

魏星任,叶清莲,马新业,等.凉粉草 DNA 条形码通用序列的筛选及其混伪品分子鉴定[J].江苏农业科学,2017,45(13):32-35.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.008

凉粉草 DNA 条形码通用序列的筛选 及其混伪品分子鉴定

魏星任,叶清莲,马新业,龙洁怡,张 娇,严 萍,詹若挺,陈蔚文

(广州中医药大学/中药资源科学与工程研究中心/岭南中药资源教育部重点实验室/国家中成药

工程技术研究中心南药研发实验室,广东广州 510006)

摘要:提取凉粉草基因组总 DNA,使用通用引物扩增核基因 ITS1、ITS2 序列和叶绿体 *psbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 序列并进行测序,使用 CodonCode Aligner 软件对完整序列进行拼接并对其进行比对,使用 MEGA 7.0 邻接法 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统聚类树。结果表明, *matK* 序列扩增成功率低; ITS1 序列存在单一变异位点且测序成功率低; ITS2、*rbcL* 和 *psbA-trnH* 等 3 个序列无变异位点,序列扩增成功率、测序成功率高,序列长度在 233 ~ 671 bp,从系统聚类树上得出 ITS2 序列可以将凉粉草与其他 3 种混伪品区分开,而 *rbcL* 和 *psbA-trnH* 序列在区分时存在一定的混淆。ITS2 序列可以考虑作为鉴别凉粉草的优选序列。

关键词:凉粉草;DNA 条形码;分子鉴定;ITS2;混伪品

中图分类号: R282.710.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0032-04

凉粉草 (*Mesona chinensis*) 为唇形科 (Labiatae) 凉粉草属 (*Mesona*) 植物,别称仙人草、仙草、仙人冻、薪草,是一类重要的经济和药用植物,全世界有 8 ~ 10 种,零星分布于印度东北部、东南亚及我国东南各省的广大地区^[1]。在我国,主要分布于福建、台湾、浙江、广东、广西及云南等地。据《全国中草药汇编》记载,仙草性味涩、甘、寒,具清暑解渴、凉血解暑及利尿之功效^[2],主治中暑、小儿疳积、丹毒入腹、消渴、感冒、高血压、黄疸、肾脏病、糖尿病和关节肌肉疼痛等。

长期以来,凉粉草以野生资源为主,不同地区的资源在长期进化过程中形成了在外部形态特征甚至内部的生理结构上的极大差异。随着用量的不断提升,凉粉草的种质资源问题得到了重视,分子标记是资源鉴定与评价的有效方法之一。关杰敏等得到了一种适合凉粉草基因组 DNA 的提取方法,能提供高质量的凉粉草总 DNA^[3]。李晓晖等表明,SCoT 和 ISSR 等 2 种分子标记均适用于凉粉草种质资源的遗传多样性研究^[4-5]。DNA 条形码是一种特异性的分子鉴定技术,Chen 等经过大样本量研究,证明 DNA 条形码应用于植物分子鉴定非常高的稳定性和准确度^[6-12],2015 版《中国药典》第三部规定 DNA 条形码植物类药材鉴定以核糖体 ITS2 作为主体条形码,并以 *psbA-trnH* 为辅进行^[13]。目前凉粉草的

DNA 条形码方面研究也只涉及单一序列 ITS2,本研究选取了广东省、广西壮族自治区、福建省、台湾、江西省等地的凉粉草为样本,基本涵盖绝大部分凉粉草产地,并选用了核基因 ITS1、ITS2 序列和叶绿体基因 *rbcL*、*psbA-trnH* 和 *matK* 序列作为候选序列,旨在通过更多的凉粉草样本来优选出合适的候选片段作为 DNA 条形码鉴定该植物的序列。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选取凉粉草 26 份,凉粉草样品试验号 MB-01 ~ MB-10 采集自广州中医药大学 2 号山体 (药王山),为各地移栽品种;MB-11 ~ MB-26 由广东南岭药业股份有限公司提供 (详见表 1)。试验标本经广州中医药大学中药鉴定教研室讲师林颖鉴定,凭证标本保存于广州中医药大学中药科学与工程研究中心。KM280868、FJ513094 为 Genbank 上获得的凉粉草登录号。混伪品样本序列 17 份,均在 Genbank 上下载,其材料信息见表 2。涉及凉粉草常见的混伪物种:线纹香茶菜 (*Isodon lophanthoides* Buch. - Ham. ex D. Don H. Hara)、溪黄草 (*Isodon serra* Maxim. Hara) 和筋骨草 (*Ajuga ciliate* Bunge)。

1.2 仪器与试剂

所用仪器有 BS224S 型电子分析天平 (德国赛多利斯公司),MJ-Mini 型 PCR 仪 (BioRad),DYY-8C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂),凝胶成像仪 (法国 VL),微量紫外分光光度计 (北京天根有限公司),Milipore-Q 型纯水仪 (Millipore 公司)。

试剂有 DP321 植物基因组 DNA 提取试剂盒、MD109 100 bp DNA ladder (北京天根有限公司)、DRR 100B Ex Taq (TaKaRa),ITS1、ITS2、*rbcL*、*psbA-trnH* 引物 (华大基因科技有限公司)。

收稿日期:2017-01-25

基金项目:广东省高等院校学科与专业建设专项 (编号:2013CXZDA011);广东省普通高校创新团队项目 (编号:2016KYTD02);广东省大学生创新创业训练计划 (编号:201610572099)。

作者简介:魏星任 (1993—),女,广东揭阳人,硕士研究生,研究方向为中药质量标准。E-mail:524344346@qq.com。

通信作者:严 萍,博士,副研究员,研究方向为中药质量标准。E-mail:yanping@gzucm.edu.cn。

表 1 凉粉草试验样品信息

试验号	样品来源
MB-01	印度尼西亚
MB-02	广东省平远县
MB-03	广东省阳春县
MB-04	福建省龙岩武平下坝
MB-05	福建省永定县
MB-06	台湾关西
MB-07	广东省潮州朝阳区
MB-08	广东省广州市增城
MB-09	福建省永安市
MB-10	广西省灵山县
MB-11	广东省平远县中行仲石
MB-12	江西省瑞金市
MB-13	广东省平远县河头家牙村
MB-14	广东省平远县泗水梅畲
MB-15	广东省平远县泗水镇金田村
MB-16	广东省平远县仁居镇六吉村
MB-17	广东省平远县仁居镇畚溪村
MB-18	广东省平远县仁居镇黄畲村
MB-19	广东省平远县差干镇湖洋村
MB-20	广东省平远县差干镇云板岗
MB-21	广东省平远县差干镇瑞溪村
MB-22	福建省长汀县
MB-23	福建省武平县下坝乡
MB-24	广东省平远县上举镇文裕村
MB-25	广东省广州市增城区正果镇
MB-26	广东省平远县差干镇三达村

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 将采集到的新鲜样品用 75% 乙醇洗净表面,置于烘箱中 40 ℃ 烘干,称取样品 30 mg 加入液氮中充分碾磨。按照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作并用微量紫外分光光度计测定提取的 DNA 浓度及纯度。

1.3.2 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, 简称 PCR) 扩增及测序 本试验所用引物序列及 PCR 条件见表 3。PCR 体系包括 1.0 μL 上、下游引物,1.0 μL 基因组 DNA,12.5 μL *Taq* 酶,用 ddH₂O 补充到 25 μL;PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳并送华大基因科技有限公司完成双向测序。

1.3.3 序列分析 使用 CodonCode Aligner V6.0.2 对测序峰图进行校对拼接,去除低质量序列及引物区的序列,使用 DNAMAN 8.0 进行多序列比对;使用 MEGA 7.0 对试验样本所得基因序列构建系统进化树,评价不同候选序列 ITS2、*rbcL* 和 *psbA-trnH* 对凉粉草的鉴定能力。

2 结果与分析

2.1 序列长度、葡萄糖含量和变异分析

ITS1、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL* 序列电泳图条带清晰,无杂带,扩增成功率为 96%,*matK* 反复试验均扩增成功率低(图 1)。ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL* 的测序成功率为 100%,ITS1 测序成功率为 68%,远低于前三者的成功率,且 ITS1 存在 2 个变异位点,所以在本研究中 ITS1、*matK* 不作为推荐的优选序列。

表 2 Genbank 凉粉草及其伪品试验样本信息

基因名称	登录号	物种名	拉丁名
<i>rbcL</i>	KM208861	溪黄草	<i>I. serra</i>
	JF942113	线纹香茶菜	<i>I. lophanthoides</i> var. <i>lophanthoides</i>
	KM208858、KM208859	线纹香茶菜	<i>I. lophanthoides</i> var. <i>graciliflorus</i>
	HM590107	筋骨草	<i>A. ciliate</i>
<i>psbA-trnH</i>	FJ513094	凉粉草	<i>M. chinensis</i>
	KF032285、KF032286	溪黄草	<i>I. serra</i>
	JX404029	线纹香茶菜	<i>I. lophanthoides</i> var. <i>lophanthoides</i>
	KF032292、KM208796、KM208797	线纹香茶菜	<i>I. lophanthoides</i> var. <i>graciliflorus</i>
	FJ513092	筋骨草	<i>A. ciliate</i>
ITS2	KM280868	凉粉草	<i>M. chinensis</i>
	KM280859	溪黄草	<i>I. serra</i>
	KM280864	线纹香茶菜	<i>I. lophanthoides</i> var. <i>lophanthoides</i>
	KM280862	线纹香茶菜	<i>I. lophanthoides</i> var. <i>graciliflorus</i>
	KM280866	筋骨草	<i>A. ciliate</i>

表 3 PCR 扩增引物序列及扩增条件

基因名称	引物名称	引物序列 5'→3'	扩增条件
ITS1	P1	TCCGTAGGTGAACCTGCCGG	95 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min,56 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,28 个循环;72 ℃ 5 min
	P2	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS2	2F	ATGCGATACTTGGTGTAAT	94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,40 个循环;72 ℃ 10 min
	3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
<i>rbcL</i>	RL1	ATGTCACCACAAACAGAAC	95 ℃ 2 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 7 min
	RL2	TCCGATGTACCTGCAGTAGC	
<i>matK</i>	390F	CGATCTATTTCATTCGAATATTTTC	94 ℃ 1 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 40 s,40 个循环;72 ℃ 7 min
	326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	
<i>psbA-trnH</i>	F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,30 个循环;72 ℃ 7 min
	R	CGCGCATGCTGGATTCACAATCC	

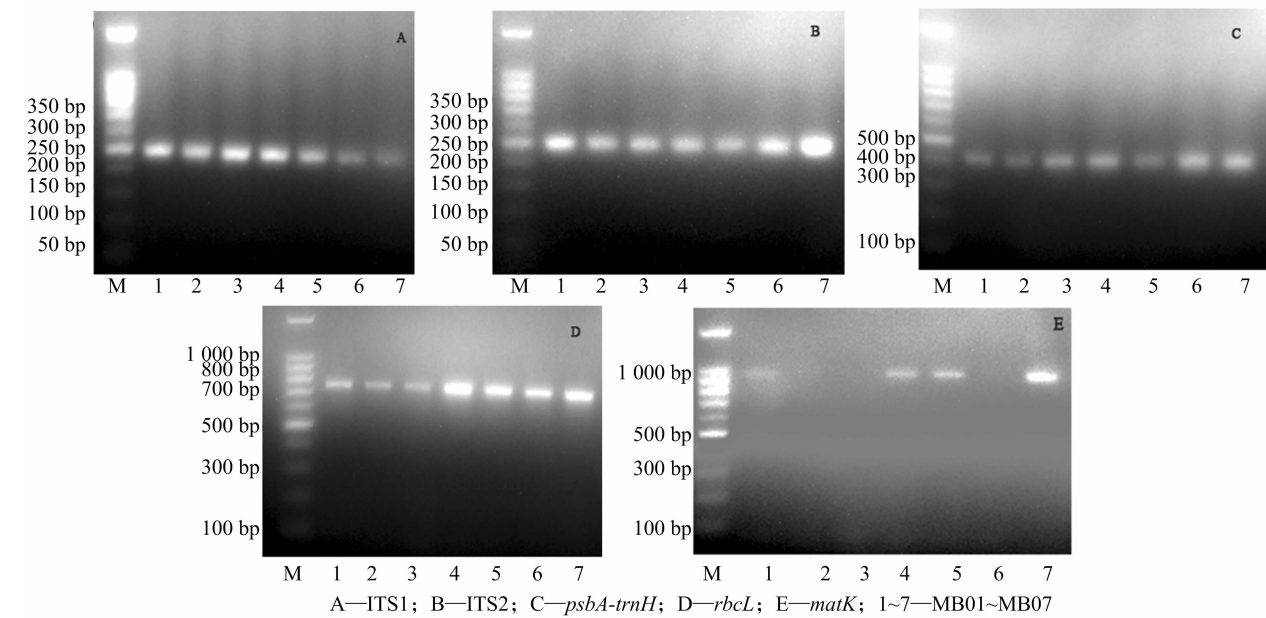


图1 部分不同产地凉粉草候选序列电泳图

由表 4 可知,不同的 3 条候选序列在序列长度、GC 含量方面有较明显的差异。序列长度由高到低依次为 *rbcL*、*psbA-trnH*、ITS2, GC 含量从高到低依次为 ITS2、*rbcL*、*psbA-trnH*。3 条候选序列均无变异位点。

表 4 候选序列 ITS2、*psbA-trnH* 和 *rbcL* 序列特点

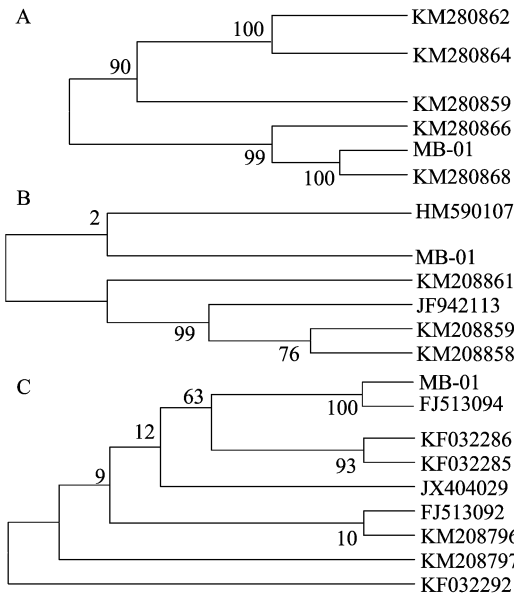
基因	比对序列长度 (bp)	GC 含量 (%)	保守位点 (bp)	变异位点 (bp)	简约信息位点 (bp)	单一变异位点 (bp)
ITS2	233	61.8	233	0	0	0
<i>psbA-trnH</i>	375	29.0	348	0	0	0
<i>rbcL</i>	671	43.0	671	0	0	0

2.2 不同候选序列对凉粉草及其混伪品的鉴定能力

采用 NJ 法构建不同序列的系统聚类树,利用 Bootstrap 法 1 000 次重复检验各分支的支持率,NJ 树构建结果见图 2。结果表明,ITS2 序列能将所有的样品聚为两大支,其中凉粉草单独成一支,具有明显的单系性,然后与筋骨草聚为一大支,同时线纹香茶菜及其变种与溪黄草组成另外一大支;*rbcL* 序列将所有的样品聚成两大支,凉粉草与筋骨草成为一大支,然而不能与其他混伪品形成的另一大支区分开;*psbA-trnH* 序列凉粉草单独成支,然而无法与线纹香茶菜及其变种区分开。所以只有 ITS2 序列能够将凉粉草与其混伪品线纹香茶菜、溪黄草和筋骨草区分开,其他 2 个序列则无法完全区分。

3 小结

本试验采用 5 条通用的候选 DNA 条形码序列对 26 个不同产地凉粉草样品及其混伪品进行对比研究。*matK* 序列是叶绿体 DNA 中进化的比较快的序列,但是在凉粉草中很难成功扩增;ITS1 的测序效率较低只有 68% 且存在 2 个变异位点;*psbA-trnH*、*RbcL* 序列不能完全把凉粉草与本研究所用到的混伪品区分开;只有 ITS2 序列有较高的扩增效率和测序效率且能准确鉴别凉粉草与其他 3 种混伪品。所以建议优先选择 ITS2 序列作为鉴别凉粉草的 DNA 条形码的基因序列。



A—ITS2 序列; B—*RbcL* 序列; C—*psbA-trnH* 序列
图2 基于不同序列的凉粉草及其混伪品 NJ 树

DNA 的 ITS 序列,结果显示 ITS 序列在 ITS1 区段的第 355 位和 ITS2 区段的第 578 位存在 2 个碱基的差异^[14],与本研究结果有所不同,可能是试验收集样本不相同导致的。同时与师玉华等的结 黄玉吉等通过克隆测序法测定了凉粉草不同品系核糖体论即 ITS2 序列能够鉴别凉茶药材凉粉草溪黄草、断血流和筋骨草^[15]相符合,本研究相对于马定乾等的研究的先进之处在于对热门通用序列进行了筛选,验证了候选序列对于凉粉草的适用性和鉴别能力,所以得出的结论更加客观、全面。

本研究所涉及的混伪品数据全部来源于 GenBank,且网上凉粉草混伪品相关数据较少,所以今后的研究中考虑增加混伪品试验样本数量。本研究虽然具有一定的不足,但仍然对凉粉草的分子鉴定有参考意义。

王健胜,侯桂玲,谢永凤. 国内外苜蓿品种遗传多样性 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):35-38.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.009

国内外苜蓿品种遗传多样性 RAPD 分析

王健胜¹,侯桂玲¹,谢永凤²

(1.平顶山学院,河南平顶山 467000; 2.中国农业科学院草原研究所,内蒙古呼和浩特 010010)

摘要:采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记对 19 份国内外苜蓿种质的遗传多样性进行分析。结果显示,7 对 RAPD 引物在供试苜蓿材料中共获得有效扩增位点 51 个,其中多态性位点 50 个,多态性位点百分率为 98.04%。引物的有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数和多态性信息含量平均分别为 1.48 个、0.29、0.44 和 0.33。供试苜蓿材料间的遗传相似系数介于 0.039~0.922 之间,平均为 0.494。聚类分析和主成分分析均表明,供试苜蓿种质可被划分为两大类,其中第一类群包括的苜蓿种质数最多,达到 16 个,占有供试苜蓿种质数的 84.21%。研究结果将为供试苜蓿种质有效利用提供一定科学依据。

关键词:苜蓿;遗传多样性;RAPD 分析

中图分类号:S551+.703 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)13-0035-03

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是多年生同源四倍体($2n=4x=32$)和异花授粉植物,也是世界上最重要的豆科牧草之一,被誉为“牧草之王”^[1]。紫花苜蓿在我国的栽培历史较长,其栽培面积也是牧草中最大的。近年来,随着人们对苜蓿产业发展的逐步重视,我国不断加强了对国外苜蓿引种和种质资源交流,这为我国苜蓿相关研究提供了较为丰富的种质资源。但是,引种和品种资源交流频率的增加造成了现有苜蓿品种在名称和来源上的混乱,品种及种质的产权问题、种子质量问题也越来越严重,而且至今未能建立起有效的鉴别方

法和标准,这也在一定程度上限制了优良种质资源的进一步开发利用。因此,开展苜蓿种质资源研究显得尤其重要。

分子标记技术作为重要研究手段在植物种质资源研究中得到了极为广泛的应用,但与其他主要农作物相比,利用分子标记开展苜蓿种质资源的研究仍较少。由于苜蓿分子标记研究起步较晚,导致苜蓿专有分子标记开发数量较少,因此现有苜蓿研究中利用的分子标记主要以随机标记为主。目前,包括扩增片段长度多态性(AFLP)^[2]、微卫星(SSR)^[3-4]、微卫星间隔(ISSR)^[5-6]等多种类型分子标记都较好地应用于苜蓿种质资源研究中。随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记是一种较早开发的分子标记技术,由于它具有易扩增、多态性高、操作简便、无种属限制等优点而被广泛应用于苜蓿遗传多样性研究中^[7-9]。因此,本研究采用 RAPD 分子标记技术对国内外的 19 份苜蓿栽培种质进行了遗传多样性分析,在初步掌握不同苜蓿种质间亲缘关系的同时,发现具有优良变异的

收稿日期:2016-03-15

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:KJT142102110171);河南省平顶山市科技计划(编号:2014086)。

作者简介:王健胜(1978—),男,陕西礼泉人,博士,讲师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:wjsheng1998@163.com。

参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志(第 66 卷)[M]. 北京:科学出版社,1997:547-592.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:474.
- [3] 关杰敏,张桂芳,林吉,等. 凉粉草基因组 DNA 提取与分析[J]. 安徽农业科学,2010,38(20):10575-10577.
- [4] 李晓晖. 不同凉粉草种质资源的生理特性及种质评价[D]. 南宁:广西大学,2012.
- [5] 李晓晖,黎颖菁,黄荣韶,等. 凉粉草遗传多样性的 SCoT 和 ISSR 分析[J]. 西南农业学报,2012,25(5):1834-1840.
- [6] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One, 2010, 5(1):e8613.
- [7] 罗焜,陈士林,陈科力,等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究[J]. 中国科学(生命科学),2010,4(4):342-358.
- [8] 朱英杰,陈士林,姚辉,等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定

- 研究[J]. 药学报,2010,3(3):376-382.
- [9] Gao T, Yao H, Song J Y, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(1):116-121.
- [10] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, et al. Applying plant DNA barcodes for rosacea species identification[J]. Cladistics, 2011, 27:165.
- [11] Yao H, Song J Y, Liu C, et al. Use of ITS2 region as the Universal DNA barcode for plants and animals[J]. PLoS One, 2010, 5(10):e13102.
- [12] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, et al. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae[J]. Planta Medica, 2010, 76:1784.
- [13] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:277.
- [14] 黄玉吉,黄颖桢,陈菁瑛,等. 3 个仙草品系核糖体 DNA-ITS 序列分析[J]. 现代中药研究与实践,2012(3):22-25.
- [15] 师玉华,马定乾,张景景,等. 凉茶药材凉粉草与混伪品的 ITS2 条形码鉴定[J]. 中国药理学杂志,2015(15):1282-1285.