

卷丹及主要食用百合 EST-SSR 鉴别体系的构建

厚毅清¹, 罗俊杰¹, 欧巧明^{1*}, 裴怀弟¹, 马得茸²

1. 甘肃省农业科学院生物技术研究, 甘肃 兰州 730070

2. 甘肃省人民医院, 甘肃 兰州 730070

摘要:目的 开发卷丹 *Lilium lancifolium*、兰州百合 *L. davidii* var. *willmottiae*、岷江百合 *L. regale*、香水百合 *L. casa* 和龙牙百合 *L. brownie* var. *viridulum* 的 EST-SSR 分子鉴别体系, 分析 EST-SSR 分子标记技术对百合近缘种的开发效率和鉴别能力。方法 利用 MISA.pl 程序对 NCBI 公布的百合属 EST 基因序列进行 SSR 位点的识别, 通过 Primer3 程序模块批量生成 EST-SSR 引物, 经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳对引物进行初筛, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳验证初筛引物, 标记并分析不同种质的特征泳带, 构建鉴别体系。结果 共设计了 199 对 SSR 引物, 经过 26 对引物的筛选, 获得了 2 对高效鉴别引物, 其中引物 JZ391 构建的分子鉴别体系, 可有效鉴别混掺的商品百合, 具有一定的实用价值。结论 基于研究材料具有极端的遗传特征, 本实验鉴定标记开发非常高效, 研究结果证实了物种的遗传基础是影响其 EST-SSR 分子标记开发效率的重要因素, 同时, 该案例可为其他类似百合遗传基础的中药材进行 EST-SSR 标记开发, 提供参考尺度。

关键词: 分子鉴别; 卷丹; 百合属; EST-SSR; 食用百合

中图分类号: R282.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4308-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.027

Construction of EST-SSR identification system for *Lilium lancifolium* and main edible *Lilium*

HOU Yi-qing¹, LUO Jun-jie¹, OU Qiao-ming¹, PEI Huai-di¹, MA De-rong²

1. Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China

2. Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To develop the EST-SSR molecular identification system of *Lilium lancifolium*, *Lilium davidii* var. *willmottiae*, *Lilium regale*, *Lilium casa* blanca and *Lilium brownie* var. *viridulum*, and analyze the development efficiency and identification ability of EST-SSR molecular marker technology for *Lilium* genus. **Methods** The MISA.pl program was used to identify the SSR locus of the EST gene sequence published by NCBI. The EST-SSR primers were generated by Primer3 program module, and the primers were screened by PCR amplification and agarose gel electrophoresis. The primary screening primers were verified by polyacrylamide gel electrophoresis, and the characteristic bands of different germplasms were labeled and analyzed to construct an identification system. **Results** A total of 199 pairs of SSR primers were designed. After screening 26 pairs of primers, two pairs of highly efficient primers were obtained. The molecular identification system constructed by primer JZ391 can effectively identify the mixed commercial materials, which had certain practical value. **Conclusion** Based on the extreme genetic characteristics of the research materials, this identification marker development is very efficient. The results confirm that the genetic basis of the species is an important factor affecting the development efficiency of its EST-SSR molecular marker. At the same time, this case can be used as a reference for the development of EST-SSR markers for other Chinese medicinal herbs similar to *Lilium* genus.

Key words: molecular identification; *Lilium lancifolium* Thunb.; *Lilium* L.; EST-SSR; edible *Lilium*

目前, 市场热销的百合品种有卷丹、兰州百合、龙牙百合(正式学名应为百合^[1])和岷江百合。其中, 卷丹具有润肺止咳、清心安神、补中益气之功

能, 是中医用药之一^[1-2], 兰州百合、龙牙百合和岷江百合是野生百合经过多年驯化、品种筛选以及人工栽培后, 获得可食用的百合品种, 因其口味甜美

收稿日期: 2020-01-20

基金项目: 甘肃省农业科学院创新团队项目(2016GAAS59-02, 2019GAAS-CGZH03, 2019GAAS05); 甘肃省农业科学院中青年基金项目(2017GAAS92, 2017GAAS94)

作者简介: 厚毅清(1982—), 助理研究员, 主要从事作物分子育种及植物组织培养研究。Tel: (0931)7612683 E-mail: lishuiqing376@163.com

*通信作者 欧巧明(1976—), 副研究员, 主要从事作物分子育种及名特优农产品分子标识研究。E-mail: ouqiaoming@163.com

幽香,被定义为一种营养价值较高的蔬菜^[3]。然而,在市场经济利益的驱动下,某些商家开始模糊食用百合和药用百合的界限,擅自赋予并夸大食用百合的药用功效,不仅混淆药用、食用百合品种^[4],还对百合干和百合粉等诸多加工形态的商品中进行互掺等违规操作,这也是中药材掺假中常见的违规现象^[5-7],很难通过外形、味道进行鉴别。因此,开发科学、可靠的鉴定方法,对这些主流食用百合种质进行标识,符合现代食品安全策略^[7-9]。

EST-SSR 分子标记技术是利用聚合酶链式反应(PCR)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和凝胶成像设备呈现生物基因组中特定序列的一种技术,该技术结合生物信息学,分析特定基因序列出现的频率和差异,从而达到鉴别目的^[10]。EST-SSR 分子标记技术在物种鉴定中的应用已经非常成熟^[11-13],尤其在中药材的鉴定中已有较多报道^[14-15]。该技术最大的优点为开发简单、快捷、成本低^[16-18]。然而,随着科学技术的快速发展,在中药材分子鉴定领域,出现 DNA 条形码等新的分子鉴定技术,加上已有的随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单重复序列区间(ISSR)、相关序列扩增多态性(SRAP)、ITS/ITS2^[19-20],EST-SSR 分子标记技术在众多分子标记技术中,受哪些影响因素制约,适宜于哪些中药材进行鉴定标记的开发,是一个重要的科学问题。

本研究以美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)对百合 EST 序列的更新公布为契机,对卷丹及在我国具有地理性标志且在市场上热销的 5 种百合进行 EST-SSR 分子标记实验,以期寻找可以鉴别这些百合种质的鉴定引物及相应的分子标识体系。同时,通过本次开发案例,探讨类似百合遗传基础的物种,EST-SSR 分子标记技术对其开发的效率和鉴定的能力,为该技术在中药材鉴别中的应用提供参考案例。

1 材料与仪器

1.1 材料

参试百合样品分为种质资源样本和待检测百合商品,其中种质资源样本由甘肃省农业科学院百合资源圃提供,由甘肃省人民医院主任医师马得茸进行鉴定,分别为兰州百合 *Lilium davidii* var. *willmottiae* Blanca、香水百合 *L. casa* Blanca、卷丹 *L. lancifolium* Thunb、龙牙百合 *L. brownie* var. *viridulum*、岷江百合 *L. regale* Wilson, 其种质的真实性由中国农业科学院蔬菜研究所给予保障,具体来源信息见表 1。本次分子标记体系的构建,每处来源分 2 次,每次随机选取 3 个样本,进行个体取样。待检测百合商品通过实地和网购获得,共计收集 19 批次,分为 34 份,每份样本数量不同,进行混合取样,人为混掺品由种质资源样本,按质量比进行混掺,见表 2。

表 1 种质资源样品信息

Table 1 Germplasm resource sample information

名称	来源	纬度 (N)	经度 (E)	海拔/m
兰州百合	兰州市七里河区青岗村	35°56'57.68"	103°45'45.52"	1 949
	永靖县红楼村	35°57'01.71"	103°33'56.12"	2 100
	兰州市西果园镇	35°58'15.66"	103°45'36.95"	1 820
	临洮县中铺镇祁家岭村	35°53'35.54"	103°46'28.88"	2 503
香水百合	云南省昆明市	24°53'16.15"	102°48'48.28"	1 921
	定西市临洮县	35°23'08.47"	103°52'54.63"	1 920
	江苏省南京市	32°06'34.79"	118°53'04.39"	13
	甘肃省兰州市	36°03'21.89"	103°49'59.38"	1 525
卷丹	湖南张家界市永定区	29°18'06.77"	10°24'39.46"	830
	湖北恩施市业洲镇	30°34'59.78"	109°46'17.66"	612
	江苏宜兴市太湖滨区	31°26'11.79"	119°59'57.41"	3
	江苏苏州市吴中区	31°15'58.78"	120°22'03.21"	0.18
龙牙百合	湖南省隆回县	27°10'55.18"	111°12'08.64"	418
	江西省永丰县	27°18'57.06"	115°27'53.67"	68
	湖南省安化县	28°21'39.14"	111°11'38.61"	208
	江西省万载县	28°09'18.93"	114°26'38.79"	183
岷江百合	宜宾市宜宾县	28°40'04.61"	104°28'22.90"	467
	宜宾市翠屏区	28°46'00.80"	104°35'46.91"	390
	泸州市合江县	28°55'21.59"	105°46'02.13"	267
	泸州市江阳区	28°49'43.90"	105°18'58.87"	398

表 2 待检测的百合商品信息

Table 2 Commodity information

样品编号	来源	性 状	性质	商家描述种质
1	兰州市七里河镇百合产区	鲜品	食品	兰州百合
2	兰州市七里河镇百合产区	鲜品	食品	
3	兰州市网络电商	鲜品	食品	
4	兰州市七里河镇百合市场	百合干	食品	
5	兰州市网络电商	百合干	食品	
6	兰州市七里河镇百合市场	百合粉	食品	
7	重庆市网络电商	鲜品	食品	岷江百合
8	重庆市网络电商	鲜品	食品	
9	重庆市网络电商	鲜品	食品	
10	重庆市网络电商	鲜品	食品	
11	宜宾市网络电商	鲜品	食品	卷丹
12	兰州市中医院	百合干	药品	
13	兰州市同仁堂药店	百合干	药品	
14	兰州市同济堂药店	百合干	药品	
15	无锡市网络电商	百合干	药品	
16	无锡市网络电商	百合干	药品	
17	无锡市网络电商	鲜品	食品	
18	无锡市网络电商	鲜品	食品	
19	无锡市网络电商	鲜品	食品	
20	无锡市网络电商	鲜品	食品	
21	无锡市网络电商	百合粉	保健品	龙牙百合
22	宜兴市网络电商	百合粉	保健品	
23	宜兴市网络电商	百合粉	保健品	
24	宜兴市网络电商	百合粉	保健品	
25	隆回县网络电商	鲜品	食品	
26	隆回县网络电商	鲜品	食品	
27	江西永丰网络电商	鲜品	食品	
28	江西永丰网络电商	鲜品	食品	
29	江西永丰网络电商	鲜品	食品	
30	江西永丰网络电商	百合粉	食品	
31	亳州市网络电商	百合粉	食品	龙牙百合：兰州百合（10 g：0.01 g）
32	邵阳市网络电商	百合粉	食品	
33	湘潭市网络电商	百合干	食品	
34	佛山网络电商	百合干	食品	
35	人为混掺	鲜品	食品	
36	人为混掺	鲜品	食品	龙牙百合：兰州百合（10 g：0.001 g）

1.2 试剂与仪器

TIANGEN 植物基因组提取试剂盒（离心柱型）、Goodview 核酸染料、DNAMarker（DL500 bp，DL2000 bp），天根生化科技有限公司；Taq PCR

MasterMix 瑞泰（北京）生物科技有限公司；琼脂糖、50 × TAE Electrophoresis buffer、50 × TBE Electrophoresis buffer 生工生物工程（上海）股份有限公司；三氯甲烷，广州瑞真生物科技有限公司；

PAGE-Pre-Solution (40%, 19:1) 北京索莱宝科技有限公司, 所有化学试剂均为分析纯。

V600 型琼脂糖凝胶电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; DYY-12 型核酸电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; Bio-Rad T100PCR 仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统, 伯乐生化仪器公司; HITACHI RXII 多用途冷冻离心机, 株式会社日立制作所; HWS24 型电热恒温水浴锅, 上海一恒科技有限公司。

2 方法

2.1 样本 DNA 的提取

采用试剂盒提取法。标准品样本取 1 g 左右鳞片, 加入适量液氮研磨成粉, 商品样本中鲜品按个体取鳞片混合, 称取 1 g 加入适量液氮研磨成粉, 商品样本中的百合干混合破碎, 称取 1 g 加入适量液氮研磨成粉, 百合粉直接进行称量, 将适量的粉状的组织装于 1.5 mL 的离心管中, 按照 DNA 提取试剂盒提供的试剂及步骤进行基因组提取, 最终获得的基因组用 ddH₂O 溶解, 置于-25 °C 环境中进行保存。

2.2 EST-SSR 引物的设计及获取

通过 NCBI 官方网站, 获得百合属 *Lilium* L. EST 序列共 3 902 条, 将 EST 序列信息保存为 Fasta 格式文件, 利用 Perl 计算机语言中的 Est_timmer.pl 程序, 去除 EST 序列中过短的序列 (<100 bp) 和过长的序列 (>700 bp) 和 mRNA 的“帽子”和“尾巴”, 利用 CD_HIT 程序去除冗余序列, 利用 Misa.pl 程序识别定位 SSR 位点, 通过 Primer3 程序模块, 批量生成 EST-SSR 引物信息, 发送引物信息至生工生物工程(上海)股份有限公司, 合成所需引物。

2.3 PCR 扩增体系与凝胶电泳体系

2.3.1 梯度 PCR 反应体系 (20 μL) 2×Taq PCR Master Mix 为 10 μL, 上下游引物各 1.6 μL, DNA 模版 1.0 μL, 去离子水 6.0 μL。梯度 PCR 反应程序: 95 °C、5 min, 94 °C、45 s, 退火 (T_m 值±5 °C)、30 s, 72 °C、1 min, 35 次循环, 72 °C、10 min。

2.3.2 琼脂糖凝胶电泳体系 用 1×TAE 电泳缓冲液制备 1.5% 琼脂糖凝胶。将 10 μL 的 PCR 扩增产物, 在凝胶板上的孔中点样, 用 DNA Marker DL2000 bp 做相对分子质量标记, 电压 (90~110 V), 电泳时间 30 min。丙烯酰胺凝胶电泳体系: 用 1×TBE 配制 8% 的 PAGE 凝胶, PCR 扩增产物点样 8 μL, 以 DNA Marker DL500 做相对分子质量标记,

电压 (180~220 V), 电泳时间为 60~90 min。电泳结果用凝胶成像仪观察、拍照、记录与分析。

2.4 百合 EST-SSR 分子鉴定体系的构建与验证

以香水百合和兰州百合 (种质资源样本) 做相互对照, 通过梯度 PCR 和琼脂糖凝胶电泳依次筛选 EST-SSR 引物, 以对照基因组 PCR 扩增产物共有退火温度 (T_m) 值, 且相互间具有显著差异泳带为特征, 获得初筛引物。利用丙烯酰胺凝胶电泳体系, 对初筛获得的引物再次筛选验证, 以同一品种共有的特异性泳带和不同品种间共有的差异性泳带为特征, 获得可鉴别所有百合样本的鉴定引物, 标识不同品种的鉴别位点, 构建百合的 EST-SSR 分子鉴定体系。利用构建的百合 EST-SSR 分子鉴定体系对收集的百合商品样本和人为混掺样本进行检测, 验证百合 EST-SSR 分子鉴定体系的实用性和有效性。

3 结果与分析

3.1 不同百合商品分子标记试验的可靠性验证

本实验的商品百合有百合鲜品、百合干和百合粉, 琼脂糖电泳结果显示, 植物基因组提取试剂盒对百合鲜品和百合干的基因组提取质量较好, 而百合粉提取的基因组泳带模糊, 有基因组降解的现象 (图 1-A)。丙烯酰胺凝胶电泳结果进一步显示, 百合鲜品、干状物和粉状物提取基因组的 PCR 扩增产物泳带清晰, 相互间存在一致泳带 (图 1-B), 该结果表明, 利用植物基因组提取试剂盒提取百合鲜品、百合干和百合粉的基因组, 可以参与后期相关分子标记的研究, 虽然百合粉提取的基因组质量较差, 但不影响其分子标记结果。

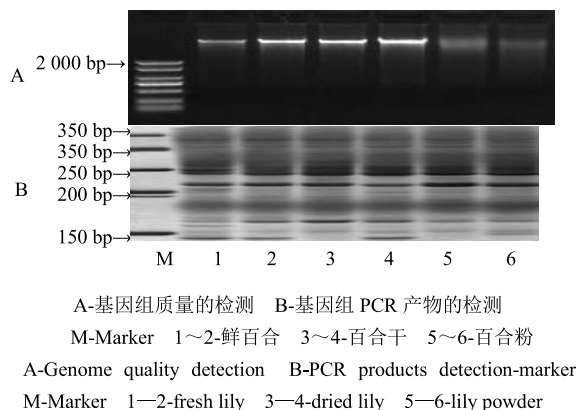


图1 不同百合产品进行分子标记试验的可靠性验证
Fig. 1 Reliability verification of molecular marker test for different products

3.2 SSR 鉴定引物的初筛及其 PCR 扩增产物的分析

对 NCBI 公布的百合属 EST 序列进行 SSR 引物设计, 获得 199 对设计引物, 利用琼脂糖电泳筛选 26 对 SSR 引物。26 对 SSR 引物对参试的对照样本可进行有效的 PCR 扩增 (图 2), 该结果表明, 利用 Perl 计算机语言批量设计 EST-SSR 引物的方法有效, 可以作为 SSR 引物设计的方法之一。其次, 通过对电泳图谱的进一步分析, 26 对 SSR 引物的 PCR 扩增产物有 5 种结果: (1) 对照间具有“梯度 PCR”的特征, 对照间带型差异较小 (图 2-A); (2) 对照间具有“梯度 PCR”的特征, 对照间带型一致 (图 2-B); (3) 参试样本之一没有 PCR 扩增产物 (图 2-D); (4) 参试样本之一没有表现“梯度 PCR”的特征 (图 2-E); (5) 对照间具有“梯度 PCR”的特征, 对照间带型具有显著差异 (图 2-C), 扩增出 5 种带型图谱所用 SSR 引物的比例依次为 8:14:1:1:2, 基于本实验以筛选高效鉴定引物为目的, 舍弃图 2-A、图 2-B、图 2-D 和图 2-E 带型对应的 SSR 引物, 以扩增出图 2-C 泳带特征的引物作为初筛鉴定引物。

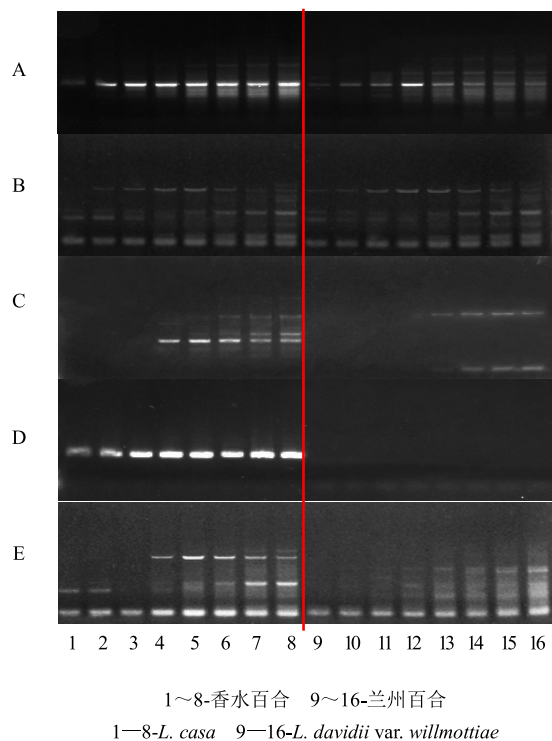


图 2 梯度 PCR 初筛 SSR 引物的琼脂糖电泳结果

Fig. 2 AGE electrophoresis results of SSR primers for gradient PCR screening

3.3 初筛鉴定引物的验证筛选与百合 EST-SSR 分子鉴定体系的构建

丙烯酸胺凝胶电泳结果显示, 初筛获得的 2 对 SSR 鉴定引物对参试样本均能进行 PCR 扩增, 其中引物 JZ396 的 PCR 产物具有特征为同一品种具有共同的特征泳带, 不同百合品种间具有共同的差异特征泳带, 虽然泳带清晰, 但较为杂乱, 尤其可鉴别种质的特征泳带相互比较, 间距较短, 显示较弱, 容易发生鉴别失误, 该引物不适宜做参试百合品种的鉴别引物。引物 JZ391 的 PCR 产物具有特征为同一品种有共同的特征泳带, 不同百合品种间也具有共同的差异特征泳带, 泳带清晰, 特征泳带明显, 不同品种辨别容易, 经过多次重复验证, 其 PCR 产物稳定, 鉴定结果可靠, 为此, 引物 JZ391 被选为本次百合分子鉴别体系构建的鉴别引物 (图 3)。同时, 该结果间接证明了本研究中采用的引物筛选方法是有效的。

百合 EST-SSR 分子鉴定体系构建如下: 引物 JZ391 (正向: TAAGTATGTCCAGCC CGGAG, 反向: GTGGGTCCCTTCAGGGTTT); T_m 值 57.5 °C; 基准鉴别位点为兰州百合 98 bp, 卷丹 360 bp, 岷江百合 270、185 bp, 龙牙百合 505、325 bp (图 3)。

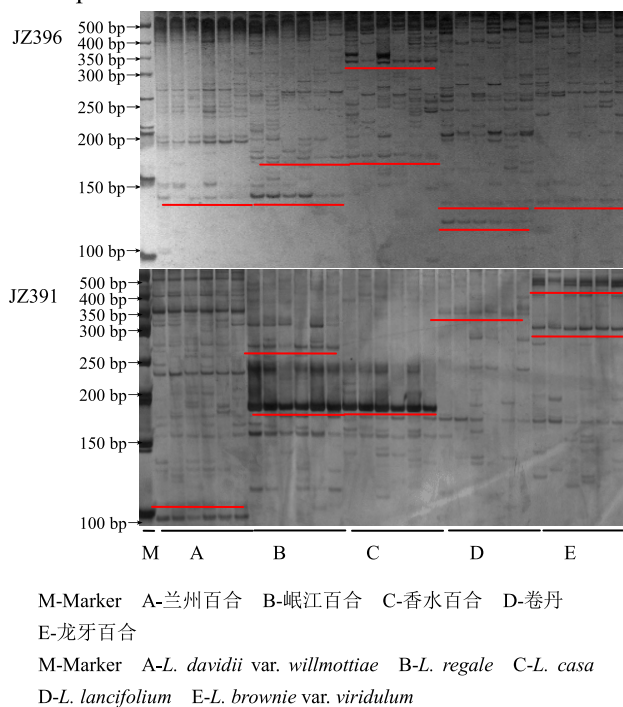


图 3 初筛 SSR 引物对百合种质资源的 PAGE 电泳结果

Fig. 3 Screening results of SSR primers for germplasm resources by PAGE electrophoresis

3.4 百合 EST-SSR 分子鉴别体系对商品百合的检测结果

应用构建的百合 EST-SSR 分子鉴别体系对收集的商品百合样本和人为混掺样本进行检测,结果显示,34 份商品百合样本中,91%的样本符合商家对百合种质的描述,有 3 份商品样本中,发现混掺现象,15 号样本检测出卷丹和龙牙百合,21 号样本检测出卷丹和兰州百合,22 号样本检测出卷丹和香水百合,发现种质混掺的百合产品为百合干和百合粉,且有 2 份样本属于保健品,本研究中的鲜品百合没有发现种质混掺现象,该结果表明,本研究构建的百合 EST-SSR 分子鉴定体系可对混掺的商品百合进行种质辨别,可对不同性状的百合产品进

行有效鉴别。同时,人为设置的混掺样本 35 号和 36 号,检测出龙牙百合和兰州百合品种,其中 36 号样本,混掺的兰州百合为龙牙百合的万分之一质量,其特征泳带几乎没有发生衰减。该结果表明,本研究构建的百合 EST-SSR 分子鉴定体系可鉴别痕量痕迹(图 4)。

4 讨论

4.1 卷丹及我国主要食用百合品种的鉴别方法及其 EST-SSR 分子标记建立的意义

卷丹、兰州百合、龙牙百合和岷江百合的鲜品,其外形差异较为明显(图 5),因此,参试百合的鲜品可通过外形直接进行鉴别。百合干和百合粉是市场常见的百合商品,由于鳞片脱水和机械破碎,该

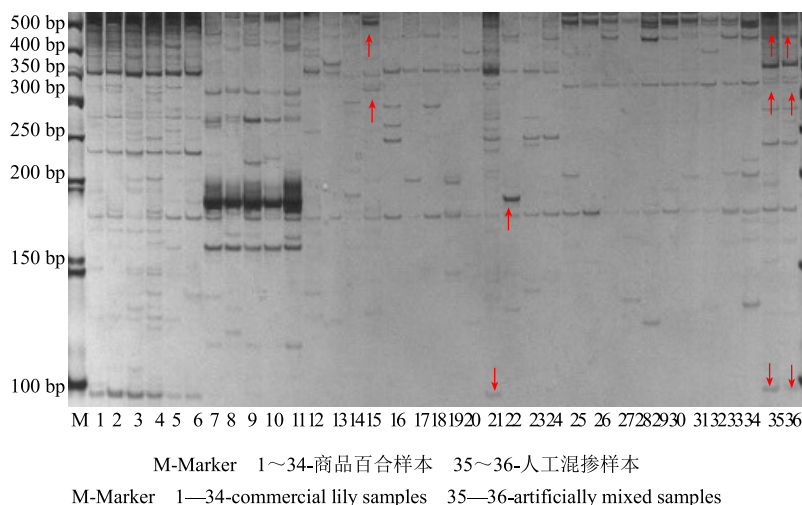


图 4 EST-SSR 分子鉴定体系对商品百合样本的检测结果

Fig. 4 Detection results of commercial samples by EST-SSR molecular identification system



图 5 不同百合品种的遗传表现特征

Fig. 5 Genetic characteristics of different varieties

性状的百合商品很难通过外形进行种质鉴别,可勉强通过口味进行鉴别,如卷丹微苦、兰州百合微甜、龙牙百合偏糯等^[21]。通过外形和口味进行鉴别的方法,直观简单,适宜大众在日常生活中使用,而应对大宗百合商品的鉴别,由于存在商业风险,传统的鉴别方法已经不能胜任,需要采用科学、可靠的鉴别方法。然而,目前报道的鉴别方法是针对不同鉴别需求而设计的,如药用百合可通过薄层色谱法检测百合内含物进行鉴别^[1];兰州百合可通过果胶或多糖含量进行鉴别^[22],这些鉴别方法不能对参试的百合品种进行绝对的种质鉴别,且这些方法在技术上存在共同的缺点:很难鉴别混掺样本。鉴于上述现状,本研究获得的鉴别体系,可对参试的百合种质进行特异性分子标识,得益于分子标记的技术特点,在药品质量控制层面,该体系可辅助百合药品质量检测,确定基原种质,在药品、食品安全层面,该体系可辨识真伪、混掺的商品百合,这对保护地理标志品牌,维护百合市场安全和秩序具有一定的现实意义。

4.2 物种的遗传基础对其 EST-SSR 分子标记开发能效的影响

利用最少的引物鉴定多数量物种是分子鉴定追求的目标^[23],然而,在目前的研究报道中,EST-SSR 分子标记技术的鉴定能力均不相同,如厚毅清等^[24]利用开发的 6 对 SSR 引物,鉴别了近缘属间的黄芪与红芪;赵雅楠等^[25]利用 15 对引物组合,对 43 份绿豆品种进行种间鉴别;蒋超等^[26]利用开发的 3 对引物,对忍冬属下的 4 个种进行种间鉴别。分子标记技术的本质是在 DNA 水平上寻找保守基因序列和差异基因序列,多数科属间的物种有天然的生殖屏障,不能进行基因交流,非常容易发现这些基因序列,但到了种间鉴别,由于授粉等各种基因交流方式,使得种间的基因差异变的很小,较难开发出高效的分子鉴别体系。这也是不同物种鉴别标记开发效率和鉴别能力各不相同的根本原因^[27],而在本实验中,采用的研究对象存在极端的遗传基础:第一百合物种具有自交不亲和性,通过鳞茎进行无性繁殖^[28];第二,参试的百合品种为我国地理标志农产品,在特定的区域有近百年的栽培历史^[29-31],这些极端的遗传基础造成参试百合品种的遗传表观特征(花色、鳞茎)具有显著的差异性(图 5),其显著程度近似于不同科属间的物种。基于该特征,本次 EST-SSR 鉴定标记的开发效率和鉴定能力

均有不俗的表现,该结果证实了研究对象的遗传基础是影响其 EST-SSR 分子标记技术开发能效的重要因素,这对如何选择研究对象,有效发挥并应用该技术,具有一定的指导意义。

4.3 EST-SSR 分子标记技术在中药材鉴别中开发方向的探讨

中药材中存在许多需要达到种间鉴别的物种,如川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 与伪品茶芎 *Ligusticum sinense* Oliv. cv. Chaxiong, 半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit 与伪品掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* Schott, 浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 与混淆品伊贝母 *Fritillaria walujewii* Regel, 及伪品皖贝母 *Fritillaria anhuiensis* S. C. Chen et S. P. Yin 等^[1,32],这些中药材及其伪品、混淆品具有相同的科属分类,且通过茎节、球茎等方式进行无性繁殖,其遗传背景也与百合的遗传背景非常相似,为此,鉴于本次鉴定标记的开发结果,如利用 EST-SSR 分子标记技术优先对这些中药材进行鉴定标记开发,应具有获得高效分子鉴定体系的潜力。

4.4 百合 EST-SSR 分子鉴别体系的优缺点

本实验开发获得的鉴别体系,所需设备为分子实验室的基础设备,具有鉴别成本低和应用范围广的优点。兰州百合,卷丹和龙牙百合的鉴别位点在图谱中呈现显著,可直接应用,岷江百合的鉴别位点与卷丹部分样本的 SSR 位点距离较近,因此,在实际应用中,如用毛细管电泳法检测该位点^[33],应具有更好的辨识效果(图 4)。此外,该体系可鉴别至少万分之一质量的混掺样本,其应对大宗百合商品的鉴别,具有痕量鉴别的优势。

研究获得了药用百合品种卷丹,食用百合品种兰州百合、岷江百合和龙牙百合的 EST-SSR 分子标识体系,该标识体系可有效鉴别种质互掺的商品百合,具有一定的实用价值。此外,通过本研究案例,探讨并证实了物种的遗传基础是影响其 EST-SSR 分子标记开发的重要因素,提出了应用该技术对通过无性繁殖,且具有地理标志的道地中药材,优先进行鉴定标记开发的参考建议。

志谢:甘肃省人民医院马得茸主任医师鉴定本研究中药用百合。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李卫民,孟宪纾,高英,等. 中药百合的本草考证

- [J]. 中国中药杂志, 1990, 15(10): 579-580.
- [3] 李玉帆, 明 军, 杨新艳, 等. 15 个百合品种和品种的食用性比较研究 [J]. 园艺学报, 2013, 40(S): 2693-2694.
- [4] 韩德承. 识别真假百合 [N]. 中国中医药报, 2014-01-09(005).
- [5] 凌益翔. 常见中药材掺假现象及鉴定方法 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 172-173.
- [6] 罗舜菁, 刘成梅, 黄 丽, 等. 真假百合粉的鉴别及掺假率测定方法的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(6): 267-269.
- [7] 吴 娜, 杨诗龙, 严 丹, 等. 粉末中药鉴别方法的研究进展与思考实践 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1413-1419.
- [8] 时圣明, 潘明佳, 王 洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. 中草药, 2013, 44(17): 3121-3126.
- [9] 陈子雷, 李 维. 现代科学技术对食品安全管理的支撑作用研究 [J]. 山东农业科学, 2012, 44(12): 112-118.
- [10] Skinner D M, Beattie W G, Blattner F R, *et al.* Repeat sequence of a hermit crab satellite deoxyribonucleic acid is $(-T-A-G-G-)_n$ $(-A-T-C-C-)_n$ [J]. *Biochemistry*, 1974, 13(19): 3930-3937.
- [11] Reid A, Hof L, Fflix G, *et al.* Construction of an integrated microsatellite and key morphological characteristic database of potato varieties on the EU common catalogue [J]. *Euphytica*, 2011, 182(2): 239-249.
- [12] Hua Y Z, Tian Z Z, Lu M Y, *et al.* EST-SSR sequences revealed the relationship of D-genome in diploid and tetraploid species in *Gossypium* [J]. *Plant Sci*, 2009, 176(3): 397-405.
- [13] Lu H, Bernmardo R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(4): 613-617.
- [14] 刘新星, 石有太, 罗俊杰, 等. 轮叶党参 EST-SSR 标记的开发及在党参属中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3110-3121.
- [15] 杨 妮, 郭 嗣, 王 建, 等. 广西莪术 EST-SSR 标记开发及其在遗传多样性分析中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(12): 2291-2300.
- [16] Yu Y, Wang R, Shi Y, *et al.* Genetic diversity and structure of the core collection for maize inbred lines in China [J]. *Maydica*, 2007, 52(8): 181-194.
- [17] Gethi J G, Labate J A, Lamkey K R, *et al.* SSR variation in important U. S. maize inbred lines [J]. *Crop Sci*, 2002, 42(3): 951-957.
- [18] Lu Y L, Yan J B, Guimaraes C T, *et al.* Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphism [J]. *Theoret Appl Genet*, 2009, 120(1): 93-115.
- [19] 杨春芳, 曾 阳, 郭凤霞, 等. 分子标记技术在獐牙菜属植物研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3238-3244.
- [20] 陈 梦, 方 昀, 程汝滨, 等. 线粒体 DNA 标记在动物类药材分子鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3134-3142.
- [21] 韩 冰. 十五种百合在豫北地区引种调查试验 [D]. 邯郸: 河北工程大学, 2018.
- [22] 王 琦. 兰州百合化学成分的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [23] 李新光, 王 璐, 赵 峰, 等. DNA 条形码技术在鱼肉及其制品鉴别中的应用 [J]. 食品科学, 2013, 34(18): 337-342.
- [24] 厚毅清, 石有太, 张艳萍, 等. 黄芪与红芪 SSR 引物的筛选及鉴定指纹代码的构建 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1819-1822.
- [25] 赵雅楠, 王 颖, 张东杰. 辽宁地区绿豆品种 SSR 指纹图谱构建及品种鉴定 [J]. 食品科学, 2018, 39(6): 284-290.
- [26] 蒋 超, 袁 媛, 刘贵明, 等. 基于 EST-SSR 的金银花分子鉴别方法研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(6): 803-810.
- [27] 汤 华, 陈银华, 夏志辉. 分子标记原理与技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- [28] 王 莹, 王良桂, 黄成名, 等. 露地栽培条件下百合的生长规律及种球繁殖技术 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(8): 1558-1566.
- [29] 皋兰县志编纂委员会. 皋兰县志 [M]. 兰州: 甘肃人民出版社, 1999.
- [30] 徐榕雪. 百合主要病毒的分子检测及脱毒技术研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [31] 隆回县志编纂委员会. 隆回县志 [M]. 北京: 团结出版社, 2006.
- [32] 中国药品生物制品检定所, 广东省药品检验所. 中国中药材真伪鉴别图典 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2011.
- [33] 刘 振, 赵 洋, 杨培迪, 等. DNA 分子标记检测方法及其在茶树中的研究进展 [J]. 茶叶学报, 2015, 56(2): 80-84.