

文章编号: 1674-7054(2019)04-0319-05

濒危兰科植物 DNA 条形码鉴定体系的建立与优化

潘英文, 张 凌, 王安石, 李佳潼, 谢添伟, 陈施明, 刘福秀, 林明光

(海口海关 热带植物隔离检疫中心, 海口 570311)

摘 要: 通过设计濒危兰科植物 DNA 条形码 ITS, matK 和 psbA-trnH 序列的通用引物并对其 PCR 反应体系进行优化, 对 16 种有代表性的濒危兰科植物进行 PCR 扩增和测序, 比较各序列的扩增和测序效率。结果表明: ITS, matK 和 psbA-trnH 序列引物对濒危兰科植物的扩增和测序成功率均较高, PCR 反应的最佳退火温度分别为 ITS 54 ℃, matK 和 psbA-trnH 50 ℃。在上述反应体系和条件下获得的目的条带清晰、明亮, 可作为鉴别濒危兰科植物物种的 DNA 条形码组合。

关键词: 濒危兰科植物; DNA 条形码; 鉴定

中图分类号: S 682.31

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.04.003

由于处于非生育期的许多兰科植物种类间形态差别很小, 仅凭形态特征较难分类。近年来, 遗传标记技术作为一种物种形态学分类鉴定手段被广泛应用于属间、种间、品种间的分类鉴定和亲缘关系的研究中。分子标记 RAPD 和 AFLP 技术等主要针对兰属原生种、变种、品种间进行有关亲缘关系、遗传多样性的判断和分析, 除兰属外, 还涉及了兜兰属、万代兰属等。国外学者利用核糖体 ITS 序列分析兰花野生种的起源和进化趋势, 国内学者也利用 RAPD 技术对春兰等我国传统兰花品种进行遗传变异和亲缘关系的研究^[1-2]。杨光穗等^[3]利用 SRAP 分子标记技术对 8 种海南野生兰属植物的遗传多样性和亲缘关系进行分析。ISSR 体系也初步用于研究蝴蝶兰的亲缘关系, 在石斛属植物品种鉴定研究中也应用了分子标记技术, 但仅仅用于亲缘关系的分析, 还达不到物种检测鉴定的技术要求。目前, 兰科植物大多采用 DNA 条形码方法如 atpF-atpH, rbcL, rpoB, rpoC1, psbA-trnH, matK 和核糖体 ITS 等序列来加以鉴定^[4-11], 但缺乏系统性的研究。越来越多的研究表明, 靠 1 个片段很难对所有的植物物种进行准确鉴定, 针对特定品种采用多个不同的基因片段进行综合分析鉴定将是今后的主要研究方向。因此, 笔者通过对现有序列和数据的比对分析, 从前人研究系统发育的序列中选择适当片段, 并加以组合, 同时开发新的基因片段, 旨在建立濒危兰科植物 DNA 条形码的鉴定体系, 为鉴定濒危兰科植物提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料来自海口海关热带植物隔离检疫中心种质资源圃保存的濒危兰科植物, 分别是金钗石斛 *Dendrobium nobile*, 卷萼兜兰 *Paphiopedilum appletonianum*, 春兰 *Cymbidium goeringii* var. *goeringii*, 矮万代 *Vanda pumila*, 云南火焰兰 *Renanthera imschootiana*, 小兰屿蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris*, 短序脆兰 *Acampe papillosa*, 香花指甲兰 *Aerides odorata*, 金线兰 *Anoectochilus roxburghii*, 广东石豆兰 *Bulbophyllum kwangtungense*, 三褶虾脊兰 *Calanthe triplicata*, 牛角兰 *Ceratostylis hainanensis*, 短序隔距兰 *Cleisostoma striatum*, 流苏贝母兰 *Coelogyne fimbriata*, 扇脉杓兰 *Cypripedium japonicum* 和节茎石仙桃 *Pholidota articulata*。

收稿日期: 2018-12-05

修回日期: 2019-07-28

基金项目: 海南省自然科学基金项目(317293); 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2016IK095)

作者简介: 潘英文(1981-), 男, 高级农艺师。研究方向: 植物检疫与生物技术。E-mail: pyw910@163.com

通信作者: 林明光(1962-), 男, 研究员, 博士。研究方向: 植物检疫与热带花卉研究。E-mail: linmingguang@yahoo.com

选取植株叶片为材料,每植株采集 2~3 片叶,放入已编号的封口袋中并立即拿回实验室放入 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内贮存。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.2 DNA 提取方法 采用改良 CTAB 法^[12] 提取 DNA。使用 Thermo Nanodrop 2000 核酸分析仪测定提取的 DNA 样品 230,260,280 nm 处的光吸收值,根据 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 的比值确定 DNA 纯度。取 5 μL 样品 DNA 加上 Loading buffer 后,使用 $w=1\%$ 琼脂糖凝胶,在 $0.5\times\text{TBE}$ 缓冲液中, $3\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 恒压电泳 1~2 h (Power PAC3000 电泳仪,BIO-RAD)。根据电泳结果检测 DNA 质量。

1.3 引物设计 根据已知兰科植物的 ITS, matK 和 psbA-trnH 序列,利用其保守位点和变异位点,用 Primer Premier 5 软件,设计兰科植物的通用引物序列,引物序列见表 1。

表 1 PCR 反应引物序列
Tab. 1 The primer sequence of PCR amplification

序号 No.	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
1	ITS-F1	TCTTATCCTCCGCTTATTG
	ITS-R1	GATCATTGTCGAGACCGA
2	matK-F1	TAAGAATCCCGAACCT
	matK-R1	ATTACTTGTGAAACGT
3	psbA-trnH-F1	GATTGCTACCTTGTGTG
	psbA-trnH-R1	BATCGAGATATTGGAC

1.4 PCR 反应体系优化 PCR 反应体系: 10 μL $2\times\text{PrimeStar Max premix}$ (TaKaRa), 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, 6~10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 模板 DNA, 用 ddH_2O 补充至 20 μL 。反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 8 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, $48\sim58\text{ }^{\circ}\text{C}$ (温度变化梯度 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$) 退火 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物用 $w=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测,以 DL2000 marker (TaKaRa) 为参照,凝胶成像系统下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应体系优化 从图 1 可知, ITS 序列 PCR 扩增退火温度为 $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 扩增条带清晰, 亮度较高, 稳定性好。从图 2~3 可知, matK 和 psbA-trnH 序列 PCR 扩增退火温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 扩增条带清晰, 亮度较高, 稳定性好。退火温度过低时, 非特异结合增加, 容易产生弥散状背景, 降低测序效率。但过高时, 引物与模板又不易结合, PCR 反应效率降低, 目标条带亮度降低。

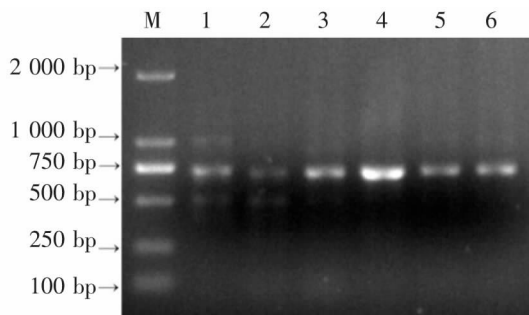


图 1 ITS 序列不同退火温度的扩增结果

Fig.1 Results of PCR amplification in different anneal temperature by primer ITS

1. $48\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2. $50\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3. $52\text{ }^{\circ}\text{C}$; 4. $54\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5. $56\text{ }^{\circ}\text{C}$; 6. $58\text{ }^{\circ}\text{C}$

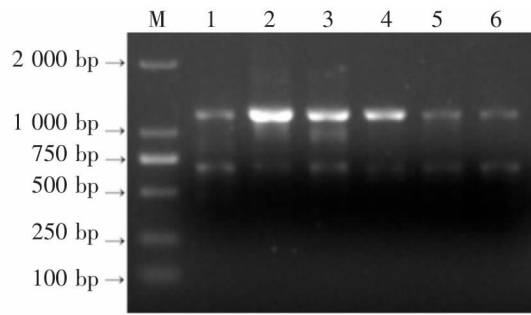


图 2 matK 序列不同退火温度的扩增结果

Fig.2 Results of PCR amplification in different anneal temperature by primer matK

1. $48\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2. $50\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3. $52\text{ }^{\circ}\text{C}$; 4. $54\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5. $56\text{ }^{\circ}\text{C}$; 6. $58\text{ }^{\circ}\text{C}$

2.2 PCR 扩增和检测 从图 4~6 可知,使用优化后的 PCR 反应体系对兰科 16 个代表属的 ITS, matK 和 psbA-trnH 序列进行扩增,扩增条带清晰,亮度较高,稳定性好,均获得理想带型。PCR 扩增效率和测序效率均较高,除 ITS 的测序效率为 98.7%,其他片段的扩增和测序效率均为 100%。片段长度方面,psbA-trnH 的长度最短,为 624~641 bp,其次是 ITS,为 716~735 bp,matK 最长,为 1 195~1 220 bp。该反应体系稳定可靠,能满足 DNA 条形码检测鉴定的实验要求。

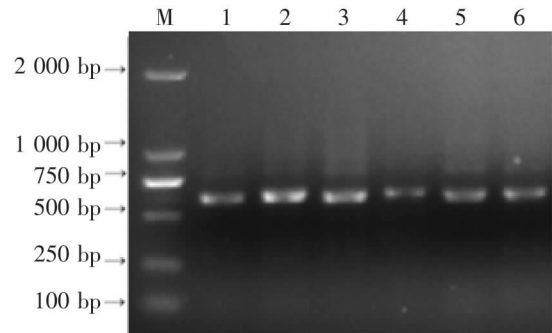


图 3 psbA-trnH 序列不同退火温度的扩增结果

Fig.3 Results of PCR amplification in different anneal temperature by primer psbA-trnH

1. 48 °C; 2. 50 °C; 3. 52 °C; 4. 54 °C; 5. 56 °C; 6. 58 °C

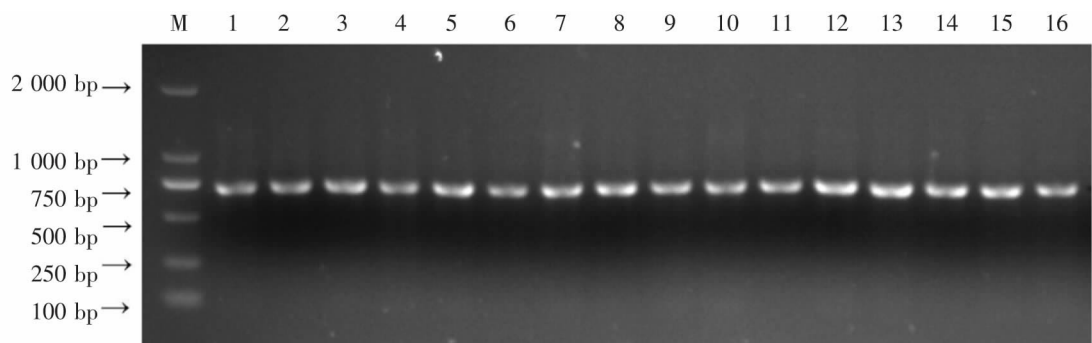


图 4 ITS 引物的 PCR 扩增结果

1. 金钗石斛; 2. 卷萼兜兰; 3. 春兰; 4. 矮万代; 5. 云南火焰兰; 6. 小兰屿蝴蝶兰; 7. 短序脆兰; 8. 香花指甲兰; 9. 金线兰; 10. 广东石豆兰; 11. 三褶虾脊兰; 12. 牛角兰; 13. 短序隔距兰; 14. 流苏贝母兰; 15. 扇脉杓兰; 16. 节茎石仙桃

Fig.4 Results of PCR amplification by primer ITS

1. *Dendrobium nobile*; 2. *Paphiopedilum appletonianum*; 3. *Cymbidium goeringii* var. *goeringii*; 4. *Vanda pumila*; 5. *Renanthera imschootiana*; 6. *Phalaenopsis equestris*; 7. *Acampe papillosa*; 8. *Aerides odorata*; 9. *Anoectochilus roxburghii*; 10. *Bulbophyllum kwangtungense*; 11. *Calanthe triplicata*; 12. *Ceratostylis hainanensis*; 13. *Cleisostoma striatum*; 14. *Coelogyne fimbriata*; 15. *Cypripedium japonicum*; 16. *Pholidota articulata*

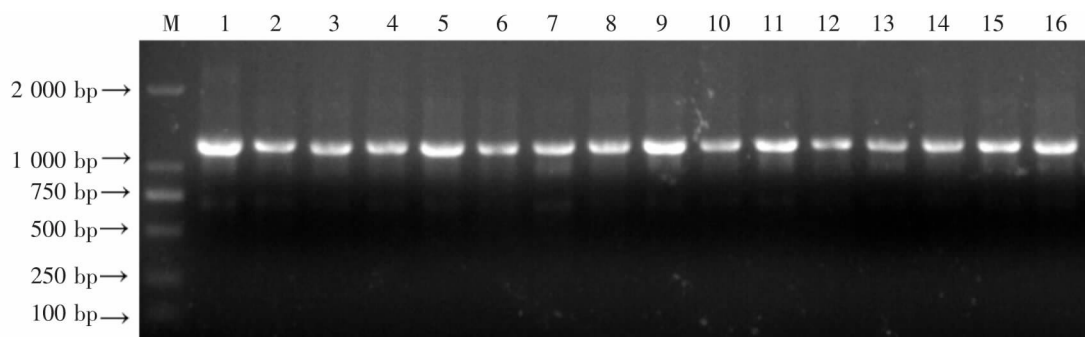


图 5 matK 引物的 PCR 扩增结果

1. 金钗石斛; 2. 卷萼兜兰; 3. 春兰; 4. 矮万代; 5. 云南火焰兰; 6. 小兰屿蝴蝶兰; 7. 短序脆兰; 8. 香花指甲兰; 9. 金线兰; 10. 广东石豆兰; 11. 三褶虾脊兰; 12. 牛角兰; 13. 短序隔距兰; 14. 流苏贝母兰; 15. 扇脉杓兰; 16. 节茎石仙桃

Fig.5 Results of PCR amplification by primer matK

1. *Dendrobium nobile*; 2. *Paphiopedilum appletonianum*; 3. *Cymbidium goeringii* var. *goeringii*; 4. *Vanda pumila*; 5. *Renanthera imschootiana*; 6. *Phalaenopsis equestris*; 7. *Acampe papillosa*; 8. *Aerides odorata*; 9. *Anoectochilus roxburghii*; 10. *Bulbophyllum kwangtungense*; 11. *Calanthe triplicata*; 12. *Ceratostylis hainanensis*; 13. *Cleisostoma striatum*; 14. *Coelogyne fimbriata*; 15. *Cypripedium japonicum*; 16. *Pholidota articulata*

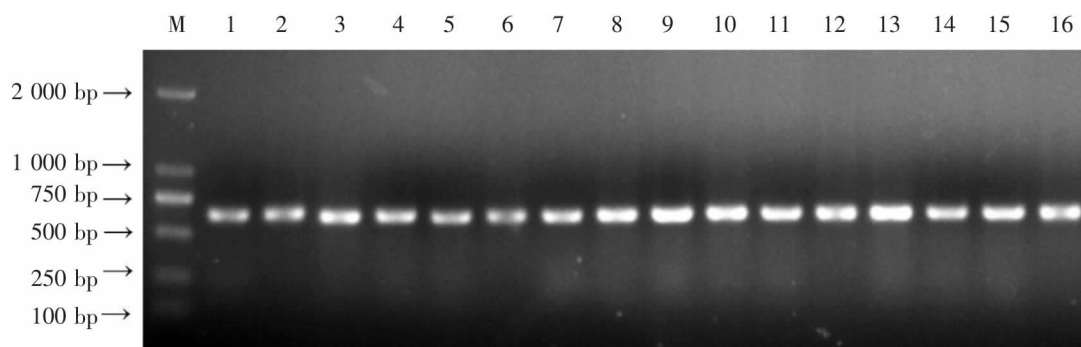


图6 psbA-trnH 引物的 PCR 扩增结果

1. 金钗石斛; 2. 卷萼兜兰; 3. 春兰; 4. 矮万代; 5. 云南火焰兰; 6. 小兰屿蝴蝶兰; 7. 短序脆兰; 8. 香花指甲兰; 9. 金线兰; 10. 广东石豆兰; 11. 三褶虾脊兰; 12. 牛角兰; 13. 短序隔距兰; 14. 流苏贝母兰; 15. 扇脉杓兰; 16. 节茎石仙桃

Fig. 6 Results of PCR amplification by primer psbA-trnH

1. *Dendrobium nobile*; 2. *Paphiopedilum appletonianum*; 3. *Cymbidium goeringii* var. *goeringii*; 4. *Vanda pumila*; 5. *Renanthera imschootiana*; 6. *Phalaenopsis equestris*; 7. *Acampe papillosa*; 8. *Aerides odorata*; 9. *Anoectochilus roxburghii*; 10. *Bulbophyllum kwangtungense*; 11. *Calanthe triplicata*; 12. *Ceratostylis hainanensis*; 13. *Cleisostoma striatum*; 14. *Coelogyne fimbriata*; 15. *Cypripedium japonicum*; 16. *Pholidota articulata*

3 讨 论

扩增成功率是 DNA 条形码应用的主要限制因素,兰科植物中间变异类型极其丰富,容易受到反应条件变化的影响,增加了兰科植物种内和种间遗传距离的重叠程度,导致其识别效率和扩增成功率下降,因此,对其 PCR 反应条件进行摸索和优化十分必要。引物的优劣直接关系到 PCR 扩增的特异性及成功与否,退火温度是影响 PCR 反应的关键因素,退火温度的高低对 DNA 条形码鉴定基因序列扩增的带型和背景深浅有明显的影响。本实验采用国际上通用的兰科植物 DNA 条形码基因 ITS, matK 和 psbA-trnH 序列的变异位点和保守位点设计引物,并利用它对兰科 16 个代表属的 DNA 条形码鉴定体系进行优化,取得了较好的效果。DNA 条形码技术在实际应用中尚存在许多问题需要解决,包括 DNA 条形码基因的选择以及种内和种间变异范围界定。目前,还未见任何一个单一序列能完全鉴别出不同类型的兰科植物。在本实验的反应体系和条件下获得的目的条带清晰、明亮,可作为鉴别濒危兰科植物物种的 DNA 条形码组合。

参考文献:

- [1] 颜平,黄明忠,陆顺教,等. 基于 SRAP 标记的海南钻喙兰种质资源遗传多样性分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(9): 1677-1682.
- [2] 高丽霞. 麻栗坡兜兰 ISSR 引物筛选及反应体系的优化[J]. 安徽农业科学, 2014(20): 6553-6555.
- [3] 杨光穗. 任羽. 王荣香. 利用 SRAP 技术分析海南野生兰属植物的亲缘关系[J]. 热带农业科学, 2011, 31(9): 1-3.
- [4] 黄明忠. 基于 matK 基因和 ITS 序列的海南野生兰科植物 DNA 条形码探讨[D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [5] RENAUD L, MICHELLE V B, DIEGO B, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [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): 1-8.
- [7] YAO HUI, SONG JINGYUAN, MA XINYE, et al. Identification of *Dendrobium* Species by a Candidate DNA Barcode Sequence: The Chloroplast psbA-trnH Intergenic Region[J]. Planta Medica, 2009, 75(6): 667-669.
- [8] 汤欢, 向丽, 李西文, 等. 濒危兰科药用植物 DNA 条形码鉴定[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2058-2067.
- [9] 张雪瑛, 孙骏威, 丁艳菲, 等. DNA 条形码与 FTIR 在石斛分析中的联用[J]. 核农学报, 2018, 32(3): 486-496.
- [10] 张雪瑛. 铁皮石斛离体快繁技术的优化及 DNA 条形码鉴定体系的构建[D]. 杭州: 中国计量大学, 2016.

- [11] 张爱丽,高亚芳,黎太米,等. DNA 条形码在主要滇产石斛鉴别中的应用[J]. 中国民族民间医药,2017,26(2): 11–16.
- [12] 潘英文,张凌,王安石,等. 濒危兰科植物 DNA 的提取方法[J]. 热带生物学报,2019,10(1): 94–98.

Establishment and Optimization of DNA Barcoding in Endangered Orchid Plants

PAN Yingwen, ZHANG Ling, WANG Anshi, LI Jiatong, XIE Tianwei,
CHEN Shiming, LIU Fuxiu, LIN Mingguang

(Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plants, Haikou Customs, Haikou, Hainan 570311, China)

Abstract: Universal primers were designed for ITS, matK and psbA-trnH sequences of endangered orchids for DNA barcoding and their PCR reaction system optimized. Sixteen species of endangered orchids were amplified by using PCR and sequenced, and their PCR amplification and sequencing efficiencies were compared. The results showed that the primers for the ITS, matK and psbA-trnH sequences had higher amplification success rate and sequencing success rate for species of the endangered orchid plants. The optimum annealing temperatures for the PCR reaction were 54 °C for ITS and 50 °C for matK and psbA-trnH. The targeted bands obtained under the above reaction systems and conditions were clear and bright, and the ITS, matK and psbA-trnH sequences can be used as a combination of DNA barcodes to identify the species of endangered orchid plants.

Keywords: endangered orchid species; DNA barcoding; identification

(责任编辑: 潘学峰)