

冯媛媛,夏 珊,曾其国,等. 基于 ITS 序列对紫薇的分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):67-69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.022

基于 ITS 序列对紫薇的分子鉴定

冯媛媛,夏 珊,曾其国,冯 鸿,薛飞龙,赖 麟

(成都师范学院化学与生命科学学院,四川成都 611130)

摘要:对紫薇属植物细胞核糖体 DNA 转录间隔区(nrDNA ITS)序列进行分析,为紫薇植物的鉴定提供分子依据。通过提取紫薇幼苗总 DNA,对 nrDNA ITS 序列进行 PCR 扩增测序,应用软件 BioEdit、DNAMAN 进行序列分析,MEGA 计算遗传距离,构建基于 K2P 模型的 NJ 系统发育树。测序得到 2 条 nrDNA ITS 序列,长度均为 615 bp。序列分析结果显示,序列 1 与紫薇 ITS 序列相似性达 99.03%,遗传距离为 0.003,聚类分析归为一支;序列 2 与毛紫薇 ITS 序列相似性达 98.55%,遗传距离 0.007,聚类分析归为一支。试验结果说明,基于 nrDNA ITS 序列分析法,能够对紫薇属植物进行准确的分子鉴定,从而为紫薇属的种类鉴定和种间亲缘关系提供分子生物学理论依据。

关键词:紫薇;分子鉴定;ITS 序列;相似性

中图分类号:S685.990.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)04-0067-02

紫薇属(*Lagerstroemia* Linn.)植物为千屈菜科(Lythraceae)落叶或常绿的灌木或乔木,主要分布在亚洲东部、东南部、南部和澳大利亚的北部。我国目前共有紫薇属植物 24 种,其中 4 种为我国特有^[1]。紫薇属植物大多数种类有大而美丽的花,花期长达 3 个多月,具有较高的观赏价值,在园林绿化中得到广泛的应用。紫薇属少数植物被用作传统药物,如据我国民间记载,紫薇(*Lagerstroemia indica* L.)有活血、止血、消风、清热、解毒的功能,具有抗流感病毒、抗真菌作用,用于治疗产后血崩、洗疥癬瘡^[2];在菲律宾,大花紫薇(*Lagerstroemia speciosa* Pers.)的叶被用于治疗糖尿病和肾病^[3];在印度,小叶紫薇(*Lagerstroemia parviflora* Roxb.)被作为止咳药和收敛药使用^[4]。由于部分紫薇在自然生长状态下外观差异极小,仅靠传统的鉴定方法对其进行分类存有较大争议,需要分子生物学提供更多证据支持^[1]。

随着分子生物学在物种鉴定领域的发展,DNA 条形码技术在植物鉴定方面显示出极其重要的作用。在众多条形码中,细胞核糖体 DNA 内部转录间隔区(nrDNA ITS)序列因具有高分辨率的特点,被广泛用于被子植物物种鉴定和亲缘关系分析中^[5-6]。已有学者采用 RAPD、AFLP 等分子标记技术研究紫薇品种和种间亲缘关系^[7-8];但与 RAPD、AFLP、SSR 和 SRAP 等相比,采用 ITS 构建系统发育树,具有省时、省工和结果更加可靠等优点^[9]。本研究通过扩增待检测紫薇属植物的 ITS 片段,对 ITS 序列进行比较分析,对待检紫薇进行分类鉴定,探讨紫薇种内和种间的遗传变异以及它们之间的亲缘关系,为紫薇种质资源的鉴定及系统学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

紫薇种子购自云南昆明。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 菌株为笔者所在实验室保存。Pfu DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、pBLUE-T 载体、T₄ DNA 连接酶购自 Aidlab 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Tiangen 公司。

1.2 方法

紫薇种子灭菌萌发后,采用改良 CTAB 法^[10]提取幼苗总 DNA。参照 He 等的方法^[11],根据不同物种间同源基因的核酸序列相对保守的特点,设计紫薇属 ITS 的通用扩增引物:ITS-F:5'-GAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'和 ITS-R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',由成都金杰生物技术有限公司合成。PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃复性 45 s,共 30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物回收后,连接到 pBLUE-T 载体上,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选后送六合华大基因科技股份有限公司测序。

使用 BioEdit 软件编辑 ITS 序列,DNAMAN 软件比对分析序列同源性和 GC 含量,MEGA 软件分析 K2P(Kimura-2 parameter)遗传距离,用 NJ(Neighbor-Joining)法构建系统树,系统树各分支的置信度用自展检验法(bootstrap test)检验,共 1 000 次循环,以评价各分支的系统学意义与可靠性。

2 结果与分析

2.1 紫薇样品 nrDNA ITS PCR 扩增

以紫薇样品总 DNA 为模板进行 nrDNA ITS 序列的 PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1。样品 nrDNA ITS 序列 PCR 条带大小约 750 bp,主条带清晰,非特异性条带少。

2.2 ITS 序列分析

挑取 10 个紫薇样品各 2 个单克隆测序,获得样品 nrDNA ITS 序列长度为 721 bp,合并相同序列后,最终得到 2 条差异

收稿日期:2014-05-15

基金项目:四川省科技支撑计划(编号:2012FZ0049);四川省科技富民强县专项行动计划。

作者简介:冯媛媛(1970—),女,江苏淮安人,博士,讲师,主要从事植物发育生理与分子生物学研究。E-mail:fyuyang_12@163.com。

通信作者:赖 麟,硕士,教授,主要从事植物遗传育种研究。Tel:(028)66772002;E-mail:lailin127@126.com。

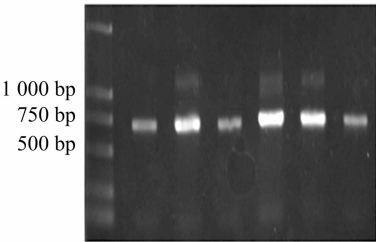


图1 部分紫薇样品 nrDNA ITS 片段扩增结果

表 1 紫薇样品 ITS 序列长度和 GC 含量比对

种类	ITS 序列长度(ITS1 + 5.8S + ITS2) (bp)	GC 含量(ITS1 + 5.8S + ITS2) (%)
样品序列 1	615(236 + 164 + 215)	64.4(67.3 + 56.1 + 67.4)
紫薇(AF201689.1)	618(236 + 164 + 218)	63.8(66.9 + 56.1 + 66.1)
样品序列 2	615(236 + 164 + 215)	64.4(66.9 + 56.1 + 67.9)
毛紫薇(AY035755.1)	618(237 + 164 + 217)	63.6(65.9 + 54.8 + 67.7)

2.3 紫薇遗传距离分析

使用 MEGA 软件分析 2 种紫薇样品序列与高同源性(90% 以上)紫薇 ITS 序列的 K2P 遗传距离,结果见表 2。与样品 1 距离最小的是紫薇(0.003),其次是毛紫薇和绒毛紫薇(*Lagerstroemia tomentosa*, AF201688.1),距离分别是 0.020 和 0.015,再次是大花紫薇和 *Lagerstroemia hirsuta*,距离都是 0.053,距离最远的是小叶紫薇(0.058)。与样品 2 距离最小的是毛紫薇(0.007),其次是紫薇和绒毛紫薇,距离分别是 0.013 和 0.018,距离较远的是大花紫薇、小叶紫薇和 *L. hirsuta*。

2.4 紫薇聚类分析

将 2 条紫薇样品 ITS 序列与紫薇属部分 ITS 序列进行系统进化聚类分析,外类群选取与紫薇属近缘的八宝树属(*Duabanga*)^[12],结果见图 2。从图 2 可以看出,ITS 序列构建的分子系统树上,样品 1 和紫薇聚成一类,样品 2 和毛紫薇聚

表 2 紫薇 ITS 序列种内种间 K2P 遗传距离

种类	遗传距离						
	1	2	3	4	5	6	7
2	0.035						
3	0.048	0.051					
4	0.058	0.064	0.064				
5	0.053	0.058	0.053	0.020			
6	0.062	0.065	0.056	0.025	0.012		
7	0.053	0.058	0.053	0.020	0.003	0.015	
8	0.051	0.056	0.056	0.007	0.013	0.018	0.013

注:1. 大花紫薇;2. 小叶紫薇;3. *Lagerstroemia hirsuta*;4. 毛紫薇;5. 紫薇;6. 绒毛紫薇;7. 样品 1;8. 样品 2。

为一类。紫薇、毛紫薇、绒毛紫薇聚为一个分支,大花紫薇、小叶紫薇、*L. hirsuta*(JX856469.1)聚为另外一个分支。

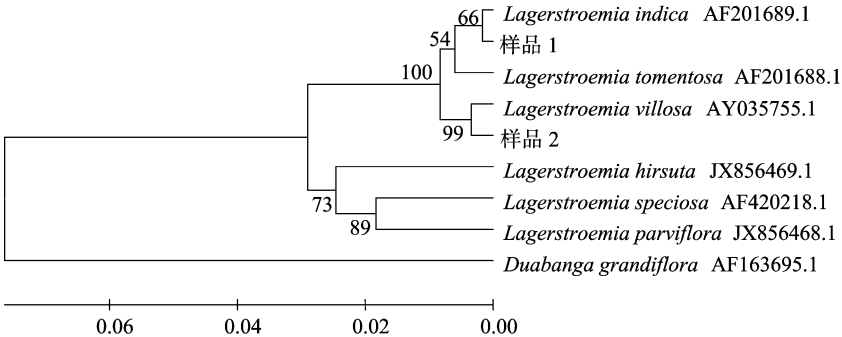


图2 基于紫薇 nrDNA ITS 序列的系统进化分析

3 讨论

ITS 序列 1 与紫薇 ITS 序列相似性为 99.03%,遗传距离为 0.003,聚类分析将其归为一支,由此可以确定含有 ITS 序列 1 的样品为紫薇;序列 2 与毛紫薇 ITS 序列相似性为 98.55%,遗传距离 0.007,聚类分析归为同一支,支持率 99%,可确定序列 2 样品为毛紫薇。此结果说明,可通过比对未知紫薇的 ITS 序列与已有紫薇的 ITS 序列来鉴别紫薇种类。

本研究对 NCBI 中紫薇 ITS 序列进行系统进化分析发现,

6 种紫薇属植物被聚为 2 类,大花紫薇、小叶紫薇和 *L. hirsuta* 亲缘关系较近,紫薇、毛紫薇和绒毛紫薇亲缘关系较近。根据外类群确定法,大花紫薇、小叶紫薇、*L. hirsuta* 出现较紫薇、毛紫薇、绒毛紫薇早,*L. hirsuta* 在 6 种紫薇植物中最原始。此结果与 Shi 等的研究结果^[12] 相似,说明 ITS 序列可以用于研究紫薇的亲缘关系。

本研究供试材料为市场上购买的同一批紫薇种子萌发后的幼苗,通过 ITS 测序,表明该批紫薇种子中有毛紫薇掺杂,但紫薇样品 ITS 序列与 NCBI 上紫薇 ITS 序列的差异是否稳定还需要收集更多的紫薇样本加以验证。

汤 莉, 查仁明, 张修宝, 等. 水稻包颈基因遗传分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 69–71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.023

水稻包颈基因遗传分析

汤 莉, 查仁明, 张修宝, 崔彦芹, 刘 洋, 罗洪发

(贵州大学农学院, 贵州贵阳 550025)

摘要: 携有包颈性状的水稻品种与花溪糯稻进行正交与反交, F_1 在抽穗期全部表现正常, 可以正常抽穗结实, 并且正交和反交 2 组杂交后代无明显差异, 由此可以推测控制水稻包颈性状的基因为隐性细胞核基因。同时, 包颈水稻突变体与花溪糯稻杂交组合 F_2 代在抽穗期出现包颈性状植株和正常抽穗植株的分离比经卡方测验完全符合 3:1 的遗传模式。由此可以推断, 控制水稻包茎性状的基因为细胞核单基因隐性遗传。通过观察统计结果推测可知, 控制水稻包颈性状的基因主要作用于水稻的拔节抽穗期, 表达特点为水稻各茎节无法正常拔高, 直接导致水稻稻穗不能正常拱出剑叶鞘, 间接导致水稻穗长较短, 穗粒数较少, 最终导致水稻减产, 但籽粒较饱满。

关键词: 水稻; 包颈突变体; 遗传分析

中图分类号: S511.032; Q344⁺.13

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)04-0069-03

包颈水稻在农业生产以及水稻育种中经常因为发生包颈而导致水稻减产, 所以研究包颈水稻的遗传信息具有重要的发育生物学意义和应用价值, 包颈水稻的研究一直是发育生物学的难点和热点。目前, 在水稻中已报道了 5 种包穗突变体(包括 *shp1*、*shp2*、*shp5*、*shp6* 和 *fsp*), 其中大多数表现为半包穗, 与 *esp2* 完全不同, 虽然 *fsp* 也表现为全包穗, 但它的

倒 1 节间至倒 5 节间均有不同程度的短缩, 不像 *esp2* 那样只特异地作用于倒 1 节间。迄今为止, 只有看到 *shp6* 基因被定位在 2 号染色体上的报道^[1-4]。包颈基因具有“一因多效”的功能, 除了控制株高外, 对其他的组织、器官也具有影响, 使稻穗包被于剑叶的叶鞘中, 内外稃不能正常打开^[5-7]。

水稻生长进入幼穗分化后期, 穗颈节间伸长, 幼穗开始突破叶鞘包被而伸出。有研究表明, 稻节间伸长受多种激素信号分子的调节, 不仅受生长促进型植物激素调节, 而且还受伸长抑制型激素调控。在生长促进型激素中, 赤霉素含量与茎伸长生长的关系最密切, 如果其合成及代谢途径受阻, 则会导致浓度下降及激素间的平衡关系发生改变, 影响植株高度和穗茎伸长; 脱落酸(ABA)为伸长抑制型激素, 对水稻茎伸长有独特的抑制作用, 其含量增加影响茎的伸长, 导致植株矮化^[3]。虽然生产上在不育系开始抽穗时应用赤霉素可以解

收稿日期: 2014-11-05

基金项目: 贵州省科学技术基金(编号: 黔科合 J 字[2007]2052 号);

贵州大学人才基金(编号: 贵大人基合字(2007)032 号)。

作者简介: 汤 莉(1989—), 女, 贵州清镇人, 硕士研究生, 从事种质资源创新与利用研究。E-mail: 19890915tangli@163.com。

通信作者: 罗洪发, 博士, 副教授, 从事种质资源创新与利用研究。

E-mail: lohofa@sina.com。

参考文献:

- [1] 王金凤, 柳新红, 陈卓梅. 紫薇属植物育种研究进展[J]. 园艺学报, 2013, 40(9): 1795–1804.
- [2] 江苏省植物研究所. 新华本草纲要: 第 3 册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 187.
- [3] Klein G, Kim J, Himmeldirk K, et al. Antidiabetes and anti-obesity activity of *Lagerstroemia speciosa*[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2007, 4(4): 401–407.
- [4] Mazumder A, Saha B P, Basu S P, et al. Evaluation of antitussive activity of *Lagerstroemia parviflora* leaf extract[J]. Phytotherapy Research, 2004, 18(9): 780–782.
- [5] China Plant BOL Group, Li D Z, Gao L M, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer(ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(49): 19641–19646.
- [6] 崔志伟, 王康才, 郑 晖, 等. DNA 条形码序列对不同品种金银花的鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 43–45.

- [7] Pooler M R. Molecular genetic diversity among 12 clones of *Lagerstroemia fauriei* revealed by AFLP and RAPD markers[J]. HortScience, 2003, 38(2): 256–259.
- [8] 顾翠花, 包志毅, 王守先, 等. 南紫薇、福建紫薇和 37 个栽培品种亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 730–735.
- [9] 侯新东, 尹 帅, 盛桂莲, 等. 基于 ITS 序列探讨 10 种荨麻科植物的系统发育关系[J]. 生物技术通报, 2013(8): 68–73.
- [10] 贾永平, 余占荣, 张红梅, 等. 紫薇基因组 DNA 的分离纯化[J]. 天津农业科学, 2013, 19(9): 1–3.
- [11] He Y, Hou P, Fan G, et al. Internal transcribed spacers(ITS) identification of *Angelica anomala* L. var. *chuanbaizhi* (in Chinese) cultivars collected in Sichuan and their molecular phylogenetic analysis with other *Angelica* L. species[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(16): 3653–3659.
- [12] Shi S H, Huang Y L, Tan F X, et al. Phylogenetic analysis of the sonneratiaceae and its relationship to lythraceae based on ITS sequences of nrDNA[J]. Journal of Plant Research, 2000, 113(3): 253–258.