珠海淇澳岛4种红树植物ITS区段的序列测定

魏妮娜，覃义阳，张秀群，王春桃，姬可平
(遵义医学院珠海校区，广东 珠海 519041)

摘 要：以改良的CTAB法提取珠海淇澳岛4种红树植物的总DNA，使用通用引物分别对其ITS区段的序列进行PCR扩增及测序，并对所测序列进行比对分析。结果表明，桐花树、木榄、杨叶肖槿和海漆的ITS1长度分别为404、362、460、439 bp；ITS2长度分别为219、208、231、226 bp；将4种红树植物ITS区段的序列测定结果提交到GenBank，获得了登录号。

关键词：红树植物；ITS序列
中图分类号：Q781 **文献标识码**：A **文章编号**：1004-874X(2013)05-0131-03

Study on ITS sequences of four kinds of mangrove plants in Qiao island

WEI Ni-na, QIN Yi-yang, ZHANG Xiu-qun, WANG Chun-tao, JI Ke-ping
(Zhuhai Campus, Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China)

Abstract: The genomic DNA of the four kinds of mangrove plants were extracted from leaves by an improved CTAB method, the ITS sequences were amplified by PCR with universal primers and the PCR products were direct sequenced. The length of the ITS1 of four kinds of mangrove plants were 404 bp, 362 bp, 460 bp and 439 bp, respectively; the length of the ITS2 were 219 bp, 208 bp, 231 bp and 226 bp, respectively. Submitted the results of the ITS sequences of four mangrove species to GenBank, then the Registry Number obtained.

Key words: mangrove plants; ITS sequence

红树林是分布于热带、亚热带滨海地区的典型湿地，具有其他湿地类型所不具备的特殊演化过程，形成独特的水文、土壤和植被特征，是世界上四大高生产力海洋生态系统之一，在防风、固堤、抵御自然灾害、生态旅游和环境教育方面有着极为重要的作用。红树林作为重要的海岸湿地类型，已被列入拉姆萨尔公约国第四届成员国大会制订的拉姆萨尔湿地分类系统和中国海岸湿地分类系统[1-3]。

近年来，随着人类活动的日益剧烈，红树林面积缩减、湿地资源状况和其生态功能恶化，人地矛盾进一步激化。中国现今仅保留的红树林大部分是天然残次林，树体矮小、生长状况较差，有些还面临着外来物种的威胁。保护和发展红树林资源及其湿地生态系统成为当务之急，红树植物的种质资源鉴定对于进一步保护和利用该资源有着重要意义[4]。DNA条形码概念自2003年由加拿大分类学家Paul Hebert首次提出后就在世界范围内受到了广泛关注，很多学者认为它是日渐萎缩的传统形态分类学强有力的补充，能够为分类学修订、新种和隐存种的发现、资源利用以及生物多样性研究等提供新的思路和研究工具，同时将分类学的结果应用于生物学调查、濒临物种监测和保护、中草药资源鉴定、法医鉴定、药物和食品市场监督等诸多领域[5-6]。2009年，在墨西哥城召开的第三届国际DNA条形码会议上，与会代表对植物DNA条形码达成共识，建议将核基因片段ITS和叶绿体基因片段trnH-psbA作为植物DNA条形码的补充码。珠海淇澳-担杆岛省级自然保护区拥有维管植物695种，其中真红树植物15种、半红树植物9种。本研究对保护区中的4种红树植物进行了分子水平的鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物包括桐花树、木榄、杨叶肖槿和海漆，其相关的具体信息见表1。于2012年11月在珠海淇澳-担杆岛省级自然保护区采集新鲜的红树植物叶片，并经保护区技术人员认可。采集回的植物叶片用70%乙醇擦洗以去除外源DNA的污染，凭证标本存放于遵义医学院珠海校区生物化学与细胞分子生物学教研室。

主要仪器：电泳仪及电泳槽（北京六一仪器）、UV-2500紫外分光光度计(日本岛津)、梯度PCR扩增仪(珠海黑马)、凝胶成像系统(Tocan190)、测序仪器ABI PRISM 3730(ABI公司)、恒温水浴箱(北京长源)。

主要试剂：乙二胺四乙酸二钠盐、三羟甲基氨基甲烷、十六烷基三甲基溴化铵、氯化钠、氯仿、异戊醇、无水乙醇、醋酸钠、β-巯基乙醇、聚乙烯吡咯烷酮40、琼脂糖、Goldview、高保真即用型PCR试剂盒、RNase A等均购自上海生工生物工程公司。

ITS序列的引物由深圳华大基因合成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA的提取 用改良的CTAB法[7]分别提取4种红树植物的基因组DNA。

1.2.2 DNA纯度及片段大小的检测 取20 μL DNA样

收稿日期：2013-01-19
作者简介：魏妮娜(1989-)，女，在读硕士生，E-mail：249626755@qq.com
通讯作者：姬可平(1956-)，男，教授，E-mail：jlhjxj@sina.com

表 1　红树植物的相关信息及登录号

编号	植物	学名	科	属	凭证编号	登录号
1	桐花树	*Aegiceras corniculatum*	紫金牛科	桐花树属	QA121101	KC460264
2	木榄	*Bruguiera gymnorrhiza*	红树科	木榄属	QA121102	KC460265
3	杨叶肖槿	*Thespesia populnea*	锦葵科	肖槿属	QA121106	KC473945
4	海漆	*Excoecaria agallocha*	大戟科	海漆属	QA121111	KC460266

品溶于 3 mL TE 中，在 UV-2550 紫外分光光度计上测定其在 260、280 nm 处的吸光度值，根据 OD_{260}、OD_{260}/OD_{280} 值来判断 DNA 的浓度和纯度。

DNA 浓度(μg/mL)=OD_{260}×稀释倍数×50

采用 1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳，检测 DNA 片段的大小及完整性，观察并拍照。

1.2.3　*ITS 的扩增和测序*　参考《中药 DNA 条形码分子鉴定》中 ITS 的通用引物序列、PCR 反应系统及扩增程序[7]，取样品 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳进行初步检测，观察并拍照。将检测成功的产物交由华大基因公司进行双向测序。

1.2.4　*序列拼接和分析*　对所获测序峰图利用CodonCode Aligner V 3.0 软件进行校对拼接，去除引物区，获得完整序列，利用 BLAST 搜索类似序列，并将完整序列和类似序列进行比对分析，然后将该序列提交到 GenBank，申请登录号。

2　结果与分析

2.1　DNA 纯度和电泳检测结果

提取的 DNA 样品经紫外分光光度计检测，发现 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.6~1.8（表 2），DNA 纯度符合 PCR 扩增的要求。

表 2　各物种 DNA 浓度

样品编号	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	DNA 浓度(μg/mL)
1	0.048	0.028	1.714	480
2	0.034	0.021	1.619	340
3	0.084	0.045	1.867	840
4	0.063	0.035	1.800	630

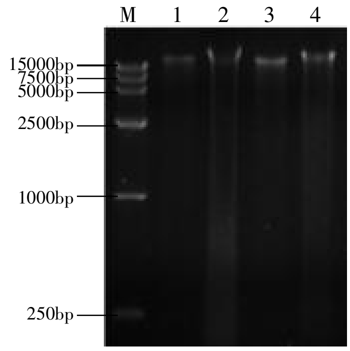
由图 1 可知，4 种红树植物基因组 DNA 的电泳条带明亮、清晰、完整，大小均为 15 000 bp 左右。

2.2　PCR 扩增结果

从图 2 可以看出，4 种红树植物基因组 DNA 的 PCR 扩增产物的电泳条带清晰、明亮、单一，且无特异性条带，可供纯化测序。

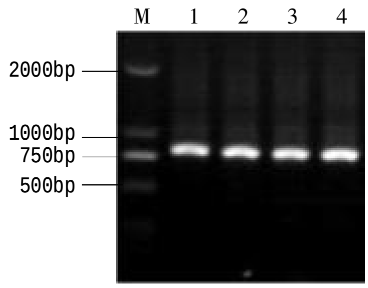
2.3　序列拼接与分析

经测序得到木榄、海漆、桐花树的测序峰图，所得峰图均无重叠峰和套峰（图 3），可进行后续分析。利用 CodonCode Aligner V3.0 进行校对拼接，去除引物区，获得完整序列。将所获得的完整序列提交到 GenBank，并获得登录号。所有序列的 GenBank 注册登记号见表 1。



M：DL15 000 Marker；1：桐花树；2：木榄；3：杨叶肖槿；4：海漆

图 1　4 种红树植物基因组 DNA 的电泳结果



M：DL2000 Marker；1：桐花树；2：木榄；3：杨叶肖槿；4：海漆

图 2　4 种红树植物基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

2.3.1　*Blast 搜索结果*　根据获得的完整序列，利用 BLAST 搜索其类似序列，发现桐花树已有登录号 FJ976669(珠海)、FJ976668(珠海)，该序列与 FJ976669 的重合度为 95%，相似度为 98%；与 FJ976668 的重合度为 96%，相似度为 98%。木榄已有登录号 HM366082(香港)、HM366083(香港)，该序列与 HM366082 的重合度为 96%，相似度为 100%；与 HM366083 的重合度为 96%，相似度为 100%。未见杨叶肖槿的登录号，但有同科物种的登录号——海岛棉 GQ166634.1，该序列与 GQ166634.1 的重合度为 98%，相似度为 91%。未见海漆的登录号，但有同属物种的登录号——台湾土沉香 GU441822 和红背桂花 GU441816，该序列与 GU441822 的重合度为 90%，相似度为 91%；与 HM366083 的重合度为 90%，相似度为 91%。

2.3.2　*ITS1 和 ITS2 序列分析*　利用 ITS2 网站（http://its2.bioapps.biozentrum.uni -wuerzburg.de/）确定 ITS 序列中 ITS1 和 ITS2 的界限。具体信息见表 3。

3　结论与讨论

在 GenBank 中查找已报道的桐花树 rDNA ITS 序列，与已有的序列〔FJ976669(珠海)和 FJ976668(珠海)〕进行

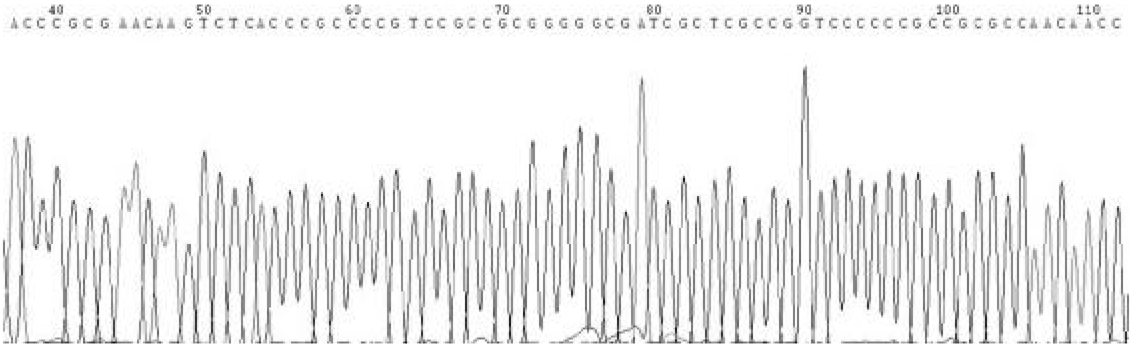


图 3 ITS 序列 PCR 扩增产物测序所得峰图的部分截图

表 3 各物种的 ITS 序列信息

编号	长度(bp)		GC 含量(%)		总长度(bp)
	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	
QA121101	404	219	46.7	52.1	648
QA121102	362	208	41.7	44.2	595
QA121106	460	231	46.9	40.1	716
QA121111	439	226	49.9	54.0	690

比对[8],比对结果表明,只有在 ITS1 区有 12 对碱基存在差异,ITS2 区没有碱基存在差异,可能因为地理环境、气候的变化导致碱基发生突变。而木榄序列比对结果完全一致,说明这一地区物种的遗传物质稳定,可考虑将其作为育种亲本。本研究首次获得了海漆和杨叶肖槿的 ITS 序列,从分子水平上为其种质资源的研究提供了依据。

红树植物具有独特的形态结构和功能适应性,其应用非常广泛,不仅可以防风护岸、保护农田、拦淤造陆和抗污染,还可以食用和药用,作为工业原料和蜜源[9-10]。近年来,红树林植物的生长状况较差,只有通过人工种植的方法,对天然残次红树林进行修复和扩大红树林面积, 才能达到红树林恢复和保护的目的。DNA 条形码技术[11-20]为红树林植物引进优良种质资源提供了快速准确的方法, 并能克服传统分类学研究方法的诸多缺陷。因此,建立珠海淇澳岛红树植物种质资源鉴定的分子水平标记数据库是非常必要的。

参考文献:

[1] 彭辉武,郑松发,朱宏.珠海市淇澳岛红树林恢复的实践[J].湿地科学,2011,9(1):97-100.

[2] 阮志平.浅谈红树植物及其应用[J].广西热带农业,2006(5):43-44.

[3] 周涵韬,林鹏.中国红树科 7 种红树植物遗传多样性分析[J].水生生物学报,2001,25(4):362-369.

[4] 张留恩,廖宝文.珠海市淇澳岛红树林湿地的研究进展与展望[J].生态科学,2011,30(1):81-87.

[5] 王友绍,何磊,王清吉,等.药用红树植物的化学成分及其药理研究进展[J].中国海洋药物,2004,23(2):26-31.

[6] 罗焜,马培,姚辉,等.中药 DNA 条形码鉴定中 DNA 提取方法的研究[J].世界科学技术——中医药现代化,2012,14(2):1433-1439.

[7] 陈士林.中药 DNA 条形码分子鉴定[M].北京:人民卫生出版社,2012:10-11.

[8] 吴群,姬可平,牛宪立.三种药用红树植物 rDNA ITS 序列的初步研究[J].广东农业科学,2011,37(17):109-110.

[9] 周涵韬,林鹏.中国红树科 7 种红树植物遗传多样性分析[J].水生生物学报,2001,25(4):362-369.

[10] 潘文,周涵韬,陈攀,等.不同地区桐花树种群的分子遗传变异分析[J].厦门大学学报,2004,43(S):106-112.

[11] 牛宪立,姬可平,吴群.rDNA ITS 区序列分子标记技术在植物学研究中应用[J].生物信息学,2009,7(4):268-271.

[12] 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.

[13] Gao T, Yao H, Song J Y, et al. Evaluating the feasibility of usingcandidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family[J].BMC Evolutionary Biolgy,2010,10:324.

[14] 宁淑萍,颜海飞,赫刚,等.植物 DNA 条形码研究进展[J].生物多样性,2008,16(5):417-425.

[15] 陈士林,姚辉,宋经元,等.基于 DNA barcoding (条形码)技术的中药材鉴定[J].世界科学技术——中医药现代化,2007,9(3):7-12.

[16] 陈士林,宋经元,姚辉,等.药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析[J].中药资源学研究,2009,7(5):322-327.

[17] 牛宪立,姬可平,吕国庆.白木香 rDNAITS 序列测序鉴定的初步研究[J].广东农业科学,2010,37(2):167-169.

[18] 任保青,陈之端.植物 DNA 条形码技术[J].植物学报,2010,45(1):1-12.

[19] 陈念,赵树进.入侵种的 DNA 条形码鉴定[J].生物技术通讯,2009,20(1):35-137.

[20] 牛宪立,姬可平,唐立波,等.高良姜与混淆品大高良姜的rDNAITS 区序列分析[J].广东农业科学,2010,37(3):199-202.