

张鑫,廖亮,李同建,等. 枳壳分子生药鉴别 DNA 片段筛选[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):20-25.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.006

# 枳壳分子生药鉴别 DNA 片段筛选

张鑫<sup>1</sup>,廖亮<sup>2</sup>,李同建<sup>2</sup>,徐玲玲<sup>2</sup>,韩兴杰<sup>2</sup>,张寿文<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学,江西南昌 330004; 2. 九江学院生命科学学院,江西九江 332000)

**摘要:**设计特异性引物,对 22 份枳壳样本进行扩增、测序,利用 Genious 软件进行序列比对与人工校正,并查找低拷贝序列和 ITS 序列的杂合位点,利用 Mega5.0 软件构建叶绿体序列进化系统树。结果表明:*accI* 基因和 ITS 序列杂合率高,无法成功鉴别枳壳品种,叶绿体基因可以鉴别枳壳正品与伪品柚;叶绿体基因是枳壳品种鉴定的重要片段,为枳壳品种的鉴定奠定基础。

**关键词:**枳壳;鉴别;核基因;ITS;叶绿体基因

**中图分类号:** S567.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0020-06

枳壳为芸香科植物酸橙(*Citrus aurantium* L.)及其栽培变种的干燥未成熟果实,枳壳首载于《神农本草经》,宋朝以前所用枳壳的原植物为芸香科枸橼(*Poncirus trifoliata*),明代原植物演变为芸香科植物酸橙<sup>[1]</sup>。枳壳栽培历史悠久,并常与柑橘林混交,不断选择产生了许多栽培品种,导致枳壳类药材的来源复杂化。蔡逸平等对枳壳类药材进行了品种整理和产地原植物调查,结果表明柑橘属多种植物的果实在不同地区作枳壳用,酸橙(*C. aurantium*)及其变种臭橙(*C. aurantium* 'Xiucheng')、香橙(*C. aurantium* 'Xiangcheng')、枳橙(*C. aurantium* × *Poncirus trifoliata*)分布于长江流域及南方各省,以江西、四川、湖南等省产量最大,还包括香圆枳壳(*C. wilsonii* Tanaka)、甜橙枳壳[*C. sinensis* (L.) Osbeck]、红河枳壳(*C. hongheensis* Y. L. D. L.)、宜昌枳壳(*C. ichangensis* Swingle)、蟹橙枳壳(*C. junos* Tanaka)、柚枳壳[*C. grandis*

(L.) Osbeck]<sup>[2]</sup>。由于历史原因和各地用药习惯造成枳壳品种混乱,不法商家趁机掺入伪品,目前市场上主要以柚的未成熟果实充当枳壳<sup>[3]</sup>,其有效成分含量明显低于枳壳正品,没有达到临床用药的含量标准,造成了市场混乱,所以枳壳药材的基源鉴别很重要。

DNA 条形码是近年来生物分类和鉴定的研究热点和方向,该技术不受个体形态和发育阶段的限制,具有独一无二的可重复性,对于在形态上较难鉴定的同属近缘种,可以利用较短的基因保守序列进行种的鉴定<sup>[4]</sup>。曹晖通过分析 6 种姜黄属药用植物的 *trnK* 基因,发现序列可变区包括 *matK* 基因编码区和 *trnK* 外显子与 *matK* 内含子之间的区域,共有 6 个单核苷酸多态(SNPs)位点、1 个 9 bp 的缺失重复序列和 4、14 bp 插入重复序列,它们可以作为 6 种川产姜黄属药用植物的分子鉴定标记<sup>[5]</sup>。高建平等应用 ITS 序列比较了不同产地南五味子的基源植物华中五味子及混淆品绿叶五味子的差异及其规律,认为 ITS 序列可作为中药南五味子与混淆品绿叶五味子良好的分子标记<sup>[6]</sup>。基因组中含有丰富的遗传信息,运用核基因序列或叶绿体基因序列鉴定药用植物及生药,已成为分子生药学领域的发展趋势。本研究选取不同来源、不同类型的枳壳样本 22 份,对 15 个低拷贝核基因序列、ITS 序列、叶绿体基因进行筛选,以期获得可以鉴别枳壳品种的

收稿日期:2014-02-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260044)。

作者简介:张鑫(1989—),女,江苏丹阳人,硕士研究生,主要从事中药资源研究。E-mail:zhangxinninteen@126.com。

通信作者:张寿文,博士,教授,主要从事中药资源开发与利用研究。E-mail:wztsw@163.com。

[14] Nishiyama I. Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants[J]. Proceeding of the Crop Science Society of Japan,1970,39(1):65-69.

[15] 王才林,仲维功. 高温对水稻结实率的影响及其防御对策[J]. 江苏农业科学,2004(1):15-18.

[16] Tian F, Li D J, Fu Q, et al. Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits[J]. Theoretical and Applied Genetics,2006,112(3):570-580.

[17] Xiao J, Li J, Grandillo S, et al. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*[J]. Genetics,1998,150(2):899-909.

[18] Sawada S. Studies of sterile-type cool injury in rice plants with

special reference to the mechanism and inheritance of sterility[J]. Res Bull Obihiro Zotech Univ Ser,1978,10(4):837-884.

[19] Khan D R, Mackill D J, Vergara B S. Selection for tolerance to low temperature induced spikelet sterility at anthesis in rice[J]. Crop Science,1986,26(4):694-698.

[20] Kaw R N, Visperas R M, Moon H P, et al. Estimates of combining ability for vegetative stage cold tolerance in rice[J]. Korean J Breed,1986,18(1):48-52.

[21] 周丽慧,谢永楚,陈涛,等. 水稻剑叶形态与产量的关系及相关性状的 QTL 分析[J]. 江苏农业学报,2012,28(6):1207-1211.

[22] Kaw R N, Moon H P, Yae J D, et al. Estimates of combining ability for cold tolerance at reproductive stage in rice[J]. Korean J Breed,1989,21(3):188-195.

DNA 片段,并根据枳壳品种特征选取可以用于快速鉴定枳壳的分子标记方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料采集于江西省、湖南省、四川省三大枳壳产区。采集新鲜完整的嫩叶,用硅胶迅速干燥,于-80℃保存。22份试验材料见表1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 用改良的 CTAB 法<sup>[7]</sup>提取 DNA,于-20℃冰箱保存。

1.2.2 引物设计与筛选 选取系统发育分析中常用的 15 个低拷贝序列,从甜橙全基因组中获取以上低拷贝序列全长,设

计 48 对引物,扩增以上序列内含子区域,以新干界埠的臭橙为 DNA 模板扩增,与甜橙对应序列进行比对,验证为同源序列并确定突变速率后,选取 2 个片段对 22 份样品进行扩增,检测其变异速率,验证片段的可用性。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,具体引物信息如表 2。

1.2.3 扩增与测序 PCR 反应体系 60 μL:1×buffer,250 μmol/L MgCl<sub>2</sub>,200 μmol/L dNTP,3U TaqDNA 聚合酶,2 μL DNA 模板,正向引物、反向引物各 0.5 μmol/L。反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,退火(退火温度由引物序列决定)30 s,72℃延伸 50 s,35 个循环;72℃延伸 5 min,10℃保存。扩增产物送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

表 1 供试枳壳情况

编号	拉丁名	来源	标本号
1	<i>C. aurantium</i> ‘Xiucheng’	江西省新干县三湖镇(臭)	H72408
2	<i>C. aurantium</i> ‘Xiangcheng’	江西省新干县三湖镇(香)	H724X04
3	<i>C. aurantium</i> ‘Xiucheng’	江西省新干县荷浦乡关帝庙(臭)	G72511
4	<i>C. aurantium</i> ‘Xiangcheng’	江西省新干县荷浦乡关帝庙(香)	G725X19
5	<i>C. aurantium</i> ‘Xiucheng’	江西省新干县界埠镇(臭)	J72501
6	<i>C. aurantium</i> ‘Xiangcheng’	江西省新干县界埠镇(香)	J817X02
7	<i>C. aurantium</i> ‘Xiucheng’	江西省新干县北坑村	B72501
8	<i>C. aurantium</i> ‘Xiucheng’	江西省樟树市刘公庙镇	L72516
9	<i>C. aurantium</i> ‘Xiucheng’	江西省樟树市黄土岗谢家村	X72610
10	<i>C. aurantium</i> ‘Xiucheng’	江西省樟树市黄土岗谢家村	X72649
11	<i>C. aurantium</i> × <i>Poncirus trifoliata</i>	湖南省洪江市安江镇	A82110
12	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	湖南省洪江市安江镇	A82149
13	<i>C. aurantium</i>	湖南省益阳市沅江	Y82314
14	<i>C. aurantium</i>	湖南省益阳市沅江	Y82350
15	<i>C. aurantium</i>	四川省巴中市南江镇	N90910
16	<i>C. aurantium</i>	重庆市安富镇普陀村	AF91109
17	<i>C. aurantium</i>	重庆市安富镇李家寨	AFL91117
18	<i>C. aurantium</i>	重庆市江津区夏坝镇	XB91207
19	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	四川省成都市谢家镇	XJ91301
20	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	四川省成都市谢家镇	XJ91309
21	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	四川省成都市谢家镇	XJ91318
22	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	四川省成都市谢家镇	XJ91327
23	<i>C. maxima</i>	NCBI GQ435433.1	

1.2.4 数据处理 利用 Geneious 软件评价测序结果的序列质量,将正向序列、反向序列进行拼接,去除两端质量较差的片段。同时使用该软件的 Find hybridization site 功能查找低拷贝序列和 ITS 中的杂合位点,统计结果。将叶绿体基因 *psbA-trnH* 和 *trnL-F* 拼接,利用 Clustal W 软件对已整理的序列进行比对,利用 Mega5.0 软件的邻接法(NJ tree)构建 22 个枳壳样本的系统树,自展次数(bootstrap)为 1 000,其他参数设为默认值。

2 结果与分析

2.1 48 个扩增片段测序统计

测序结果显示, *acc1*、ITS 序列、叶绿体 *psbA-trnH* 和 *trnL-F* 序列扩增成功,其他核基因片段虽能扩增成功,但测序叠峰较多,序列判读困难。

2.2 *acc1* 基因序列分析

由表 3 可见, *acc1-1* 片段扩增长度为 620~621 bp,有 34

个突变位点,其中杂合位点有 32 个,杂合率高达 97%,信息位点 6 个,变异位点占总序列长度的 5.5%,信息位点占 1.0%。由表 4 可见, *acc1-2* 扩增片段长度为 476~498 bp,有 12 个突变位点,5 个信息位点。

2.3 ITS 序列分析

ITS 的扩增片段长度为 464 bp,共 9 个突变位点(表 5),全部含有杂合位点,变异位点占总长度的 2.0%;信息位点 8 个,占总长度的 1.7%。ITS1 长度为 150 bp,其中含有 4 个杂合位点,5.8S 长度为 165 bp,没有发生突变,ITS2 长度为 149 bp,含有 5 个杂合位点。

2.4 叶绿体片段序列分析

*PsbA-trnH* 的扩增长度为 415~419 bp,有 12 个突变位点,10 个信息位点,变异位点占总长度的 2.9%,信息位点占总长度的 2.4%。在 166~173 bp 出现了 ATGCCACT 碱基的缺失,在 296~297 bp 出现 AA 碱基的缺失。*trnL-F* 片段的扩增长度为 921~928 bp,有 3 个突变位点,在 301~306 bp

表 2 引物序列信息

序列名称	引物序列(5'→3')	退火温度 (℃)	长度 (bp)
<i>acc1-1</i>	F:ACCCAGATAGGAATTTGAGGCC;R:GGGCTCCTGATTGGTACAGC	62	800
<i>acc1-2</i>	F:AATTTGTGGAAGTTCCTGGCG;R:TCAGGGATCTCGGAGGCAT	60	600
<i>acc1-4</i>	F:CGGCTAGAAGGTTGGCCA;R:AAGCATCATACACTCCACCGTG	62	850
<i>acc1-6</i>	F:CATGCCCCGTGTAATTGTTCACT;R:TCCCCATCCTCAGTAAACATCTC	60	1 200
<i>acc1-8</i>	F:GACAGGCAAATGCTGCCTG;R:GACCCCGCACAGCAACTG	58	750
<i>dhar-1</i>	F:TGGCTACGGATCCTCTTTGAAG;R:TCAACAACACCCCTTTGGCAA	60	800
<i>dhar-2</i>	F:ATCGAGGAAAAGCATCTCCCA;R:TGGGTCCAGGGACAAATC	62	1 200
<i>dhar-3</i>	F:TGGTCGGTTCCAGATTCACCT;R:ACATCATCTGGGAGTGTCTTTGT	62	1 000
<i>flo-1</i>	F:GCTGTTAGGGCTGAGAGGAGAA;R:TCCTTATCTTGCTGCACCCGG	57	550
<i>flo-2</i>	F:AGCAATGCCGTGATTTCTTGA;R:AATATAGCTCGCTCCGGCCT	57	600
<i>gbs-1</i>	F:CCATGGAGCAAAACTGGTGG;R:CCGGTTTTGCGGATGATATT	65	1 300
<i>gbs-2</i>	F:TCAGTGGCATTGTGAATGGC;R:TCCGGCGATGATCTTATGTG	57	550
<i>gbs-3</i>	F:CGCCGAGCTGATTTTATGT;R:CAACCTCCATACTCAACAGCATCTT	57	600
<i>nep1-1</i>	F:GGTGTACCAAAGAGACCAAAAA;R:CATCCTCATCTGCCATTGCA	65	1 300
<i>nep1-2</i>	F:GAGGATCTACTCAATTTGGACATCAC;R:TGTTTGTAGGGATGGGCTCG	58	750
<i>nep1-3</i>	F:GCTGCTGAAATTTTCAGTAACTCG;R:GCCTACACTGGGACCAACTTGA	60	800
<i>nep1-4</i>	F:TGGTCCCAGTGTAGGCATTG;R:TTCTTCACCATAAGCACTGATGT	60	800
<i>nep1-5</i>	F:GAGAAGGCTAACAGGAAAGCATGA;R:GGGTCCATGTTTGAAGCTGG	60	800
<i>nep2-1</i>	F:TCTCAACGATCTCTCAACCTTAA;R:AAAACTTGGCGGCATTGAA	62	850
<i>nep2-2</i>	F:GTTTTCGGCCACCCCG;R:CCAACCTGGCCACCCCAA	65	1 600
<i>nep2-3</i>	F:CACTACAAAGCTTGCCTTTACGC;R:TGGGTCCATGTTTGAAGCTG	65	1 150
<i>pgi-1</i>	F:CCGCAATCCACCTCATCC;R:GCACGAAGAGCTACATGAAGCA	65	1 300
<i>pgi-2</i>	F:GCTCTTCGTGCTCCAAGGG;R:TTTCAGCCGTTGTAAAAGCTTTTG	62	900
<i>pgi-3</i>	F:ACGGCTGAAACTATGCTGAATG;R:AAGAGACAGAGGCAAAACCCC	63	1 100
<i>pgi-4</i>	F:TTTGCTCTGTCTCTTCAATATGG;R:AGGTGCAGAAATGAAATGCTGAT	62	870
<i>pgi-5</i>	F:TTGGAGCATTGATCAGCATTTT;R:CAGAGGGATGTGTGTGAACCTG	58	650
<i>phya1-1</i>	F:TTTCTTCGCCTCTTCAGCTCA;R:TGATTTCCTGTATTGCTGGATG	58	700
<i>phya1-2</i>	F:ATCGCTGAGTTAACCGGCC;R:CTCGCACAGGCATTCAAT	58	600
<i>phya1-3</i>	F:AACGGCTTTTGATACCAGTG;R:TCAGCTAAGACCTGTTGAAGCCT	63	1 000
<i>phya2-1</i>	F:CAAAGCAGCTGAATCAGAGT;R:CCACTGGTTTCTCGAGGACC	58	700
<i>phya2-2</i>	F:AGACGAGCGTATTGTGTCAGGA;R:GCTTCCCCGAGTTGAACTC	58	700
<i>phya3-1</i>	F:TGCAAAAGTTGCCGAATTGA;R:GTCTTGACCCACGAAGCACA	58	600
<i>phya3-2</i>	F:TGGCTTATATACGGCAAGAGGTG;R:TGGAATGTCATGGAGAAGATGC	60	750
<i>phya3-3</i>	F:GCACCTTCTCCAGATGGCTG;R:TGAGAGGGAATGCCTTCACC	58	650
<i>phya4-1</i>	F:TGTTGATGTTATGCGCGTG;R:TCTGCACCAAAATGCTCTCAATTT	62	950
<i>phya4-2</i>	F:CTCACTCTTGGAGGCCACTGA;R:TGGCTAACACAGCATTTATGACA	60	700
<i>phya4-3</i>	F:CCATGTTCTGTCACATTTGAAG;R:CAGCTCAGGAGGAAGCCCTT	65	1 400
<i>pis-1</i>	F:GCTAGCTCTGGCAAGATGCAC;R:TTGATTCTTTCAATTTATTGCTGA	58	700
<i>pis-2</i>	F:ACCTCAGCAATGAAATTGAAAGAA;R:CCGACCATGCAAGTTCAACTT	65	1 400
<i>aga-1-1</i>	F:TGACCTTCTGCAAGAGGCG;R:AACAATGGAGGGAGGTGATCTC	58	800
<i>aga-1-2</i>	F:TGAGCTCTTGGTTTGGTGAATACA;R:TTTTGTCACTAATGGAAGAAACTGAA	57	750
<i>aga-1-3</i>	F:CCATACCAGACCGAGATGAAGTT;R:GCCGTCCGAGTCCGACT	57	600
<i>aga-1-4</i>	F:TGCGAGCCAATGAGAGACTTC;R:CAAATTGTGCCGTCTCAACG	57	600
<i>aga-1-5</i>	F:TTGGTTGATTTGACCGTTGAGA;R:TTTGAGGTATCTGCAGTGGCC	57	650
<i>aga-2-1</i>	F:AGGTACAAGAAGGCCACTGCAG;R:TGATTGCATCGACGGTGCT	58	800
<i>aga-2-2</i>	F:GGTCAATTACCATAAATAATTTTATCTAGG;R:AAGGATACAATAGCAATGAGCATAACA	57	600
<i>aga-2-3</i>	F:TCAGCATCAATGTGGCTCCA;R:TAGATACCTCTTCTGCATGTACTCAA	57	600
<i>aga-3</i>	F:ACATAATGTTGCCCTTCAGTGCG;R:ATGAAGAACCAAGGCATGGA	57	700
<i>ITS</i>	F:AGAACTCGTAACAAGGTTTC;R:TCCTCCGCTTATTATATGC	48	
<i>trnL-F</i>	F:CGAAATCGGTAGACGCTACG;R:ATTTGAACTGGTGACACGAG	48	
<i>PsbA-trnH</i>	F:GTTATGCATGAACGTAATGCTC;R:CGCGCATGCTGGATTCACAATCC	48	

表 3 *accl-1* 的突变位点

编号	突变位点(bp)																
	18	35	59	70	77	96	131	188	227	254	274	279	294	323	342	346	347
1	A	R	Y	C	K	R	R	C	T	R	T	Y	G	W	T	T	K
2	A	G	C	C	T	R	R	Y	T	A	T	Y	G	T	W	T	T
3	A	G	Y	C	K	G	R	C	T	R	T	Y	G	W	T	T	K
4	A	G	C	C	T	R	R	Y	T	A	T	Y	G	W	T	T	T
5	A	R	Y	C	K	R	R	C	T	R	T	Y	G	W	T	T	K
6	R	G	C	C	T	R	A	C	K	A	G	Y	S	W	T	Y	T
7	A	A	T	C	G	G	G	C	T	G	T	T	G	T	T	T	G
8	A	G	C	C	T	R	R	Y	T	A	T	Y	G	W	W	T	T
9	A	G	C	C	T	R	R	Y	T	R	T	Y	G	T	W	T	T
10	A	R	Y	C	K	R	R	C	T	R	T	Y	G	W	T	T	K
11	A	G	C	C	T	G	R	Y	T	R	T	T	G	T	W	T	T
12	A	G	C	Y	T	G	G	T	T	G	T	T	G	T	W	T	T
13	A	G	C	C	T	R	R	Y	T	R	T	Y	G	W	T	T	T
14	A	G	C	Y	T	G	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	T
15	A	G	C	C	T	G	G	T	T	G	T	T	G	T	W	T	T
16	A	R	Y	C	K	R	R	C	T	R	T	Y	G	W	T	T	K
17	A	G	C	C	T	R	R	Y	T	R	T	Y	G	T	W	T	T
18	A	G	C	T	T	G	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	T
19	A	G	C	Y	T	G	G	T	T	G	T	T	G	T	W	T	T
20	A	G	C	Y	T	G	R	Y	T	R	T	T	G	T	T	T	T
21	A	G	C	C	T	R	R	Y	T	R	T	Y	G	W	T	T	T
22	A	G	C	T	T	G	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	T

编号	突变位点(bp)																
	354	355	395	406	412	445	454	473	483	494	502	513	524	538	540	544	571
1	C	C	S	Y	Y	A	K	C	R	A	S	G	A	G	W	A	G
2	C	C	S	C	T	—	G	C	A	A	G	S	A	G	W	A	G
3	C	C	S	Y	Y	—	K	C	R	A	S	G	A	G	W	A	G
4	C	C	C	C	T	A	G	C	A	A	G	G	W	R	W	A	R
5	C	C	S	Y	Y	—	K	C	R	A	S	G	A	G	W	A	G
6	Y	C	C	C	T	—	G	Y	A	R	G	G	A	G	W	A	G
7	C	C	G	T	C	—	T	C	G	A	C	G	A	G	A	A	G
8	C	C	C	C	T	A	G	C	A	A	G	S	W	G	W	A	G
9	C	C	S	C	T	—	G	C	A	A	G	S	W	G	W	A	G
10	C	C	S	Y	Y	—	K	C	R	A	S	G	A	G	W	A	G
11	C	Y	S	C	T	—	G	C	A	A	G	S	A	G	W	A	G
12	C	C	G	C	T	—	G	C	A	A	G	S	A	R	A	R	G
13	C	C	S	C	T	A	G	C	A	A	G	G	W	R	W	A	R
14	C	C	G	C	T	—	G	C	A	A	G	G	A	A	A	R	R
15	C	C	G	C	T	—	G	C	A	A	G	S	A	R	A	A	R
16	C	C	S	Y	Y	—	K	C	R	A	S	G	A	G	W	A	G
17	C	C	S	C	T	—	G	C	A	A	G	S	A	G	W	A	G
18	C	C	G	C	T	—	G	C	A	A	G	G	A	A	A	G	G
19	C	C	G	C	T	—	G	C	A	A	G	S	A	R	A	R	G
20	C	Y	S	C	T	—	G	C	A	A	G	G	A	R	W	R	G
21	C	C	S	C	T	—	G	C	A	A	G	G	W	R	W	A	R
22	C	C	G	C	T	—	G	C	A	A	G	G	A	A	A	G	G

处出现了 GAAAAA 碱基的缺失,在 378 ~ 384 bp 处出现了 AATCATT 碱基的缺失。从图 1 聚类结果可以看出,22 个样本主要聚为 2 支,A 支为酸橙,B 支为甜橙,C 支为枳壳伪品柚。

3 结论与讨论

3.1 测序产生叠峰的原因

扩增的 48 个片段中测序正常的只有 *accl-1*、*accl-2*、*ITS*、*psbA-trnH*、*trnL-F* 等 5 个片段,其他核基因测序叠峰过

多的原因可以归纳为 2 个方面:(1)选取的低拷贝基因在其他类群中虽然为低拷贝序列,但在枳壳中可能不是低拷贝;(2)枳壳是栽培果树,种群杂合度高,这与栽培品种选育过程中的定向高度选择有关<sup>[8-9]</sup>,扩增产物杂合性较高导致测序失败,通过挑取单克隆可以正常测序,但由于其来源复杂,不适用于中药材的快速鉴定。

3.2 *accl* 核基因序列的特征

只有 7、18 号样本的 *accl* 基因为纯合,其他样本都含有杂合位点,表明 *accl* 基因可能为单拷贝基因。Gornicki 等研

表 4 *acc1* -2 序列的突变位点

种类	突变位点(bp)											
	387	19	40	41	47	63	69	141	298	317	343	380
2	C	A	-	A	T	A	T	T	G	T	G	A
3	M	W	-	M	Y	A	Y	W	R	T	R	M
4	C	A	-	M	Y	A	Y	W	R	Y	R	M
5	C	A	-	M	T	A	Y	W	G	Y	G	M
6	M	-	G	A	T	A	T	w	G	Y	G	A
7	C	T	G	A	T	A	T	A	G	C	G	A
8	C	W	-	A	T	A	T	A	A	T	A	C
9	C	T	-	A	Y	A	T	T	G	Y	G	A
10	C	A	-	A	T	A	T	T	G	C	G	A
12	C	A	G	A	C	A	C	A	G	T	G	A
13	M	-	G	M	Y	A	Y	A	G	Y	R	A
14	C	T	-	M	Y	A	T	A	R	T	G	A
15	M	W	-	C	T	A	T	A	R	Y	A	A
16	M	-	R	M	Y	A	T	A	G	Y	R	A
17	M	T	R	A	T	A	T	A	G	Y	G	A
18	M	T	-	M	Y	G	Y	A	G	C	R	A
19	C	-	G	M	T	A	T	A	G	T	G	A
20	M	-	G	A	Y	A	T	A	R	T	G	A
21	C	-	R	M	T	A	Y	A	R	Y	G	A
22	C	-	G	M	T	A	T	A	G	T	G	A

注:1、11 号样本 *acc1* -2 序列测序不成功。

表 5 ITS 序列的突变位点

编号	突变位点(bp)								
	415	30	91	97	119	323	349	358	395
1	Y	C	C	Y	C	C	Y	C	A
2	Y	Y	Y	Y	Y	C	T	Y	A
3	Y	C	C	Y	Y	C	Y	Y	M
4	Y	C	C	Y	C	C	Y	C	M
5	Y	C	C	Y	C	C	Y	C	M
6	Y	C	C	Y	C	C	Y	C	M
7	Y	Y	Y	Y	Y	C	Y	Y	M
8	Y	C	C	Y	C	C	Y	C	M
9	Y	Y	T	Y	C	C	C	C	C
10	C	C	C	Y	C	C	C	C	C
11	Y	Y	C	T	C	C	T	C	A
12	Y	C	C	Y	C	C	Y	C	M
13	T	C	Y	T	C	C	T	Y	A
14	Y	T	T	Y	G	G	C	T	A
15	Y	C	C	T	C	C	T	C	A
16	Y	Y	Y	Y	C	Y	Y	C	A
17	Y	Y	Y	Y	C	Y	T	Y	A
20	Y	Y	Y	Y	Y	C	Y	Y	M
21	C	T	T	Y	G	G	C	T	A
22	Y	C	Y	Y	C	C	Y	C	M

注:18、19 号样本的 ITS 未能成功测序。

究发现,六倍体小麦质体 *Accase* 基因(*acc1*)为单拷贝核基因,被定位在染色体短臂普通小麦第二同源群上<sup>[10]</sup>,*acc1* 基因的染色体定位、基因专一性及其在绝大多数禾本科植物中都是单拷贝的<sup>[11-12]</sup>。单拷贝基因出现较多的杂合位点,可能与枳壳品种本身的杂合程度较高有关,高度的杂合性导致低拷贝核基因叠峰较多,测序困难,因此单拷贝核基因可能不适

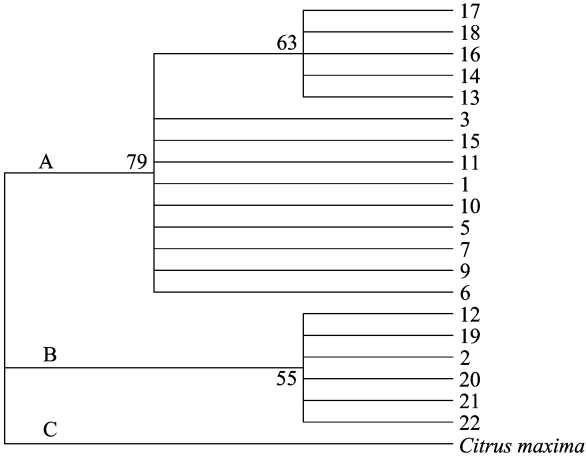


图1 基于*psbA-trnH*、*trnL-F*的 NJ 聚类图

用于枳壳品种的鉴定。  
3.3 ITS 序列特征  
*ITS* 的长度和序列变化较大,常用于物种鉴定和系统进化研究<sup>[13]</sup>。*ITS* 为串联重复序列,研究时必须考虑这些拷贝在基因组内的变异,但其存在一致性进化的特征,使整个基因组内所有拷贝趋于均一化,而且这种均一化似乎在大多数物种中相当有代表性。相对于 *ITS2* 而言,*ITS1* 序列较长,演化速率较快,种内变异较大,*ITS2* 和 5.8 S 比较保守<sup>[14]</sup>。Chen 等测试了 *ITS2* 对药用植物的鉴定能力,建议 *ITS2* 作为药用植物鉴定的标准条形码序列<sup>[15]</sup>。*ITS2* 更适用于药材和标本等 DNA 已部分降解的样品鉴定,*ITS2* 序列变异较大,并且具备二级结构,为鉴别物种提供独特的分子形态特征。但本研究显示,*ITS* 共有 9 个突变位点,但全部含有杂合位点,表明序列的杂合性很高,可能与枳壳频繁的自然杂交或人为的杂

交育种有关。枳壳生命周期长,嫁接及无融合生殖等无性繁殖方式使得一致性进化速度较慢,杂合位点长期存在于基因组中,因此 ITS 序列不适合被应用于枳壳品种的鉴定。

### 3.4 叶绿体基因的扩增

与核基因序列相比,叶绿体基因组 DNA 具有分子量小、拷贝数量多、结构简单等特点,这些都有利于对叶绿体基因组进行分析<sup>[16]</sup>。叶绿体基因组保守性较强,含有特征性的重复顺序,它的遗传方式多以母系遗传为主,具有单亲遗传特点,不受物种杂合性影响<sup>[17]</sup>。由 *psbA-trnH-trnL-F* 聚类图可知,不同产区的 22 个枳壳样品主要分为 A、B 2 支,其中 A 支由酸橙组成,自展支持率为 80%,B 支由甜橙组成,C 支为市场上常用的伪品柚,从图 1 中能区分开枳壳的伪品与正品。*psbA-trnH* 位于编码光合系统 II 反应中心的 D1 蛋白的 *psbA* 基因和编码 tRNA 组氨酸的 *trnH* 基因之间,被认为是被子植物叶绿体基因组中变异位点最多的序列之一,由于 *psbA-trnH-trnL-F* 基因的非编码区受外界选择压力小,进化速率较快,因此已被广泛应用于药用植物种间的鉴别研究<sup>[18-19]</sup>。本研究表明,叶绿体基因可以区别枳壳及其伪品柚,据报道,叶绿体基因同样成功地鉴别了其他药用植物,如 Yang 等对大黄属 13 个种、26 个居群、49 个样本的 *trnL-F* 间隔区的序列进行了测定和分析,找出了大黄属植物该段序列的变异特征,根据分析结果设计了大黄特异性引物,用于鉴别大黄,结果理想<sup>[18]</sup>。Han 等应用 *psbA-trnH* 序列成功鉴定了肉苁蓉及其伪品<sup>[20]</sup>。这些研究结果为实现药用植物品种的分子鉴别奠定了基础。本研究通过将 *psbA-trnH-trnL-F* 这 2 个片段序列用于枳壳品种的鉴定,为中药材的鉴定提供分子方面的证据,以期更好地保证中药材质量。

### 3.5 结论

本研究用 *acc1* 等 15 个低拷贝核基因序列、ITS 序列、叶绿体基因对 22 个枳壳样本进行扩增,测序正常的只有 *acc1-1*、*acc1-2*、ITS 序列、*psbA-trnH* 序列、*trnL-F* 序列,结果表明 *acc1* 等低拷贝核基因序列和 ITS 序列都不适用于药用植物枳壳的品种鉴别,原因可能是枳壳频繁杂交导致的杂合位点长期存在于基因组中,然而叶绿体的 *psbA-trnH-trnL-F* 序列不受杂交影响,可以把伪品与枳壳正品区分开,但有些分支的支持度较低,在以后研究中可以使用多个叶绿体片段组合对枳壳的遗传关系进行更准确的研究。虽然本研究筛选的以上序列无法鉴定枳壳品种来源,但 *psbA-trnH-trnL-F* 这 2 个叶绿体基因间隔区可以将甜橙、酸橙及柚区分开,为利用分子标记技术鉴别枳壳品种及辨伪工作奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 谢宗万. 论枳实、枳壳古今药用品种的延续与变迁[J]. 中医药研究,1991,1(1):19-22.
- [2] 蔡逸平,曹 岚,范崔生. 枳壳、枳实类药材的品种考证和资源应用的调查研究[J]. 江西中医学院学报,1998,10(4):184-186.
- [3] 于文敏,高 宾,孙利生. 枳壳的炮制加工与伪品鉴别[J]. 首都医药,2009(11):38.
- [4] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. Proceedings of the National Academy

- of Sciences of the United States of America, 2008, 105(8):2923-2928.
- [5] 曹 晖. 6 种川产姜黄属药用植物叶绿体 *trnK* 基因序列变异分析及其分子鉴定[J]. 药学报,2003,38(11):871-875.
- [6] 高建平,王彦涵,乔春峰,等. 中药南五味子及其混淆品绿叶五味子果实的 ITS 序列分析[J]. 中国中药杂志,2003,28(8):706-710.
- [7] 廖 亮,李同建,刘中来,等. 基于细胞学和 DNA 序列的苎麻与其野生近缘类群系统关系研究[J]. 作物学报,2009,35(10):1778-1790.
- [8] 暴朝霞,黄宏文. 板栗主栽品种的遗传多样性及其亲缘关系分析[J]. 园艺学报,2002,29(1):13-19.
- [9] 冯 超,朱长青,徐昌杰,等. RNA-Seq 在果树学研究中的应用[J]. 果树学报,2014(1):115-124.
- [10] Gornicki P, Faris J, King I, et al. Plastid-localized acetyl-CoA carboxylase of bread wheat is encoded by a single gene on each of the three ancestral chromosome sets[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(25):14179-14184.
- [11] Huang S X, Sirikhachornkit A, Su X J, et al. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(12):8133-8138.
- [12] Faris J, Sirikhachornkit A, Haselkorn R, et al. Chromosome mapping and phylogenetic analysis of the cytosolic acetyl-CoA carboxylase loci in wheat[J]. Molecular Biology and Evolution, 2001, 18(9):1720-1733.
- [13] Álvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29(3):417-434.
- [14] Quijada A, Liston A, Delgado P, et al. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of *Pinus rzedowskii* revealed by PCR-RFLP[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96(3/4):539-544.
- [15] 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.
- [16] 黄 瑶,李朝奎,马 诚,等. 叶绿体 DNA 及其在植物系统学研究中的应用[J]. 植物学通报,1994(2):11-25.
- [17] 李文哲. 植物叶绿体 DNA 与线粒体 DNA 的遗传变异[J]. 细胞生物学杂志,1988(1):5-10.
- [18] Yang M, Zhang D, Liu J, et al. A molecular marker that is specific to medicinal rhubarb based on chloroplast *trnL/trnF* sequences[J]. Planta Medica, 2001, 67(8):784-786.
- [19] Kojoma M, Kurihara K, Yamada Kazuya, et al. Genetic identification of cinnamon (*Cinnamomum* spp.) based on the *trnL-trnF* chloroplast DNA[J]. Planta Medica, 2002, 68(1):94-96.
- [20] Han J P, Song J Y, Liu C, et al. Identification of *Cistanche* species (Orobanchaceae) based on sequences of the plastid *psbA-trnH* intergenic region[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2010, 45(1):126-130.