

花叶开唇兰与台湾银线兰的 SSR 标记技术鉴别

王海阁, 许文, 张勋, 许少华, 徐伟, 林羽, 陈抒云, 黄泽豪*

福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

摘要:目的 利用 SSR 分子标记技术建立金线莲基原植物花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii* 及其常见混淆品台湾银线兰 *A. formosanus* 的鉴别依据。方法 根据花叶开唇兰转录组数据进行分析筛选 SSR 引物, 通过 DNA 提取、PCR 扩增以及引物多态性筛选等方法鉴别花叶开唇兰及台湾银线兰, 从而鉴定药用金线莲真伪。结果 基于花叶开唇兰转录组数据筛选出 SSR 多态性引物 13 对, UPGMA 聚类法显示两者遗传相似系数变幅为 0.38~1.00, 在遗传相似系数 0.38 处, 可将其完全分开。结论 该研究构建了花叶开唇兰与台湾银线兰的分子标记鉴定体系和指纹图谱, 为金线莲的商品鉴别及质量控制提供科学依据。

关键词: 花叶开唇兰; 台湾银线兰; SSR 分子标记; 真伪鉴别; 指纹图谱

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)03-0848-05

DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.025

Identification of *Anoectochilus roxburghii* and *A. formosanus* by SSR molecular markers

WANG Hai-ge, XU Wen, ZHANG Xun, XU Shao-hua, XU Wei, LIN Yu, CHEN Shu-yun, HUANG Ze-hao

College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective The purpose of this paper was to research the identification characteristics of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants of *A. formosanus* based on SSR molecular markers. **Methods** Firstly, SSR primers were selected according to the transcriptome data of *A. roxburghii*, and then the original plant of *A. roxburghii* and its adulterants of *A. formosanus* was identified by DNA extraction, PCR amplification and primer polymorphism screening, so as to identify the authenticity of *Anoectochilus* herba. **Results** By SSR molecular markers, 13 pairs of SSR primers clustering analysis showed that the genetic similarity coefficient ranged from 0.38 to 1.00 so that *A. roxburghii* and *A. formosanus* could be separated at 0.38. **Conclusion** In this study, the molecular marker identification system and fingerprints of *A. roxburghii* and *A. formosanus* are established, which could provide scientific basis for commodity identification and quality control of *Anoectochilus* herba.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.; *Anoectochilus formosanus* Hayata; SSR molecular markers; identification; fingerprints

金线莲 *Anoectochilus Herba* 是来源于兰科 (Orchidaceae) 金线兰属 *Anoectochilus* Blume 多年生草本植物花叶开唇兰 *A. roxburghii* (Wall.) Lindl. 的新鲜或干燥药材^[1], 别名有金线兰、金丝草、金丝线、虎头蕉、金蚕等^[2-3]。金线莲性平、味甘, 具有清热凉血、解毒消肿、祛风利湿等多种功效, 药用历史悠久, 有“药王”“金草”“药

虎”之称^[4], 在民间有很高的认知度, 多用于治疗肾炎、膀胱炎、肺炎、高血压、小儿急惊风、风湿病、糖尿病、高脂血症、乙型肝炎等疾病^[5-7]。由于它自身繁殖能力很低, 生长缓慢, 且随着部分地区生态环境的破坏以及过度采挖, 导致金线莲野生资源日渐枯竭, 远远不能满足市场需求, 《国家重点保护野生植物名录》第二批讨论稿将其列入国家

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2017J01538); 福建省科技厅高校产学研合作项目 (2019Y41010064); 福建省科技厅引导性项目 (2017Y0049, 2018Y0052)

作者简介: 王海阁 (1994—), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生, 研究方向为中药资源及品质评价。Tel: 18750718127 E-mail: 2672831172@qq.com

*通信作者: 黄泽豪, 教授, 研究方向为中药资源及品质评价。Tel: 18046043849 E-mail: huangzehao@fudan.edu.cn

二级保护植物名录。根据本课题组前期考证结果,台湾地区习以金线兰属植物台湾银线兰 *A. formosanus* Hayata 作为金线莲的原植物^[8],由于二近缘种外观相似^[9],干品药材颜色特征弱化,加之常有不法商贩将其与花叶开唇兰混用,导致人们往往难以区分两者真伪。另外,目前关于花叶开唇兰和台湾银线兰的鉴别主要是性状、显微方面的鉴别^[10-12],随着分子标记技术在植物鉴别方面的日益盛行以及简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)标记具有数量丰富、多态性高、遗传上呈现共显性、稳定性高等^[13]的优点,该研究将首次应用 SSR 分子标记技术来研究该两种植物基因水平的差异,以便为快速准确鉴别花叶开唇兰与台湾银线兰提供鉴别依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

供试样品为2019年5月29日从福建省永泰县绿茵农业发展有限公司采集的林下栽培花叶开唇兰和台湾银线兰,并由福建中医药大学中药鉴定教研室黄泽豪教授鉴定为花叶开唇兰 *A. roxburghii* (Wall.) Lindl.和台湾银线兰 *A. formosanus* Hayata。选取种植至5月份的长势良好、新鲜、无病虫害的金线莲,取3个不同种植间隔距离的药材进行取样,并及时选取新鲜幼嫩叶片分别进行相应平行3组的DNA提取,经PCR扩增及电泳检测,平行3组实验条带一致,说明DNA提取的重复性良好,且由于不同生长期的植株其基因组是不变的,因此2种药材各自选取其中1份样品进行后续分子标记实验研究。

1.2 仪器

DP22X 奥林巴斯显微镜(上海富莱光学科技有限公司),佳能相机(佳能有限公司),FastPrep-24 5G 型匀浆仪(上海博谊生物科技有限公司),自动高压灭菌器(广州市华粤行仪器有限公司),Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司),ABI Veriti 梯度 PCR 仪(哈尔滨德远科技开发有限公司),AR224CN 型分析天平(奥豪斯仪器有限公司),PowerPac Basic 伯乐电泳仪、垂直电泳槽、化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司)等。

1.3 试剂

新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、Gold View I 型核酸染色剂(康为世纪生物科技),SSR 引物(由上海生工生物工程股份有限公司合成),

琼脂糖(赛默飞世尔科技有限公司),6×Loading buffer、DNA marker(宝生物工程有限公司)等,试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 DNA 提取

取花叶开唇兰和台湾银线兰完整植株的无病虫害的完整叶片,按照DNA提取试剂盒法提取样品DNA,用紫外检测仪检测DNA浓度, A_{260}/A_{280} 应介于1.8~2.0,用2.0%浓度琼脂糖检测目的基因的纯度,条带应单一明亮说明产物较纯。

2.2 PCR 扩增

根据本课题组花叶开唇兰转录组数据^[14],按照引物设计原则筛选SSR引物,即(1)引物序列的GC含量在40%~60%;(2)3'端无相似性较高的序列,且无连续3个GGG或CCC的出现,防止引起错配;(3)引物长度一般为18~22 bp;(4)避免在3'端使用碱基A,防止形成二聚体或发卡结构;(5)引物本身的互补性不超过8,且引物3'端的互补性不宜超过6,防止在错配位点形成双链结构引发DNA聚合反应。SSR引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR反应体系为25 μL,包括2.5 μL 10×Taq reaction buffer,2 μL dNTP Mixture,灭菌水16.3 μL,酶0.2 μL,正、反向引物各1 μL,DNA模板2 μL。反应程序:94℃预变性5 min,94℃变性40 s,各引物退火温度退火45 s,72℃延伸90 s,4℃保存,用1.5%浓度琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增出目的基因以及目的基因的纯度。

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测引物多态性

2.3.1 制胶 用75%乙醇清洗玻璃板,晾干或用医用纱布块擦干,将前后玻璃板对齐合板,置于装有胶条的制胶架上,将灭菌水灌满玻璃槽,检漏20 min。然后按照灌胶配方制备配胶溶液,即依次加入超纯灭菌水15 mL,30% Acr-Bis(29:1)11.25 mL,5×TBE 7.5 mL,10% AP(催化剂)375 μL以及TEMED(加速剂)30 μL,用涡旋振荡器迅速混匀,立即灌胶,及时插入梳子的平端,避免产生气泡,室温放置2 h使胶凝固。

2.3.2 电泳 将2板固定在垂直电泳槽中,短板朝内,预电泳30 min,缓慢拔出梳子,将25 μL PCR体系和4 μL 6×Loading buffer混合液加入凝胶的梳子孔中,上样量4 μL,点样结束后,以135 V、400 mA的程序电泳100 min。

2.3.3 银染 将胶板从垂直电泳槽中取出, 用起胶器将短玻璃板分离, 胶留在长玻璃板上, 用固定液冲洗凝胶使其与长玻璃板分离, 置入固定液固定 10 min, 倒出固定液, 用超纯水快速漂洗 1 遍, 加入染色液, 振摇 10 min, 快速漂洗 2 遍, 再加入显色液, 振摇至条带凝胶上的条带全部显现出来, 快速用超纯水漂洗 2 遍, 防止显色过度, 随后对显色后的凝胶扫描拍照, 保存。

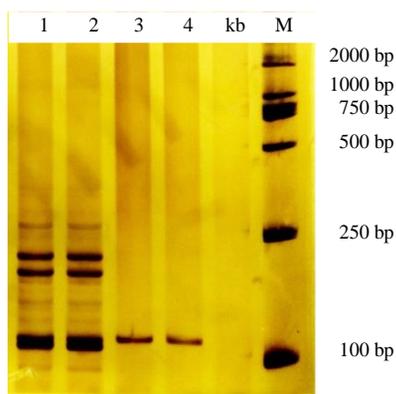
2.4 数据处理

对银染后的凝胶图进行条带统计, 同一位点清晰明亮的条带记为“1”, 无条带的记为“0”, 建立原始矩阵^[15-16], 用 NTsys 2.10 软件计算遗传相似系数, 以及非加权平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 生成品种间亲缘关系的聚类图, 并结合 Popgene 1.32 软件对引物的多态性以及个体间的遗传分化进行分析。

3 结果与分析

3.1 SSR 标记引物多态性

基于课题组前期花叶开唇兰转录组测序的基础上, 设计 30 对 SSR 引物对样品 DNA 进行 PCR 扩增, 筛选多态性引物 (图 1), 其中条带清晰、稳定性好的引物 13 对, 占所用引物的 43.3%。Popgene 1.32 软件分析表明 (表 1), 平均观察等位基因数为 1.796 2, 平均有效等位基因数为 1.492 3, Shannon’s 多态性信息指数为 0.442 6, 表明花叶开唇兰与台湾银线兰之间存在丰富的遗传多样性。引物信息如表 2 所示。



1~2-花叶开唇兰 3~4-台湾银线兰 kb-空白对照 M-Marker
1—2-*A. roxburghii* 3—4-*A. formosanus* kb-blank control
M-Marker

图 1 引物 RN42 对花叶开唇兰与台湾银线兰的 SSR-PCR 凝胶电泳图

Fig. 1 Results of SSR-PCR polyacrylamide gel electrophoresis by RN42 primers

表 1 13 对 SSR 引物的多态性

Table 1 Polymorphism of 13 pairs of SSR primers

编号	等位基因	有效等位基因	Shannon 信息指数	基因流
RN32	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
RN33	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
RN35	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
RN36	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
RN37	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
RN38	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
RN41	1.000 0	1.000 0	0.000 0	—
RN42	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
RN43	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0
RN44	2.000 0	2.000 0	0.693 1	0.100 0
RN46	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
RN50	2.000 0	1.600 0	0.562 3	0.500 0
AR7962	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0
平均值	1.769 2	1.492 3	0.442 6	0.403 6
标准方差	0.438 5	0.301 3	0.254 9	—

3.2 聚类分析

运用数据分析软件 NTsys 软件的 UPGMA 法对 13 对引物扩增出的多态性位点进行花叶开唇兰与台湾银线兰的聚类分析 (图 2), 由图 2 可知遗传相似系数变幅为 0.38~1.00, 在遗传相似系数 0.38 处, 可将花叶开唇兰与台湾银线兰分开。Popgene 1.32 软件分析结果表明, 花叶开唇兰与台湾银线兰之间存在着一定的遗传距离, 距离值为 0.450 2, 且遗传相似系数不高, 为 0.637 5, 结合表 1 中的基因流 < 1, 可以看出表明两者之间存在较高的遗传分化。

3.3 SSR 指纹图谱构建

通过对 13 对 SSR 引物扩增结果进行分析, 最终筛选出 6 对具有显著多态性的 SSR 引物 (RN33、RN35、RN37、RN42、RN44、RN46), 在相同的迁移位置上, 以“1/0”标记扩增条带的有无, 构建花叶开唇兰与台湾银线兰的 DNA 分子指纹图谱 (表 3)。在实际应用进行区分时, 可与构建的指纹编码进行对比进行品种间的区分。

4 讨论

本实验筛选出 13 对 SSR 多态性引物可用于对花叶开唇兰与台湾银线兰的鉴别, NTsys 软件分析结果表明花叶开唇兰与台湾银线兰之间存在一定的遗传距离, 且在遗传相似系数 0.38 处可将两者区分开; Popgene 软件分析结果表明所用 SSR 引物多态

表 2 13对多态性 SSR 引物序列
Table 2 Thirteen pairs of SSR primer sequences

引物名称	正向序列 (5'-3')	反向序列 (5'-3')
RN32	TGAACCCGATTTGCCTTTAC	TGTGACTATTGCGTTTTGTGC
RN33	CCGCTACGTCGGAACCTTTAC	ACCCAGCCATTGTGCATCTTC
RN35	AGGAGGCCACACAATTCAAC	ATTGGACCACCTGACACCAT
RN36	CCAAGAACTCCCTGTGCAAT	ACGCCCTTCTTCTCCTAGC
RN37	CCTCTGGCTCCATCTTCAAC	AGCTCATCCTTGTTCCCTT
RN38	GGAGAGTCCAACACCGACAT	GCATGGAAAAGCTAGCACCT
RN41	GAGGTTCTGGAGCAGTGGAG	TCGAGTGATTGGTGTGTGGT
RN42	ACAAGAAGGTGGAGGTGGT	CACCCTACTGCGTCCATCT
RN43	CCCAACCTGTTTGACTCGTT	GGGCAGGGATTCTAGGTT
RN44	GCTCACTGCGAAAAGGAACT	GCGCCCCATCTCATAACT
RN46	GCTTGAGGATGACGAAGAGG	AGTCGGAGAAGGGGAGAGAG
RN50	GCTTTACCACCAGCTCAAGG	TCGCCATGAATTCCTAGTCC
AR7962	TGGGCCGGTTAAGTTGTTAG	GACCTGTGGTTCATGGGACT

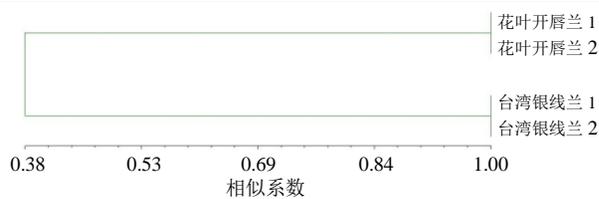


图 2 花叶开唇兰与台湾银线兰的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA cluster graph of genetic clustering among *A. roxburghii* and *A. formosanus*

性高，花叶开唇兰与台湾银线兰之间存在较高的遗传分化，因此，根据 SSR 分子标记的结果建立花叶开唇兰与台湾银线兰的遗传聚类图谱和指纹图谱，可为市场上药用金线莲商品的鉴别以及质量控制能起到有益的帮助。

SSR 是基于生物基因组普遍存在且随机分布的一种特殊序列，由于具有重复性及可靠性高等优势^[17]，已被广泛应用于遗传多样性分析^[18]、

表 3 6对特异性 SSR 引物多态性情况及构建的指纹图谱

Table 3 Fringerprints constructed by six pairs of polymorphic SSR primers

样本	引物						指纹编码
	RN33	RN35	RN37	RN42	RN44	RN46	
花叶开唇兰	10	111	11	111	111	101	1011111111111101
台湾银线兰	11	011	01	001	000	111	1101101001000111

指纹图谱的构建^[19]、群体遗传结构分析^[20]、分子标记辅助育种^[21]等。近年来，DNA 分子标记也开始在金线莲的鉴别中得到应用，如 Cheng 等^[22]首次用 RAPD 标记对台湾金线莲和恒春银线兰进行鉴别，黄颖桢等^[23]首次应用 ISSR 标记对金线莲的遗传多样性进行研究。本实验基于花叶开唇兰转录组测序的基础上，选用合适的引物，首次应用 SSR 技术对花叶开唇兰与台湾银线兰进行生药鉴别研究，分子生药学鉴定研究表明，花叶开唇兰与台湾银线兰存在一定的遗传分化。因此，该研究建立的分子标记技术鉴定金线莲真伪的方法可以较好地地区分市售花叶开唇兰与台湾银线兰，此方法的应用也可以为药用金线莲真伪的鉴别提供一个便捷的实验途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 福建省中药材标准 [S]. 2006: 155.

[2] 钟岑生. 金线莲的药用价值与开发 [J]. 广西农业科学, 1997, 28(2): 102-104.

[3] 魏文文, 江新晓, 林秀莲. 金线莲研究现状 [J]. 园艺与种苗, 2016, 36(7): 6-8.

[4] 屈信成, 严克俭, 罗小珍, 等. 金线莲与灰岩金线莲的性状与显微鉴别研究 [J]. 中国药业, 2016, 25(22): 35-37.

[5] 曾健, 林竞成, 黄坚航. 金线莲的应用与开发 [J]. 海峡药学, 1996, 8(4): 82-83.

[6] 陈卓, 黄自强. 金线莲降血糖作用的初步研究 [J]. 福建医药杂志, 2000, 22(S1): 207-208.

[7] 许文江, 陈裕, 林坤瑞. 药用野生金线莲植物资源的研究 [J]. 福建热作科技, 2000, 25(4): 9-10.

[8] 郑丽香. 金线莲的资源调查及生药学研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.

[9] 王海阁, 许文, 张勋, 等. 林下栽培金线莲的生药鉴别 [J]. 中药材, 2020, 43(2): 303-308.

[10] 黄哲, 党友超, 王世清. 黔产金线莲与其易混品斑叶兰的叶表皮显微特征研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2019,

- 41(2): 34-37.
- [11] 党友超, 黄哲, 李蒙禹, 等. 黔产金线莲及其易混品(斑叶兰)的显微鉴定研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2018, 40(4): 30-34.
- [12] 易骏, 吴建国, 张秀才, 等. 不同植物基原金线莲生药鉴别 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3570-3576.
- [13] 李群, 张文兰, 田茜, 等. 利用 SSR 标记技术鉴别玉米品种先玉 696 和先玉 335 的研究 [J]. 种子, 2017, 36(9): 121-123.
- [14] 邹福贤, 许文, 黄泽豪, 等. 金线莲转录组测序及其黄酮类合成相关基因分析 [J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(1): 66-74.
- [15] 陆敏佳, 蒋玉蓉, 陆国权, 等. 利用 SSR 标记分析藜麦品种的遗传多样性 [J]. 核农学报, 2015, 29(2): 260-269.
- [16] 黄婷, 马啸, 张新全, 等. 多花黑麦草 DUS 测定中 SSR 标记品种鉴定比较分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(2): 381-389.
- [17] 尹跃, 安巍, 赵建华, 等. 黑果枸杞转录组 SSR 信息分析及分子标记开发 [J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(2): 422-428.
- [18] 刘硕, 刘宁, 章秋平, 等. 中国华北和东北地区杏种质资源遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2019, 46(6): 1045-1056.
- [19] 倪维晨, 李瑞霞, 陶启威, 等. 基于 SSR 标记的地方品种糯性小玉米自交系指纹图谱构建 [J]. 浙江农业科学, 2019, 60(6): 911-914.
- [20] Gu X Z, Cao Y C, Zhang Z H, *et al.* Genetic diversity and population structure analysis of *Capsicum* germplasm accessions [J]. *J Integr Agric*, 2019, 18(6): 1312-1320.
- [21] 杨娟, 王雯, 沈火林. 辣椒恢复基因 SSR 标记定位及分子标记辅助选择育种 [J]. 中国瓜菜, 2010, 23(5): 1-5.
- [22] Cheng K T, Fu L C, Wang C S, *et al.* Identification of *Anoectochilus formosanus* and *Anoectochilus koshunensis* species with RAPD markers [J]. *Planta Med*, 1998, 64(1): 46-49.
- [23] 黄颖桢, 陈菁瑛, 赵云青, 等. 金线莲遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2230-2234.

[责任编辑 时圣明]