

溪黄草药材基原植物及近缘植物 ISSR-SCAR 分子标记开发

刘靖^{1,2}, 孟爽³, 刘军民^{1,2*}, 萧晓吉⁴, 古敬锋^{1,2}, 龚彩玲^{1,5}, 谢文波⁶, 赵双双⁷, 詹若挺^{1,2*} (1. 广州中医药大学中药学院, 广州 51000; 2. 岭南中药资源教育部重点实验室(广州中医药大学), 广州 510006; 3. 深圳市中医院药学部, 广东 深圳 518033; 4. 广东云浮中医药职业学院中药学院, 广东 云浮 527400; 5. 广州市医药职业学校, 广州 510430; 6. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518002; 7. 广东农垦热带农业研究院有限公司, 广州 511365)

摘要:目的 研究建立溪黄草药材基原植物及其近缘植物的特征性片段扩增区域(SCAR)分子标记技术,为溪黄草药材的基原鉴定提供新的分子鉴别手段。方法 采集溪黄草药材的基原植物及其近缘植物共5种29个居群,采用简单序列重复区间扩增多态性(ISSR)分子标记对代表居群的基因组DNA进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,获得ISSR特异性片段,经回收纯化、克隆、测序后,根据特异性片段测序结果设计可以直接用于它们高效鉴定的SCAR引物。结果 采用14对ISSR引物对18个代表样本进行聚合酶链式反应PCR扩增,获得4条特异性片段并成功转化为ISSR-SCAR分子标记,可分别用于特异性识别线纹香茶菜*Rabdosia lophanthoides*(Buch.-Ham. ex D. Don) H. Hara、长叶香茶菜*R. stracheyi*(Benth. Ex Hook. f.) Hara、溪黄草*R. serra*(Maxim.) H. Hara和显脉香茶菜*R. nervosa*(Hemsl.) C. Y. Wu et H. W. Li。结论 建立的ISSR-SCAR分子标记条带清晰明亮,结果稳定,能够准确、快速鉴别溪黄草药材的基原植物及其近缘植物,为溪黄草药材基原的分子鉴别提供了新的方法。

关键词:溪黄草药材基原植物;分子标记;简单序列重复区间扩增多态性;特异片段

doi:10.11669/cpj.2024.15.006 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)15-1400-08

Development of ISSR-SCAR Molecular Markers for Original Plants and Related Plants of *Rabdosia Herba*

LIU Jing^{1,2}, MENG Shuangshuang³, LIU Junming^{1,2*}, XIAO Xiaoji⁴, GU Jingfeng^{1,2}, GONG Cailing^{1,5}, XIE Wenbo⁶, ZHAO Shuangshuang⁷, ZHAN Ruoting^{1,2*} (1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; 3. Department of Pharmacy, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China; 4. Guangdong Yunfu Vocational College of Chinese Medicine, Yunfu 527400, China; 5. Guangzhou Pharmaceutical Vocational School, Guangzhou 510430, China; 6. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518110, China; 7. Guangdong Agribusiness Tropical Agriculture Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 511365, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study and establish sequence characterized amplified region (SCAR) molecular marker for identifying the original plants and related plants of *Rabdosia Herba*, and provide a new molecular identification method for the original plants of *Rabdosia Herba*. **METHODS** A total of 29 populations of the original plants and related plants of *Rabdosia Herba* were collected, and inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular marker was used to perform PCR amplification on the genomic DNA of the representative population of *Rabdosia Herba* to obtain ISSR-specific segments. After the ISSR-specific fragments were recovered, purified, cloned and sequenced, SCAR primers were designed based on the sequencing results, which were directly used for the efficient identification of the original plants of *Rabdosia Herba*. **RESULTS** Fourteen pairs of ISSR primers were used to perform PCR amplification on 18 representative samples of original plants and related plants of *Rabdosia Herba*, and 4 specific segments were obtained and successfully transformed into ISSR-SCAR molecular markers. These molecular markers can be used to specifically identify the *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Hara, *Rabdosia stracheyi* (Benth. Ex Hook. f.) Hara, *Rabdosia serra* (Maxim.) H. Hara, and *Rabdosia nervosa* (Hemsl.) C. Y. Wu et H. W. Li, respectively. **CONCLUSION** The established ISSR-SCAR molecular markers produce clear and bright bands with stable results, which can accurately and rapidly identify the original plants and related plants of *Rabdosia Herba*, providing a new method for the identification of the original plants of *Rabdosia Herba*.

KEY WORDS: *Rabdosia Herba* original plant; molecular marker; ISSR; specific segment

基金项目:2022年省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目资助(2022-NJS-00-002);云浮中医药(南药)产业创新团队项目资助(云科函[2023]96号,202301);广东省教育厅2021年广东省本科高校教学质量与教学改革建设项目资助(粤教高函[2021]29号)

作者简介:刘靖,男,硕士研究生 研究方向:中药材种质资源鉴定与品质评价 *通讯作者:刘军民,女,教授,硕士生导师 研究方向:中药材种质资源的鉴定与品质评价 Tel:(020)39358062;詹若挺,男,研究员,博士生导师 研究方向:中药资源可持续利用研究和开发 Tel:(020)39356128

溪黄草药材(*Rabdosia Herba*)具有清热利湿、凉血散瘀的功效,临床上常用于治疗急性肝炎、急性胆囊炎、肠炎、痢疾等疾病,在我国岭南地区被广泛应用,是消炎利胆片的组方原料。《广东省中药材标准》(20版)收载溪黄草药材为香茶菜属植物线纹香茶菜[*Rabdosia lophanthoides* (Buch. -Ham. ex D. Don) H. Hara]及其变种纤花香茶菜[*Rabdosia lophanthoides* var. *graciliflora* (Benth.) H. Hara]或溪黄草[*Rabdosia serra* (Maxim.) H. Hara]的干燥地上部分^[1],而2020年版《中国药典》四部记载其基原植物为线纹香茶菜(*R. lophanthoides*)或溪黄草(*R. serra*)^[2]。香茶菜属植物在我国民间有30余种作为药材使用^[3],本课题组在溪黄草药材种质资源调研与收集过程中发现,显脉香茶菜[*Rabdosia nervosa*

(Hemsl.) C. Y. Wu et H. W. Li]与长叶香茶菜[*Rabdosia stracheyi* (Benth. Ex Hook. f.) Hara]在岭南地区的民间也作为溪黄草药材使用^[4]。植物分类学上,溪黄草、显脉香茶菜属于香茶菜属香茶菜组(Sect. *Amethystoides*),线纹香茶菜、纤花香茶菜、长叶香茶菜则属于香茶菜属皱叶香茶菜组(Sect. *Rabdosia*)^[5],两组间性状差异较为明显,但组内植物由于性状特征较为相似,尤其是线纹香茶菜、纤花香茶菜和长叶香茶菜的性状特征较为相似(图1)。此外,香茶菜属的植物多为异花授粉植物,自然界中存在不少的过渡类型植物。调查还发现,由于环境的异质性,即便是同一种植物的不同居群植物的形态特征变异亦较大。这些因素都造成溪黄草药材基原的鉴定难以从性状特征上加以鉴别。



A - 线纹香茶菜; B - 纤花香茶菜; C - 长叶香茶菜; D - 溪黄草; E - 显脉香茶菜。
A - *R. lophanthoides*; B - *R. lophanthoides* var. *graciliflora*; C - *R. stracheyi*; D - *R. serra*; E - *R. nervosa*.

图1 溪黄草药材基原植物及近缘植物图

Fig. 1 Pictures of the original plants and related plants of *Rabdosia Herba*

在分子水平的鉴定研究上,迄今,学者们先后采用了DNA条形码、随机扩增多态性DNA(random-amplified polymorphic DNA, RAPD)与简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)分子标记技术^[6-8]对溪黄草(*R. serra*)、线纹香茶菜(*R. lophanthoides*)及其纤花变种(*R. lophanthoides* var. *graciliflora*)和狭基变种[*Rabdosia lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth.) H. Hara]的种间差异和亲缘关系进行研究,但研究结果均不能对溪黄草药材的基原实现简单、快速和准确地鉴定。特征性片段扩增区域(sequence characterized amplified region, SCAR)分子标记是采用通用引物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增的分子标记

技术[如RAPD、ISSR、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)、特异扩增多态性DNA(specifically amplified polymorphic DNA, SAPD)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等分子标记技术]的进一步发展^[9-14],即采用通用引物进行扩增,将扩增得到的特异性片段进行测序,根据测序结果设计引物,一般在原引物的基础上向内延伸10~15个bp,将原有的通用性引物转化为特异性引物,并用该引物进行基因组DNA检测^[15]。SCAR分子标记操作简便,成本较低,且可在较高退火温度下进行扩增,具有稳定性高、重复性好、简便快速的优点,对于未建立已知品种DNA数据库的物种,也能够高效

准地进行鉴别,如今 SCAR 分子标记已在人参、白术、黄精等中药材的鉴定研究中成功应用^[16-21]。鉴于此,本研究采用 ISSR 分子标记技术,对溪黄草药材基原植物及其近缘植物的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,根据扩增图谱筛选特异性片段,再将特异性片段转化为具有溪黄草药材基原植物或近缘植物特异性的 ISSR-SCAR 分子标记,以达到快速鉴定溪黄草药材基原植物及其近缘物种的目的,为溪黄草药材基原的分子鉴定提供新的鉴定方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

PowerPac Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); T100™ Thermal Cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); NanoDrop2000 微量紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司); OSE-470L TGreen Plus 切胶仪(天根生化科技有限公司); Gel View 1500 Pro 全自动凝胶成像系统(广州博鹭腾仪器仪表有限公司); Wise SpinCF-10 迷你型高速离心机(普瑞麦迪实验室技术有限公司); H2O3-100C 加热制冷型金属浴(卡尤迪

生物科技有限公司); LDZX-30KBS 型立式压力蒸气灭菌器(上海申安医疗器械厂); 八道移液器(0.5~10 μL,宝予德有限公司)。

1.2 试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒(批号:Q6135)、大量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(批号:R1174)、DH5α 感受态细胞(CB101)(天根生化科技有限公司); DNA Marker(DL2000,TSJ011)、琼脂糖(批号:21AG80102)、2×TSINGKE Master Mix(批号:22ST11105)、pClone007 Vector Kit(TSV-007)、ISSR 引物合成(北京擎科新业生物技术有限公司);核酸染料 SYBR Safe DNA Gel Stain(A8743,美国 APEX-BIO 公司);胰蛋白酶(LP0024)、酵母提取物(LP0021)(英国 OXOID 公司);NaCl、氨苄西林(Ampicillin,Amp)、琼脂粉均为国产分析纯。

植物材料采集自广东、江西、福建等地区的野生或栽培居群(表 1),均经广州中医药大学刘军民教授鉴定,并移栽于广州中医药大学时珍山溪黄草药材种质资源圃内,样品标本均存放于广州中医药大学中药资源教研室。采集各居群生长良好、无病虫害的植株嫩叶,于 -20 °C 冰箱中保存备用。

表 1 溪黄草药材基原植物及近缘植物居群采样信息

Tab. 1 Population sampling information of the original plants and related plants of Rabdosia Herba

Species/varieties	No.	Collection site (in Chinese)	Latitude (N)	Longitude (E)	Type	Number of samples
<i>Rabdosia serra</i>	X1	Shixing, Shaoguan, Guangdong(广东韶关始兴)	24°51'	114°11'	wild	13
	X2	Yangshan, Qingyuan, Guangdong(广东清远阳山)	24°20'	112°39'	wild	10
	X3	Boluo, Huizhou, Guangdong(广东清远博罗)	23°12'	114°02'	wild	15
	X4	Yingde, Qingyuan, Guangdong(广东清远英德)	24°20'	112°56'	semi-wild	15
	X5	Qujiang, Shaoguan, Guangdong(广东韶关曲江)	24°32'	113°31'	cultivated	10
	X6	Panyu, Guangzhou, Guangdong(广东广州番禺)	23°03'	113°23'	cultivated	12
	X7	Wuping, Longyan, Fujian(福建龙岩武平)	24°53'	116°02'	cultivated	10
	X8	Xingning, Meizhou, Guangdong(广东梅州兴宁)	24°07'	115°42'	wild	10
<i>R. lophanthoides</i>	W1	Pingyuan, Meizhou, Guangdong(广东梅州平远)	24°29'	115°50'	semi-wild	16
	W2	Shixing, Shaoguan, Guangdong(广东韶关始兴)	24°50'	114°04'	wild	8
<i>R. lophanthoides</i>	H1	Xinfeng, Shaoguan, Guangdong(广东韶关新丰)	24°13'	114°10'	wild	16
var. <i>graciliflora</i>	H2	Conghua, Guangzhou, Guangdong(广东广州从化)	23°44'	113°47'	wild	11
	H3	Meijiang, Meizhou, Guangdong(广东梅州梅江)	24°13'	116°07'	cultivated	12
	H4	Yingde, Qingyuan, Guangdong(广东清远英德)	24°20'	112°56'	cultivated	10
	H5	Yao Autonomous County of Liannan, Qingyuan, Guangdong(广东清远连南瑶族自治县)	24°39'	112°17'	cultivated	15
	H6	Pingyuan, Meizhou, Guangdong(广东梅州平远)	24°53'	115°57'	semi-wild	10
	H7	Xunwu, Ganzhou, Jiangxi(江西赣州寻乌)	24°56'	115°48'	wild	9
	H8	Puning, Jieyang, Guangdong(广东揭阳普宁)	23°21'	116°05'	cultivated	14
	H9	Pingyuan, Meizhou, Guangdong(广东梅州平远)	24°44'	115°48'	wild	11
	H10	Panyu, Guangzhou, Guangdong(广东广州番禺)	23°03'	113°23'	cultivated	12
	H11	Wuping, Longyan, Fujian(福建龙岩武平)	24°53'	116°02'	wild	10
<i>R. stracheyi</i>	H12	Wuping, Longyan, Fujian(福建龙岩武平)	24°53'	116°02'	cultivated	10
	H13	Tianhe, Guangzhou, Guangdong(广东广州天河)	23°12'	113°22'	cultivated	10
	H14	Chenghai, Shantou, Guangdong(广东汕头澄海)	23°24'	116°44'	cultivated	8
	Y1	Xinyi, Maoming, Guangdong(广东茂名信宜)	22°47'	111°58'	wild	10
<i>R. nervosa</i>	Y2	Yangchun, Yangjiang, Guangdong(广东阳江阳春)	22°33'	111°45'	wild	10
	Y3	Yangchun, Yangjiang, Guangdong(广东阳江阳春)	22°22'	112°04'	wild	3
	Y4	Yangchun, Yangjiang, Guangdong(广东阳江阳春)	22°22'	112°04'	wild	10
	M1	Tianhe, Guangzhou, Guangdong(广东广州天河)	23°11'	113°22'	cultivated	6

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取与检测

参照植物基因组 DNA 提取试剂盒的方法提取植株嫩叶基因组 DNA,提取的样品基因组 DNA 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,微量分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,并用试剂盒中的洗脱液 TE 调整 DNA 质量浓度至 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,保存在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

2.2 ISSR-PCR 扩增体系

参照 Meng 等^[8]建立的 ISSR-PCR 反应体系及在该体系下筛选出的 14 条 ISSR 引物,进行溪黄草药材基原植物 ISSR-SCAR 分子标记开发。ISSR-PCR 反应体系及扩增程序: $2 \times \text{Taq Master Mix } 12.5 \mu\text{L}$ (Mg^{2+} 浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP 浓度为 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 引物 $1.5 \mu\text{L}$ ($0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), DNA 模板 $1 \mu\text{L}$, 去离子水 $10 \mu\text{L}$, 总体积 $25 \mu\text{L}$; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 7 min , $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 45 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 2 min , 共循环 30 次, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存扩增产物。

2.3 特异性片段的获取与测序

从 29 个植物居群中选 9 个代表居群(溪黄草 *R. serra* X6、X8, 线纹香茶菜 *R. lophanthoides* W1、W2, 纤花香茶菜 *R. lophanthoides* var. *graciliflora* H3、H14, 长叶香茶菜 *R. stracheyi* Y2、Y3, 显脉香茶菜 *R. nervosa* M1), 每个居群取 2 个样本, 共 18 个样本, 利用 14 条 ISSR 引物分别对 18 个样本的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 并进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。紫外光下查看筛选 DNA 特异性片段, 利用大量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对特异片段进行 DNA 纯化回收。将纯化回收的 DNA 特异性片段, 按 pClone 007 Vector Kit (TSV-007) 的说明书将 DNA 特异性片段与载体连接, 再将该连接体系加入 $100 \mu\text{L}$ DH5 α 感受态细胞中, 进行转化培养。培养

后进行 PCR 扩增(引物使用载体通用引物, 反应体系及扩增程序同“2.2”项下)。PCR 产物于 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 对特异性片段进行测序, 测序工作由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

2.4 SCAR 标记引物的设计及验证

根据特异性片段的测序结果, 利用 Primer5.0 设计 SCAR 引物, 根据引物合成报告单的 T_m 值设计梯度退火温度, 以有目的条带出现的最高温度作为退火温度。用设计合成的引物对 18 个代表样本进行基因组 DNA 扩增, 验证引物是否在代表样本中保持条带特异性。若引物经验证仍然保持条带特异性, 则对其他居群进行进一步的基因组 DNA 扩增验证。SCAR 扩增反应体系: $2 \times \text{Taq Master Mix } 12.5 \mu\text{L}$ (Mg^{2+} 浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP 浓度为 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 正反引物各 $1.5 \mu\text{L}$ ($0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), DNA 模板 $1 \mu\text{L}$, 去离子水 $8.5 \mu\text{L}$, 总体积 $25 \mu\text{L}$ 。反应程序同 ISSR 反应扩增程序。

3 结果与分析

3.1 特异性片段的获取与测序

利用 14 条 ISSR 引物分别对 18 个代表样本的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 在 ISSR 引物的 PCR 扩增产物图谱中筛选获得 4 条特异性片段, 分别命名为 S10 线、S10 溪、S12 长、S15 溪。其中, 特异性片段 S10 线为随机引物 UBC810 在 310 bp 处仅线纹香茶菜(5~6)具有的多态性条带; S10 溪为 UBC810 在 290 bp 处仅溪黄草(13~16)具有的多态性条带; S12 长为 UBC812 在 1 643 bp 处仅长叶香茶菜(1~4)具有的多态性条带; S15 溪为 UBC815 在 816 bp 处仅溪黄草(13~16)具有的多态性条带(图 2)。将 4 条特异性片段纯化回收后, 与载体连接并进行转化培育, 挑取阳性菌落扩增并测序, 获取 4 条特异性条带序列信息, 初步转化为 SCAR 标记。



a - 特异性片段 S10 线; b - 特异性片段 S10 溪; c - 特异性片段 S12 长; d - 特异性片段 S15 溪; M - DL2000 DNA 相对分子质量标记; 1~2 - 长叶香茶菜 Y2; 3~4 - 长叶香茶菜 Y3; 5~6 - 线纹香茶菜 W1; 7~8 - 线纹香茶菜 W2; 9~10 - 纤花香茶菜 H14; 11~12 - 纤花香茶菜 H3; 13~14 - 溪黄草 X6; 15~16 - 溪黄草 X8; 17~18 - 显脉香茶菜 M1。
a - specific segment S10 Xian; b - specific segment S10 Xi; c - specific segment S12 Chang; d - specific segment S15 Xi; M - DL2000 DNA marker; 1 - 2 - *R. stracheyi* Y2; 3 - 4 - *R. stracheyi* Y3; 5 - 6 - *R. lophanthoides* W1; 7 - 8 - *R. lophanthoides* W2; 9 - 10 - *R. lophanthoides* var. *graciliflora* H14; 11 - 12 - *R. lophanthoides* var. *graciliflora* H3; 13 - 14 - *R. serra* X6; 15 - 16 - *R. serra* X8; 17 - 18 - *R. nervosa* M1.

图 2 引物 UBC810(A)、UBC812(B)、UBC815(C) 对 18 个溪黄草药材基原植物及近缘植物样本的扩增结果

Fig. 2 Amplification results of primers UBC810(A), UBC812(B) and UBC815(C) for 18 samples of the original plants and related plants of Rabdosia Herba

3.2 SCAR 引物的设计及验证

根据纯化回收的 4 条特异性片段的测序数据,在原有引物的基础上向内延伸 5~12 个碱基,设计 4 对引物(P10 线、P10 溪、P12 长、P15 溪),引物对序列见表 2。

表 2 4 对 SCAR 引物序列及退火温度

Tab.2 Sequences and annealing temperatures of 4 pairs of SCAR primers

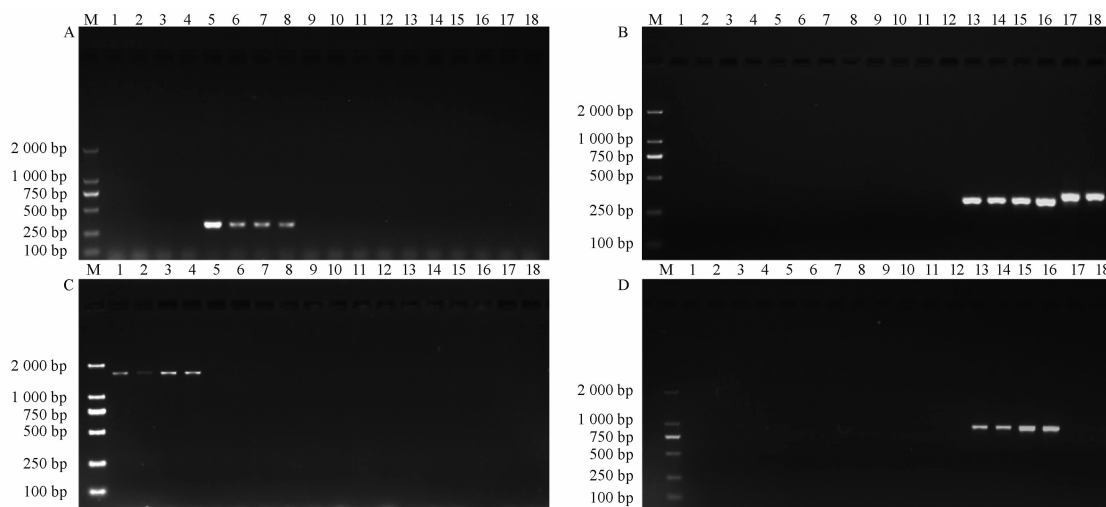
Name	Primers	T_m /°C	T (Actual annealing)/°C
P10Xian-F	GAGAGAGAGAGAGATGGCAGCT	61.2	62.2
P10Xian-R	GAGAGAGAGAGAGATCATCTACGTAC	61.1	62.2
P10Xi-F	GAGAGAGAGAGAGATATAGATATAAAC	56.8	60.6
P10Xi-R	GAGAGAGAGAGAGATGACTG	57.6	60.6
P12Chang-F	GAGAGAGAGAGAGAATACTGT	56.0	59.8
P12Chang-R	GAGAGAGAGAGAGAATAAAAAGAATC	56.5	59.8
P15Xi-F	CTCTCTCTCTCTCTCGATTT	55.8	59.6
P15Xi-R	CTCTCTCTCTCTCTGTATATGTATAT	56.7	59.6

注:F - 正向引物;R - 反向引物; T_m - 解链温度。

Note:F - forward primer; R - reverse primer; T_m - melting temperature.

将 4 对 SCAR 引物对 18 个代表样本进行 PCR 扩增,如结果只扩增出目标条带,则继续取其他居群的样本继续进行验证,避免因居群间的多样性出现假阳性的结果;如 18 个样本的扩增结果出现了非目标条带,则说明引物特异性消失,需要调高退火温度或者重新设计引物。

4 对引物均成功转化为特异性标记,P10 线引物的扩增产物图谱中,只有线纹香茶菜能扩增出特异性片段;P10 溪引物的扩增产物图谱中,溪黄草与显脉香茶菜均能扩增出特异性片段;P12 长引物的扩增产物图谱中,只有长叶香茶菜能扩增出特异性片段;P15 溪引物的扩增产物图谱中,只有溪黄草能扩增出特异性片段(图 3)。而纤花香茶菜的特异性条带在转化为 SCAR 标记后其特异性消失,目前未能准确鉴别出纤花香茶菜。



M - DL2000 DNA 相对分子质量标记;1~2 - 长叶香茶菜 Y2;3~4 - 长叶香茶菜 Y3;5~6 - 线纹香茶菜 W1;7~8 - 线纹香茶菜 W2;9~10 - 纤花香茶菜 H14;11~12 - 纤花香茶菜 H3;13~14 - 溪黄草 X6;15~16 - 溪黄草 X8;17~18 - 显脉香茶菜 M1。

M - DL2000 DNA marker; 1~2 - *R. stracheyi* Y2; 3~4 - *R. stracheyi* Y3; 5~6 - *R. lophanthoides* W1; 7~8 - *R. lophanthoides* W2; 9~10 - *R. lophanthoides* var. *graciliflora* H14; 11~12 - *R. lophanthoides* var. *graciliflora* H3; 13~14 - *R. serra* X6; 15~16 - *R. serra* X8; 17~18 - *R. nervosa* M1.

图 3 引物 P10 线(A)、P10 溪(B)、P12 长(C)、P15 溪(D)对 18 个溪黄草药材基原植物及近缘植物样本扩增结果

Fig.3 Amplification results of primers P10 Xian(A), P10 Xi(B), P12 Chang(C) and P15 Xi(D) for 18 samples of the original plants and related plants of *Rabdosia* Herba

将 4 对引物对其他居群进行进一步的基因组 DNA 扩增验证,验证结果中 4 对引物只对特定的溪黄草药材基原植物或近缘植物扩增出特异性条带,而在其他物种的扩增图谱中均未出现扩增条带(表 3),可见 ISSR 标记已成功转化为 SCAR 标记。

P10 溪引物的 PCR 扩增图谱中,溪黄草与显脉香茶菜均能扩增出特异性片段,但两者显示出片段大小的差异(图 3)。为进一步区分溪黄草与

显脉香茶菜,将 P10 溪引物扩增出的溪黄草与显脉香茶菜的片段进行测序,发现溪黄草与显脉香茶菜有部分碱基的差异(图 4)。根据这一碱基差异设计引物,正向引物不变,反向引物根据差异片段设计,将重新设计得到的引物命名为 P10 显,序列如下:

正向引物不变:GAGAGAGAGAGAGATAT-AGATATAAAC

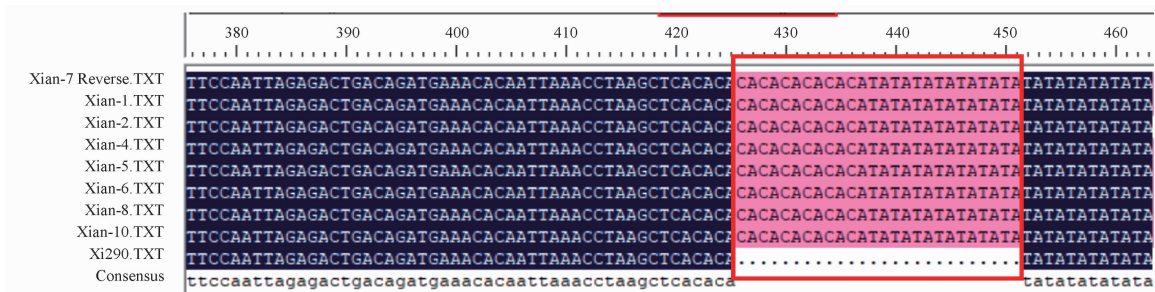
表3 溪黄草药材基原植物及近缘植物 29 个居群的特征性片段扩增区域(SCAR)标记分布

Tab. 3 Distribution of SCAR markers in 29 populations of original plants and related plants of *Rabdosia Herba*

SCAR primers	<i>R. serra</i>								<i>R. nervosa</i>			<i>R. lophanthoides</i>		<i>R. lophanthoides</i> var. <i>graciliflora</i>								<i>R. stracheyi</i>								
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	M1	W1	W2	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	Y1	Y2	Y3	Y4	
P10 Xian										-	-																			
P10 Xi	-	-	-	-	-	-	-	-	-																					
P12 Chang																											-	-	-	-
P15 Xi	-	-	-	-	-	-	-	-																						

注: - - 此居群在对应 SCAR 引物的 PCR 扩增图谱中能扩增出特异性片段。

Note: - - this population can amplify specific fragments in the PCR amplification results of the corresponding SCAR primers.



Xian-7 Reverse ~ Xian-10 为显脉香茶菜扩增片段的部分测序结果; Xi290 为溪黄草扩增片段的部分测序结果; 框内为溪黄草与显脉香茶菜碱基序列差异部分。

Xian-7 Reverse - Xian-10 are partial sequencing results of *R. nervosa* amplified fragments; Xi290 is partial sequencing results of *R. serra* amplified fragments; The difference in base sequence between *R. serra* and *R. nervosa* is shown in the box.

图4 显脉香茶菜与溪黄草扩增片段测序结果比对

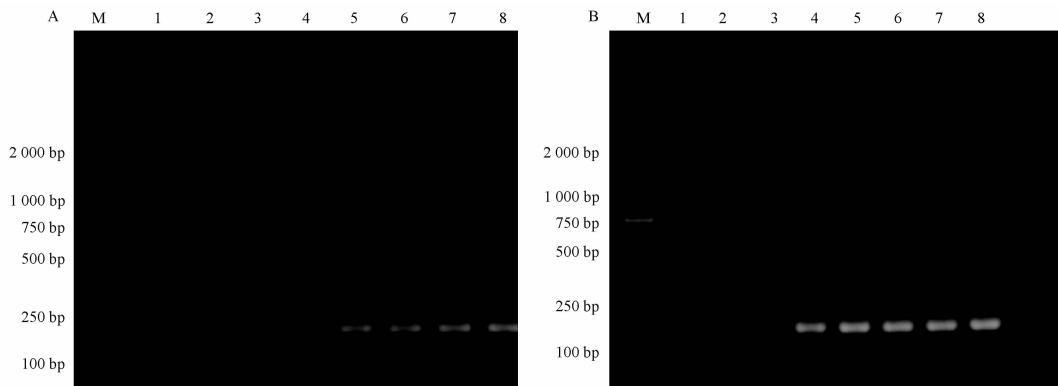
Fig. 4 Comparison of sequencing results of amplified fragments between *R. nervosa* and *R. serra*

反向引物为 R: ATATATATATATATATGTGTGT-TGTGTGTGTG

取 P10 溪引物对溪黄草与显脉香茶菜进行第一次 PCR 扩增; 取 1 μL 第一次 PCR 扩增后的产物与 9 μL 灭菌水混合, 再以混合物 1 μL 为模板, P10 显为引物进行第二次 PCR 扩增, 设置 55.9 ~ 65.9 °C 之间 8 个退火温度梯度分别对溪黄草与显脉香茶菜

进行扩增(引物 T_m 值为 55.9 °C)。

在第三泳道, 显脉香茶菜出现条带而溪黄草无条带(错配消失), 故选择 63.9 °C 作为退火温度(图 5)。以 P10 显为引物, 63.9 °C 为退火温度对溪黄草和显脉香茶菜进行 PCR 扩增, 结果可见显脉香茶菜出现条带, 而溪黄草未出现条带, 即可区分出显脉香茶菜与溪黄草(图 6)。

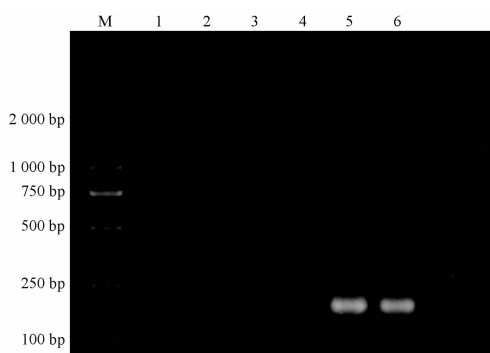


1 ~ 8 分别为退火温度 65.9, 65.2, 63.9, 62.0, 59.7, 57.8, 56.6, 55.9 °C。

1 - 8 are annealing temperature of 65.9, 65.2, 63.9, 62.0, 59.7, 57.8, 56.6, 55.9 °C, respectively.

图5 溪黄草(A)和显脉香茶菜(B)退火温度梯度扩增结果

Fig. 5 Amplification results of annealing temperature gradient of *R. serra*(A) and *R. nervosa*(B)



1~4 - 溪黄草; 5~6 - 显脉香茶菜; 退火温度为 63.9 °C。
1~4 - *R. serra*; 5~6 - *R. nervosa*; Annealing temperature was 63.9 °C.

图6 溪黄草和显脉香茶菜扩增图
Fig.6 Amplification diagram of *R. serra* and *R. nervosa*

4 讨论

随着分子生物技术的迅速发展,中药鉴定已经进入分子水平,DNA 分子标记具有特异性高、重复性好、结果可靠、不易受外在环境限制、所需材料少、标记广、操作相对简便快捷、成本较低等特点,目前在中药材鉴别、中药资源亲缘关系、种质资源遗传多样性评价等方面的研究中应用广泛^[22]。溪黄草药材具有多基原植物入药的特点,由于部分基原植物之间的形态特征较为相似,传统的性状鉴定方法很难对药材进行鉴别区分,导致溪黄草商品药材一直存在品种资源混乱的现象。研究表明,溪黄草药材不同基原之间的化学成分的种类和含量差异较大,且功效也具有一定的差异^[23]。因此,开发高效分子标记体系,从分子水平上对溪黄草药材的基原植物及近缘植物进行有效的分类鉴别,对于溪黄草药材基原的规范和药材质量标准的制定具有重要意义。Ye 等^[24]采用 ISSR 技术对 6 个溪黄草药材基原植物及近缘植物进行鉴别,用 13 条引物扩增出 491 条条带,其中多态性条带 490 条,证明 ISSR 方法可以区分溪黄草药材不同基原。ISSR 分子标记本身具有重复性好、稳定性高等特点,用其转化的 SCAR 标记也更加可靠,SCAR 分子标记成功开发后,可根据 PCR 扩增图上条带的有无及片段大小的不同来判断供试样本的物种,无须通过基因测序,直观体现出各物种基因组 DNA 的差异,操作简便,成本低廉。本研究采集了我国广东、江西、福建等地区的溪黄草药材 5 种基原植物及近缘植物共 29 个居群,在 ISSR 指纹图谱的基础上,成功开发出 4 条具有物种特异性 ISSR-SCAR 分子标记,其中 P10 线、P12 长、P15 溪引物可分别特异性鉴别出线纹香茶菜、长叶香茶菜、溪黄草,P10 溪引物可将溪黄草与显脉香茶菜与

其他种区分。本研究共发现了 17 条特异性片段,但仅有 4 条成功转化并在后续验证中仍保留其特异性,其中纤花香茶菜特异性条带在转化为 SCAR 标记后未能保留其特异性。

SCAR 标记的转化是个十分复杂的过程,回收纯化过程中受到污染,引物设计不合适,退火温度选择不恰当等都可能造成转化失败^[25]。其中退火温度的优化对于 SCAR 标记的成功转化至关重要。在本研究中,以引物 T_m 值为退火温度时,往往会由于退火温度过低而扩增出非特异性片段;而在进行温度梯度实验时,发现过高的温度会扩增不到特异性条带,SCAR 标记的特异性扩增需要在较高且适合的退火温度下才能实现,一般比其 T_m 值高 2~5 °C,如 P12 长引物以其 T_m 值 56.0 °C 为退火温度时,出现多条非目的性的条带,引物特异性消失,将退火温度以 56.0~66.0 °C 为梯度进行退火温度的优化,扩增图谱中有条带出现的最高温度为 59.8 °C,再以 59.8 °C 为退火温度对原 18 个样本进行扩增,只出现了长叶香茶菜的条带,P12 长引物的特异性保留。此外,特异性引物对多个物种进行扩增,可能是这些物种的亲缘关系较近的原因,如 P10 溪引物扩增产物中同时出现溪黄草与显脉香茶菜的条带,可能是 P10 溪引物在两者基因组中具有同源序列。Ye 等^[24]根据 ISSR 分子标记的 PCR 扩增结果,对溪黄草药材基原植物及近缘植物 4 种 2 变种,共 33 个居群进行聚类分析,在遗传一致度在 0.80 水平上将总体分为 2 大类,属于香茶菜组的溪黄草与显脉香茶菜为第一类,属于皱叶香茶菜组的长叶香茶菜、线纹香茶菜及其两个变种为第二类,且显脉香茶菜居群混于溪黄草居群中,未单独成一支,同样说明显脉香茶菜与溪黄草的遗传背景可能较为接近。本研究中观察到 P10 溪引物扩增图谱中溪黄草与显脉香茶菜有片段大小的差异,为进一步区分溪黄草与显脉香茶菜,对两者的扩增片段进行测序,并根据测序结果的差异重新设计出能够特异性鉴定显脉香茶菜的 P10 显引物,成功将溪黄草与显脉香茶菜区分开。

溪黄草药材基原植物为异花授粉,种与变种或变种与变种间存在过渡类型,为溪黄草药材基原植物的分类与鉴定工作带来极大的不便,而 SCAR 分子标记的一个显著特点是可以由显性标记发展为更加有用的共显性标记^[15],因此本研究开发获得的溪黄草药材基原植物显性 SCAR 分子标记,可进一步发展为共显性的 SCAR 标记,从而应用于溪黄草药

材基原植物杂合子的高效鉴定,为建立香茶菜属植物的分子标记辅助选择育种体系提供新的技术支持。

REFERENCES

- [1] Guangdong Food and Drug Administration. *Guangdong Chinese Materia Medica Standards*(广东省中药材标准)[M]. Vol 2. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2011: 347-353.
- [2] *Ch. P*(2020) Vol IV(中国药典 2020 年版四部)[S]. 2020: 558.
- [3] DENF Q H. Study on distribution and development of *Herbra Isodonis Lophanthoidis* [J]. *Pharm Today*(今日药理学), 2009, 19(9): 21-25.
- [4] DENG Q H, WANG D Q, HUANG Y, *et al.* Resource Investigation of *Rabdosia serra* (Maxim.) H. Hara [C]. The 10th National Symposium on Natural Medicinal Material Resources Proceedings and Abstracts(海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会论文集), Lanzhou: The Society of Natural Medicinal Material Resources CSNR, 2012: 125-127.
- [5] Editorial Committee of Flora of China. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 1977: 416.
- [6] TAN R X, HUANG J, XU W, *et al.* DNA Molecular identification of *Rabdosia Serra* rotundus and its Confused Products [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2017, 40(2): 320-324.
- [7] MO X L, ZENG Q Q, HUANG S S, *et al.* Identification of *Herba Rabdosiae Serra* from Different Plant Resources by RAPD Method [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2012, 35(9): 1388-1391.
- [8] MENG S S, LIU J M, LUO D F, *et al.* Establishment and Optimization of ISSR-PCR System for *Rabdosia serra* and *Rabdosia lophanthoides* [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2018, 29(5): 652-656.
- [9] LIU W, LAN A F, ZHANG Q Q, *et al.* Genetic diversity analyses and species specificity RAPD-SCAR marker exploitation of the cultivated *Morchella* strains [J]. *Mycosystema*(菌物学报), 2018, 37(12): 1650-1660.
- [10] ALBANI M C, BATTEY N H, WILKINSON M J. The development of ISSR-derived SCAR markers around the SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(3): 571-579.
- [11] ZHAO Q J, LI H B, QU Y, *et al.* SCAR markers-based molecular identification of 20 flowering cherries (*Cerasus*) cultivars [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*(南京林业大学学报 自然科学版), 2016, 40(5): 34-40.
- [12] ZHAO Y H, ZHAO H T, HOU W H, *et al.* Developments of SRAP and SCAR molecular markers associated with sex in *bama hemp* [J/OL]. *Mol Plant Breed*(分子植物育种), 2021 [2021-09-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210928.1406.029.html>.
- [13] SHIRASAWA K, KISHITANI S, NISHIO T. Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence[J]. *Mol Breeding*, 2004, 14(3): 283-292.
- [14] ZHAO H Y, XIAO L, DU D Z. AFLP and SCAR markers for seed colour in rape *Dahuang* (*Brassica rapa* L.) [J]. *Chin J Oil Crop Sci*(中国油料作物学报), 2013, 35(5): 476-483.
- [15] PARAN I, Michelmore RW. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85(8): 985-993.
- [16] JIANG Q, LIU L, XIAO B, *et al.* *Panax ginseng*-specific sequence characterized amplified region (SCAR) marker for testing medicinal products[J]. *J Cent South Univ*(中南大学学报 英文版), 2018, 25(5): 1052-1062.
- [17] LI M, CHEN Q, MAO X Q. The screening and cloning of SCAR molecular marker from *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. *J Zhejiang Univ Technol*(浙江工业大学学报), 2015, 43(2): 148-153.
- [18] YE B H, CHEN Y W, HU C J, *et al.* SCAR Molecular Identification of *Polygonatum filipe* [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2019, 54(20): 1647-1652.
- [19] LUO Y, HUANG C X, CAI D Z, *et al.* Cloning and validation of SCAR molecular markers of *Sarcandra glabra* [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2020, 42(10): 2796-2799.
- [20] ZHOU P. The development and bioinformatics analysis of RAPD-SCAR markers of *Rehmannia Glutinosa*. L [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2012.
- [21] WANG J K. Construction of RAPD-SCAR system for *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl and their utilization to assess genetic diversity of germplasm [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016.
- [22] MAO S, LIU C Q, XIANG T T, *et al.* DNA-based Authentication of TCM by Molecular Biological Techniques [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(5): 238-242.
- [23] SUN L Q, QIAN F, LI Y M, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Linearstripe Rabdosia Herb* from various origins [J]. *J Shanghai Univ Tradit Chin Med*(上海中医药大学学报), 2020, 34(6): 88-98.
- [24] YE Z, MENG S, ZHAO S, *et al.* Analysis of genetic diversity among five closely related species used as *Xihuangcao* herbs using ISSR and SCoT molecular markers[J]. *Phytotaxa*, 2022, 556(1): 49-62.
- [25] SUN B J, LI Z L, LI Z X, *et al.* Reasons for SCAR Conversion Failure and its Remedies [J]. *Mol Plant Breed*(分子植物育种), 2010, 8(3): 589-594.

(收稿日期:2023-05-19)