选, 最终获得 10 条扩增带形完整、清晰、多态性丰富的引物(表 5)。利用这 10 条引物对 13 份材料进行 ISSR 扩增, 共获得总条带 914 条, 其中多态性条带共 823 条, 多态位点数共占 90.04%, 多态性比例较高, 说明茶枝柑及近缘种遗传多态性丰富。用表 5 中的 826 号引物对 13 份材料的多态性电泳结果见图 5。

2.2.4 ISSR 标记的遗传相似性及聚类分析 利用 NTSYS 软件构建全部材料基于 ISSR 数据的相似系数(表 6)以及 UPGMA 树状图(图 6)。13 份材料两两之间的相似系数在 0.475 0~0.825 0, 以相似系数 0.57 为阈值可将 13 份材料划分为 2 组, 体现了品种差异, 茶枝柑、福橘、蜜橘、红橘、沙糖橘、瓯柑为第 1 分支, 其中茶枝柑与福橘相似性最高。而在相似系数 0.72 处, 茶枝柑则与福橘、蜜橘、红橘聚为一类, 说明四者相似度较高; 第 2 组则以浙江省采样为主, 包括山下红、

表 5 ISSR 引物扩增结果

引物名称	序列 (5'→3')	退火温 度(℃)	扩增条带 总数(条)	多态性条 带数(条)	多态性 比例(%)
808	(AG) ₈ C	59.0	133	120	90.23
809	(AG) ₈ G	55.8	106	106	100.00
823	(TC) ₈ C	54.6	66	66	100.00
826	(AC) ₈ C	59.0	91	91	100.00
840	(GA) ₈ YT	55.8	95	69	72.63
841	(GA) ₈ YC	55.8	84	71	84.52
864	(ATG) ₆	51.2	68	68	100.00
873	(GACA) ₄	50.5	85	59	90.77
880	(GGAGA) ₃	53.4	103	103	100.00
881	(GGGTG) ₃	50.0	83	70	84.34
合计			914	823	
平均			91.4	82.3	90.04

注: Y = (C, T); H = (A, C, T); V = (A, C, G)。

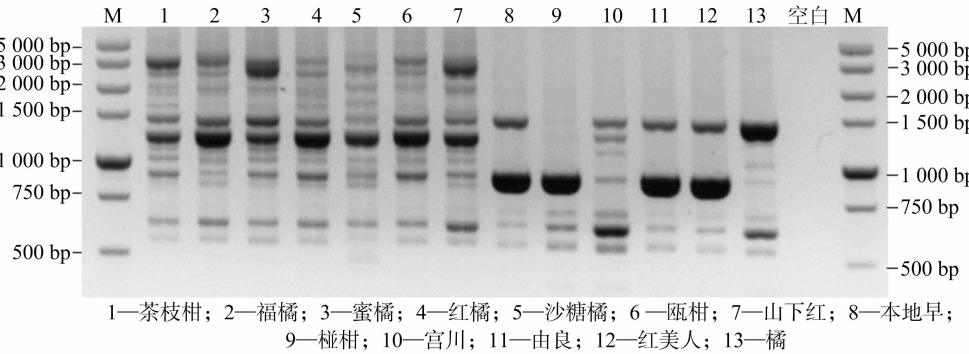


图5 826 号引物对 13 份材料的多态性电泳结果

本地早、由良、椪柑、宫川、红美人与橘构成第 2 分支, 说明同一地域样品相似度高; 筛选的 10 条引物能在分子水平对茶枝柑及同属 13 种近缘种进行初步区分。

3 讨论

植物细胞内含有大量次生代谢产物, 如多糖、多酚等, 这些物质在提取 DNA 的过程中与 DNA 共沉淀, 形成黏稠的胶状物, 难以溶解或产生褐变, 严重影响 DNA 提取的产量与质量, 以及后续的 PCR 扩增试验。本试验在对比 2 种试剂盒法和 2 种 CTAB 法后, 选择改良 CTAB 法进一步优化。PVP 是

酚和多糖的络合物, 能有效去除多酚和多糖^[10], 抗坏血酸是抗氧化剂, 可避免褐化^[11]。本试验对比了在研磨时选择加入 PVP 和抗坏血酸, 结果发现 PVP 和抗坏血酸以 2:1 的比例能有效防止样品氧化和褐变; 而加入 CTAB free 缓冲液(即“1.3.1.1”节的细胞核分离液)洗涤 3 次可有效去除大部分代谢产物且降低提取液黏稠度; 无水乙醇析出 DNA 速度快且含量多、无需冷藏, 大大地减少了试验时间; 最后加入的 RNase 消化 30 min 能较快溶解 DNA 且有效提高了 DNA 纯度, cCTAB 法最终获得的 DNA 浓度较试剂盒法提高了 10 倍多, 经济可行。由于陈皮样品较易于市场获得, 故本研究在陈

表 6 茶枝柑及近缘种相似系数

品种	茶枝柑	福橘	蜜橘	红橘	沙糖橘	瓯柑	山下红	本地早	椪柑	宫川	由良	红美人	橘
茶枝柑	1.000 0												
福橘	0.812 5	1.000 0											
蜜橘	0.756 2	0.718 8	1.000 0										
红橘	0.712 5	0.787 5	0.693 7	1.000 0									
沙糖橘	0.587 5	0.662 5	0.581 3	0.675 0	1.000 0								
瓯柑	0.593 8	0.606 2	0.612 5	0.593 8	0.606 2	1.000 0							
山下红	0.587 5	0.587 5	0.556 3	0.625 3	0.550 0	0.593 8	1.000 0						
本地早	0.618 8	0.593 8	0.575 0	0.531 3	0.506 2	0.537 5	0.756 2	1.000 0					
椪柑	0.631 2	0.643 8	0.537 5	0.556 3	0.556 3	0.562 5	0.706 3	0.812 5	1.000 0				
宫川	0.593 8	0.606 2	0.537 5	0.593 8	0.506 2	0.587 5	0.743 8	0.775 0	0.787 5	1.000 0			
由良	0.593 8	0.643 8	0.575 0	0.606 2	0.531 3	0.550 0	0.768 8	0.825 0	0.787 5	0.825 0	1.000 0		
红美人	0.568 7	0.593 8	0.525 0	0.556 3	0.493 8	0.512 5	0.693 7	0.725 0	0.700 0	0.700 0	0.787 5	1.000 0	
橘	0.562 5	0.625 0	0.606 2	0.575 0	0.475 0	0.543 7	0.650 0	0.681 3	0.631 2	0.668 7	0.743 8	0.731 2	1.000 0

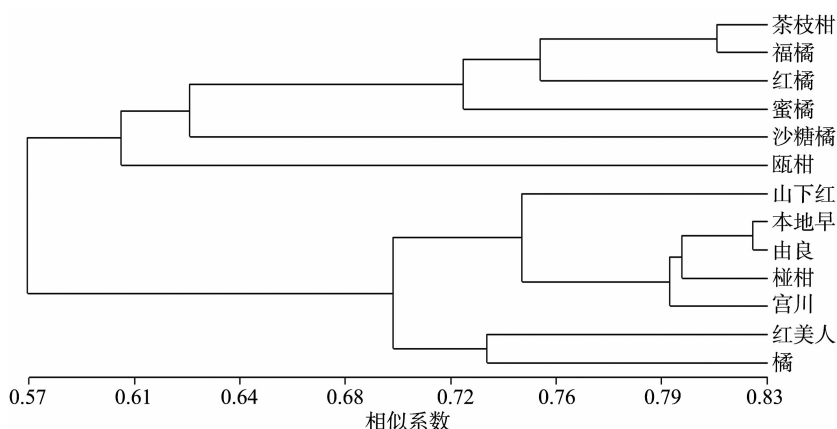


图6 茶枝柑及近缘种 UPGMA 法聚类结果

皮的 DNA 提取方法上进行了优化,以期为今后市场流通的商品陈皮样品的 DNA 分子鉴别提供参考依据。

ISSR 分子标记技术简易、快捷、高多态性、引物通用^[12-13],但对反应体系要求较高,体系内细小变动可能导致试验结果及重复性较差。故本研究采用了正交设计法优化了茶枝柑的 ISSR-PCR 反应体系,同时通过单因素内优化、12 个退火温度梯度优化、多态性筛选,最终从 100 条 ISSR 通用引物里筛选出 10 条清晰、条带丰富的作为茶枝柑及近缘种 ISSR 分子标记的引物。引物扩增多态位点比例 90.04%,在分子水平证实了茶枝柑及近缘种间具有丰富的种内遗传多样性。通过 NTSYS 软件进行相似系数和 UPGMA 聚类分析,在分子角度对茶枝柑及近缘种 13 种材料进行初步区分,其中陈皮传统入药柑橘品种茶枝柑与福橘遗传相似系数最高,表明中药陈皮主要入药柑橘品种间亲缘关系较近。而聚类分析结果能够直观、科学地将茶枝柑与近缘种进行划分,为茶枝柑与其近缘种的科学筛选提供了分子生物学依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:176.
[2] 单 杨. 柑橘加工技术研究与产业化开发[J]. 中国食品学报, 2006,6(1):423-427.

[3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
[4] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
[5] 冯亮亮,唐 红,李 毅,等. 甘肃红砂不同种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 草业学报,2011,20(1):125-130.
[6] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002.
[7] 李金璐,王 硕,于 婧,等. 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报,2013,48(1):72-78.
[8] 陈士林,庞晓慧,姚 辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2011,13(5):747-754.
[9] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报,1998,23(4):76-77.
[10] 陈士林,姚 辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志,2013,38(2):141-148.
[11] 贾晓梅,周 悦,崔彬彬,等. 北美海棠组织培养中褐变影响因素分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):91-93.
[12] 陈淑吟,陆勤勤,张美如,等. 紫菜丝状体种质特性的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):17-20.
[13] 刘 君,李 东,曾 林,等. 利用 ISSR 分子标记分析辣椒种质资源遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):80-83.