

蔡升,杨平,续晨,等.超富硒植物壶瓶碎米荠 ITS 序列克隆与分析[J].江苏农业科学,2021,49(10):48-51.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.10.009

超富硒植物壶瓶碎米荠 ITS 序列克隆与分析

蔡升,杨平,续晨,蔡小宁

(南京晓庄学院食品科学学院,江苏南京 211171)

摘要:用 1 对通用引物对采集自湖北省恩施市鱼塘坝独特富硒矿床土壤上的壶瓶碎米荠叶片 DNA 进行 PCR 扩增,然后对 PCR 扩增产物测序,获得了长度为 852 bp 的包含核糖体基因转录间隔区的 DNA 序列。将获得的多条碎米荠属不同物种的核糖体基因转录间隔区的 DNA 序列进行比对,拼接出“基准”序列,然后再比较不同物种核糖体基因转录间隔区的序列与“基准”序列的碱基差异。结果表明,壶瓶碎米荠与“基准”序列相比,碱基差异最多,达到 17 处,远远超过同属其他物种与“基准”序列的碱基差异,是平均数的 3.3 倍。据此推测,某种碎米荠长期生长于恩施市富硒地区,产生了能够适应高含量硒土壤逆境的遗传变异,形成了超强富硒的能力,进化出了壶瓶碎米荠这一新物种,从而提出了壶瓶碎米荠在高含量硒土壤逆境中加速进化假说。

关键词:壶瓶碎米荠;硒;核糖体转录间隔区;遗传;进化;假说

中图分类号: Q755;S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)10-0048-04

壶瓶碎米荠(*Cardamine hupingshanensis*)是一种超富硒植物,能够忍耐土壤中高含量的硒,并能在体内大量积累。Yuan 等测得壶瓶碎米荠叶片中硒含量可达 1 965 mg/kg(干质量)^[1];Shao 等测得壶瓶碎米荠叶片中硒的含量为 1 427 mg/kg(干质量)^[2]。能够积累如此高含量的硒,说明壶瓶碎米荠具有独特的富硒机制,对其富硒的生理生化和分子机制开展研究,揭示富硒的科学原理,将有助于对农产品中硒含量进行调控,获得更多有益于健康的农产品,以造福于人类。

以往通过传统的分类学方法鉴定从野外采集的壶瓶碎米荠种质资源,对鉴定人的专业要求较高,经验不足就可能误采。随着分子生物学技术的发展,科学家已经研究出条形码识别技术,例如通过测定植物的核糖体基因转录间隔区序列(internal transcribed spacer, ITS)来对物种进行鉴定,为广大科技人员提供了便利^[3]。

本试验中,拟对采集自湖北省恩施土家族苗族自治州(恩施州)鱼塘坝独特富硒矿床土壤中生长

的壶瓶碎米荠提取 DNA,用通用引物进行 PCR,扩增其核糖体基因转录间隔区序列,获得相应的参考序列,为今后准确鉴定壶瓶碎米荠种质资源打下基础,同时为今后进一步研究壶瓶碎米荠超常富硒能力的分子机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于 2020 年 8 月将从湖北省恩施州新塘乡双河社区鱼塘坝富硒土壤中采集的壶瓶碎米荠植株移栽于南京晓庄学院实验室的盆钵中,待其生长 3 个月,取新鲜嫩叶提取 DNA。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

DNA 提取采用北京艾德莱生物科技有限公司生产的 DN14 试剂盒;PCR 扩增采用北京艾德莱生物科技有限公司生产的 2 × F8 FastLong PCR Master Mix,复性温度为 56 ℃,72 ℃延伸时间为 10 s。

1.3 选用的引物序列

引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,引物代号、位置和详细序列见表 1。

1.3 PCR 产物测序

PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳检测鉴定后,交由南京擎科生物科技有限公司测序,DNA 测序峰图用 Chromas 软件显示。

1.4 序列分析

将测序获得的序列去除两端测序质量较差的

收稿日期:2020-11-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:31400567)。

作者简介:蔡升(1993—),女,江苏南京人,博士研究生,主要从事作物遗传育种与种质资源评价利用研究。E-mail:137151377@qq.com。

通信作者:蔡小宁,研究员,主要从事农业生物技术研究。E-mail:bioxncai@163.com。

表 1 引物信息

引物方向	引物代号	引物序列(5'→3')	引物位置
正向	ITC -5	TCGTAACAAGGTTTCGGTAGCTG	18S 基因
反向	ITC -3	CCTCGTGCTGCGACAGGGTC	28S 基因

部分,然后用 Contigexpress 软件进行拼接;登录 NCBI 网站获取所需要的其他碎米荠物种的含 ITS 的序列;用 Lasergene 7.1 的子软件 SeqMan 分析各种碎米荠物种 ITS 序列的变异;用 ClustalX 1.83 和 MEGA 6 软件构建系统进化树。

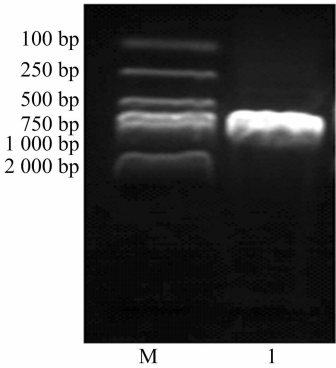
2 结果与分析

2.1 壶瓶碎米荠 ITS 序列的获得

采用引物 ITC -5 和引物 ITC -3 组合(引物序列见表 1)对壶瓶碎米荠核糖体基因转录间隔区序列 DNA 进行 PCR 扩增,得到了长度约 900 bp 的 DNA 产物,图 1 为 PCR 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳的结果。

然后以同样的引物对 PCR 产物测序,获得了原始的 DNA 序列(图 2),对获得的这些序列去除两端不可靠序列,用 Contigexpress 软件进行拼接,获得了

长度为 852 bp 的 DNA 序列,包含部分的 18S 基因、完全的 ITS1(核糖体基因转录间隔区 1)、完全的 5.8S 基因、完全的 ITS2(核糖体基因转录间隔区 2)、部分的 28S 基因的 DNA 序列,已经提交 GenBank,序列登录号(ID)为 MW282045。



M—DNA 分子量标准; 1—PCR 扩增产物
图1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

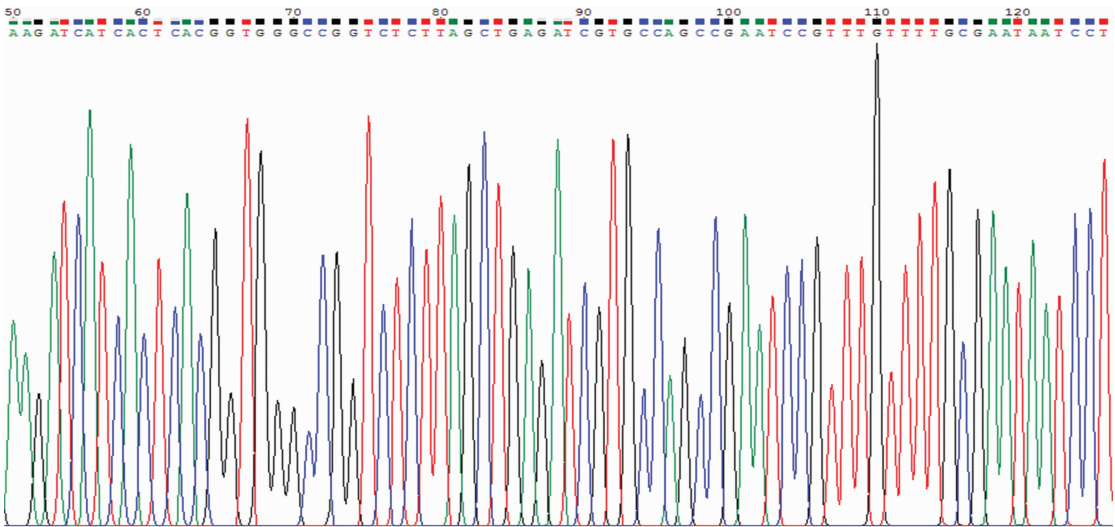


图2 PCR 产物测序峰

2.2 不同物种间 ITS 序列的系统发育分析

将所获得的壶瓶碎米荠的 ITS 序列和其他碎米荠物种的 ITS 序列用 ClustalX 1.83 软件和 MEGA 6 软件邻接法(NJ 法)构建系统进化树,以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 ITS 序列(登录号: AJ232900)为参照,结果见图 3。

从图 3 可以看出,明显可以分为 3 个聚类,

Cardamine digitata (登录号: EU819328,下同)、*Cardamine purpurea* (EU819358)、*Cardamine blaisdellii* (EU819312)、*Cardamine pedata* (EU819356)、*Cardamine umbellata* (EU819379)、*Cardamine victoris* (EU819382)、*Cardamine nuttallii* (EU819350)、*Cardamine rupicola* (EU819368)、大叶碎米荠[*Cardamine macrophylla*(EU819344)]聚为一

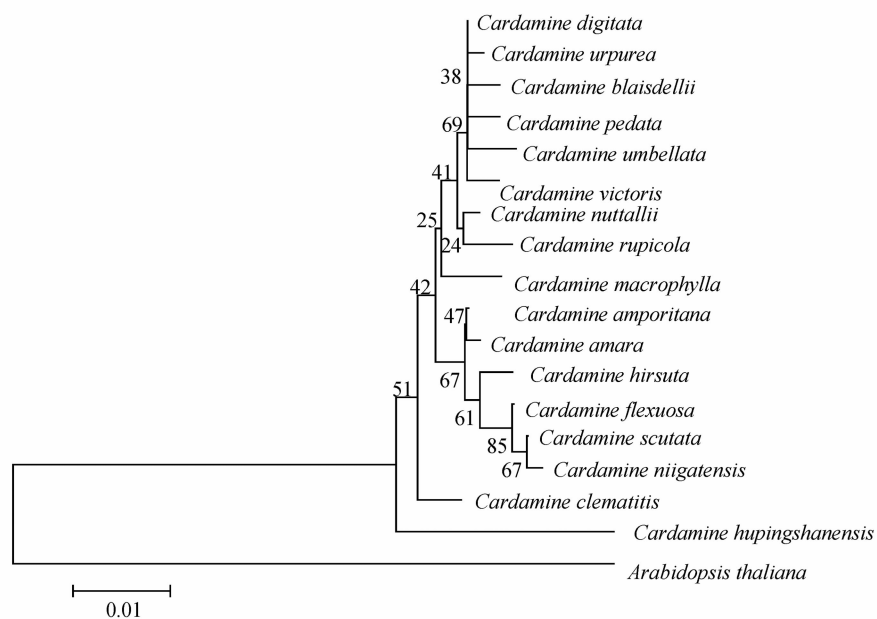


图3 碎米荠属物种 ITS 序列邻接法(NJ 法)系统发生树

类;*Cardamine amporitana* (AY260598)、大碎米荠 [*Cardamine amara*(KF988052)]、碎米荠 [*Cardamine hirsuta* (MH808258)]、弯曲碎米荠 [*Cardamine flexuosa* (DQ268409)]、圆齿碎米荠 [*Cardamine scutata*(DQ268475)]、*Cardamine niigatensis* (DQ268493)、*Cardamine clematitidis*(EU819318)聚为一类;壶瓶碎米荠 [*Cardamine hupingshanensis* (MW282045)]单独聚为一类,与其他碎米荠物种遗传距离最远。

2.3 不同碎米荠物种 ITS 序列的比较分析

为进一步分析比较壶瓶碎米荠和其他碎米荠物种进化过程中产生的变异大小,将这些 ITS 序列用 Lasergene 的子软件 SeqMan 进行拼接,得到一个“基准”的包含 ITS1 序列、5.8S 基因序列和 ITS2 序列的长度为 617 bp 的 DNA 序列(图 4)。然后将各个碎米荠物种的 ITS1 序列和 ITS2 序列与“基准”序列进行比较,考察在对应位置的碱基变异情况。

TCGTATCCTGTCCAAAACAGAACGACCCGCGAACCAAAGATCATCACTCA	50
CGGTGGGCCGTTTCTTAGCTGAGATCGTGCCGCGAATCCGTGGTTTC	100
GCGAACAATCCTTACCGGGAGCTCTATCTGTTTGGGTTGTGCGCGTTG	150
CTTCCGATATCACAAAACACGGCAGAAAAGTGTCAAGGAACATGCAA	200
TTGAACAGCCAGCCTTCGCCTCCCCGAGACGGTGTGTGTGCGGATGCTG	250
CGCTGCGATCTAAAGTCTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTC	300
TCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAG	350
AATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCTTC	400
TGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACAAATCGTCGTCCCTCTCATC	450
CTTTCAGGACGTGGGACGGAAGCTGGTCTCCCGTGTGTTACCGCACGCGG	500
TTGGCCAAAATCCGAGCTAAGGACGCCGAGAGCGTCACGACATGCGGTGG	550
TGAATAAAGCCTCTTCGTATCGTCGGTCTTGTCCATAAGCTCTCG	600
ATGACCCAAAGTCCTCA	617

图4 碎米荠属 ITS 序列的基准序列

由表 2 可知,与“基准”序列相比,每条序列的 ITS1 区和 ITS2 区平均有 5.2 个变异,变异最少的物种是 *Cardamine digitata*,只有 2 处发生了变异;变异最多的是壶瓶碎米荠(*Cardamine hupingshanensis*),有 17 处发生了变异,远远超过平均水平,是平均数的 3.3 倍,与变异第 2 多的 *Cardamine niigatensis* 相比,变异数也达到了它的 2.1 倍。

3 讨论与结论

壶瓶碎米荠具有惊人的耐硒和聚集硒的能力,即使在全球唯一沉积型的独立硒矿床——恩施市渔塘坝硒矿床的土壤中也能生长良好^[4-6],显然有其独特的遗传特性。从前述的分析可知,壶瓶碎米荠与其同属的其他物种相比,在核糖体转录间隔区

表 2 不同碎米荠物种 ITS1 和 ITS2 序列的变异

种名	登录号	ITS1 变异位置和变异碱基	ITS2 变异位置和变异碱基	变异数 (处)
<i>Cardamine hirsuta</i>	MH808258	56G/A,124C/T,138G/A,139T/A	455C/T,597C/T	6
<i>Cardamine hupingshanensis</i>	MW282045	36A/G,63T/C,83T/A,95G/T,95~96 插入 T,100C/T,106C/T,126~127 插入 A, 131T/A,201T/A,205A/G,214C/T	491C/T,496C/T,498C/T,506C/T,603G/T	17
<i>Cardamine niigatensis</i>	DQ268493	56G/A,124C/T,138G/A	453T/C,455C/T,572C/T,589C/T,603G/T	8
<i>Cardamine victoris</i>	EU819382	134T/C	564C/A,580G/A	3
<i>Cardamine clematidis</i>	EU819318	23C/T,106C/T,251C/T	599C/T,602T/C	5
<i>Cardamine rupicola</i>	EU819368	71T/C	445~446 T 缺失,527C/A,580G/A	4
<i>Cardamine blaisdellii</i>	EU819312	250G/T	446T/C,518T/C,580G/A,602T/C	5
<i>Cardamine macrophylla</i>	EU819344	124C/T,214C/T,257G/A	463G/T,602T/C	5
<i>Cardamine umbellata</i>	EU819379	77C/T	520A/T,560G/T,580G/A,602T/C	5
<i>Cardamine scutata</i>	DQ268475	56G/A,124C/T,138G/A	453T/C,455C/T,572C/T,589C/T	7
<i>Cardamine pedata</i>	EU819356	171A/C,260C/T	580G/A	3
<i>Cardamine flexuosa</i>	DQ268409	56G/A,124C/T,138G/A	453T/C,455C/T,589C/T	6
<i>Cardamine amara</i>	KF988052	56G/A,138G/A,214C/T	455C/T	4
<i>Cardamine amporitana</i>	AY260598	56G/A,138G/A	455C/T	3
<i>Cardamine purpurea</i>	EU819358	122C/T	580G/A,602T/C	3
<i>Cardamine nuttallii</i>	EU819350	251C/T	580G/A,602T/C	3
<i>Cardamine digitata</i>	EU819328		580G/A,602T/C	2

的 DNA 序列上的差异很大,表明其进化速度远远超过同类物种,而其他物种的耐硒聚硒能力远低于壶瓶碎米荠。因此推测,最初某种原始的碎米荠生长于恩施市富硒土壤上,经受了长期的高硒环境压力,遗传基因产生了很多突变,经过若干年的选择,那些能够耐受高含量硒土壤逆境的突变个体及其后代存活了下来并繁衍至今,从而进化成新物种——壶瓶碎米荠^[7]。也就是说,高含量硒土壤环境加速了壶瓶碎米荠的遗传进化,造成其远远多于同属其他物种的 DNA 序列的变异。今后进一步的研究工作,可以找出耐受和富集硒的相关基因,研究其功能和作用机制。还可以对多种碎米荠物种的基因进行横向比较,研究耐受和富集硒相关基因的进化路径。

此外,笔者先建立“基准”序列,然后再与其比较 DNA 碱基的变异情况,可以很直观地观察到物种的进化速度,该方法可应用到同类研究上。如果能编制出对应的软件,则可以大大提高效率。

在本试验中,笔者对取自恩施市鱼塘坝独特富硒矿床土壤上生长的壶瓶碎米荠 DNA 进行 PCR 扩增,然后再对 PCR 扩增产物测序,得到了壶瓶碎米荠核糖体基因转录间隔区序列,为其分子鉴定提供

了参考序列。本试验所选用的引物扩增出来的条带特异性好,几个独立的 PCR 产物双向测序获得的序列在去除了两端的部分序列后,重复性很好,因此建立了有效的壶瓶碎米荠分子鉴定方法。

参考文献:

- [1] Yuan L X, Zhu Y Y, Lin Z Q, et al. A novel selenocystine - accumulating plant in selenium - mine drainage area in Enshi, China [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65615.
- [2] Shao S X, Deng G D, Mi X B, et al. Accumulation and speciation of selenium in *Cardamine* sp. in Yutangba Se Mining Field, Enshi, China [J]. Chinese Journal of Geochemistry, 2014, 33(4): 357 - 364.
- [3] 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.
- [4] 王玉兵, 陈发菊, 梁宏伟. 湖北省碎米荠属一新记录种——壶瓶碎米荠 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(9): 2160 - 2161.
- [5] 戴光忠. 我国富硒农业地质环境调查进展分析 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(30): 12140 - 12143.
- [6] 罗金玲, 杨 珏, 陈鸿辉, 等. 壶瓶碎米荠对硒酸钠胁迫响应研究 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59(11): 47 - 50.
- [7] Bai H F, Chen L B, Liu K M, et al. A new species of *Cardamine* (Brassicaceae) from Hunan, China [J]. Novon, 2008, 18(2): 135 - 137.