

降香黄檀 DNA 提取及其 rDNA-ITS 序列 分子系统发育分析

李奇威¹, 谭贵良², 孙瑾³, 苏越骁², 王业胜¹, 周林¹, 朱爽¹

(1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院; 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广东广州, 510006;

2. 中山市质量计量监督检测所, 广东中山, 528403; 3. 华南农业大学林学院, 广东广州, 510120)

摘要:以核糖体转录间隔区(rDNA-ITS)序列为分子标记, 结合 GenBank 数据库中已有序列, 阐明黄檀属内不同物种之间的分子系统发育关系。通过改良十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB)提取降香黄檀总 DNA, 利用引物对 rDNA-ITS 序列进行聚合酶链式反应(PCR 扩增)和序列测定。结果表明, 基于 rDNA-ITS 序列测定、位点分析和系统发育树构建方法, 可利用 ITS 序列进行黄檀属树种准确的分子鉴定, 为其种类鉴定和种间分类地位提供分子生物学依据。

关键词:降香黄檀; DNA 提取; ITS 序列; 分子鉴定

中图分类号: S781.1; S781.83

文献标识码: A

文章编号: 1001-8654 (2016) 03-0021-04

DNA Extractions from *Dalbergia odorifera* and a Molecular Phylogenetic Analyses Using Its rDNA-ITS Sequence

LI Qi-wei¹, TAN Gui-liang², SUN Jin³, SU Yue-xiao², WANG Ye-sheng¹, ZHOU Lin¹, ZHU Shuang¹

(1. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University;

Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidates of Guangdong Province, Guangzhou 510006, Guangdong, China;

2. Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, Zhongshan 528403, Guangdong, China;

3. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510120, Guangdong, China)

Abstract: To clarify phylogenetic relationships among different species of genus *Dalbergia*, genetic analysis was carried out for *Dalbergia odorifera* using its rDNA-ITS sequence as molecular markers. Total DNA was extracted with a modified CTAB method, and rDNA-ITS regions were amplified with universally conserved primers. The results showed that, based on molecular biology methods of rDNA-ITS sequence analysis, accurate molecular identification could be realized in genus *Dalbergia* so as to provide molecular evidence for taxonomy and identification of different species in genus *Dalbergia*.

Key words: *Dalbergia odorifera*; DNA extraction; ITS sequence; molecular identification

红木是用于制作家具及工艺品的一类木材的总称, 根据 GB/T 18107-2000《红木》, 红木共有 5 属 8

类 33 种。由于不同种之间木材的价格差别很大, 时常出现廉价木材冒充高价木材的现象, 给生产者和消费者造成巨大经济损失。以产自海南的降香黄檀(*Dalbergia odorifera* T. C. Chen)为例, 俗称海南香枝木或海南黄花梨, 是最昂贵的家具原料之一, 且心材可入药, 价格一直高居不下; 另有一种主要产自越南的越南黄檀^[1](*D. tonkinensis* Prain), 材色、

收稿日期: 2015-08-13; 修改日期: 2016-04-05

基金项目: 中山市科技计划“基于 DNA 的红木家具木材树种识别技术研究及分子库建立”项目(2013A3FC0249)。

作者简介: 李奇威(1993—), 男, 广东药科大学硕士研究生。

责任作者: 朱爽, 男, 广东药科大学生命科学与生物制药学院副教授。

密度及构造与降香黄檀极为相似,也作为香枝木在市场上流通,一般消费者很难识别。因此,木材识别技术对于生产加工,保护珍稀濒危材种,规范市场秩序,维护消费者权益等具有重要意义^[2]。

传统的木材鉴定主要依靠宏观观察和微观解剖学方法,不仅需要鉴定者具有丰富的木材形态解剖学知识及鉴定经验,且传统的鉴定方法很难将木材准确鉴定到种。近年来,有学者利用高效液相色谱法(HPLC)^[3]、气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)^[4]等技术成功对红木进行种别鉴定,然而这些方法对设备等硬件要求较高,局限性较大。

随着分子生物学的发展,DNA条形码因具有种内变异小、不同种变异大,片段短、变异区两端序列高度保守等特点,逐渐被应用于物种鉴定^[5-6]。研究发现,rbcL-trnH、ITS及matK等DNA条形码序列在“种”水平的鉴定能力较好^[7-8],并成功利用ITS序列进行黄檀属植物的物种分子鉴定^[9],目前未见降香黄檀的DNA提取及较完整的与降香黄檀近缘树种的分子系统发育树图的报道,特别是其与越南黄檀之间的分子系统发育分析。为此,笔者通过改良十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB)提取降香黄檀总DNA,进行rDNA-ITS序列的扩增、测序和系统发育分析,基于GenBank数据库中已有序列,构建部分黄檀属树种的分子系统发育树,为黄檀属木材的种类鉴定和种间的分类地位,提供分子生物学依据。

1 材料与仪器

1.1 试验材料

试材:取自海南。新鲜树干,心材呈红褐色,具有褐色条纹,边材灰黄褐色,有辛辣气味。组织切片观察可见,其轴向薄壁组织类型以傍管带状为主、木射线细胞大而圆,初步判定为降香黄檀。

样品圆盘直径约12 cm, -20℃保存。

1.2 试验仪器

电子恒温水浴锅;台式离心机;Tanon-4100 数码凝胶图像分析系统;SPX 生化培养箱;BG-SubMIDI 水平电泳仪;ABI 2720 DNA 聚合酶链式反应仪(PCR仪)。

1.3 试验试剂

SYBR Green I 电泳染料;DL2000 DNA 分子量

标记指示剂(DNA Marker);Taq 酶;DNA 凝胶回收试剂盒。试剂均为分析纯。

2 试验方法

2.1 改良 CTAB 法提取总 DNA

称取0.5 g木材样品,加入液氮并研磨成粉末。加入5 mL预热的CTAB裂解液,65℃水浴2 h后12 000 rpm离心10 min。上清液用等体积的Tris饱和酚、酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)和氯仿-异戊醇(24:1)各抽提1次,离心10 min后取上清液。加入0.2倍体积3 mol/L NaAc和0.8倍体积异丙醇,-20℃沉淀1 h,离心弃上清液,用1 mL 70%冷乙醇洗涤沉淀2次,干燥后溶于20 μL 无菌1×TE缓冲液中,在-20℃保存备用。

2.2 ITS 序列 PCR 扩增

选择扩增植物rDNA-ITS序列的通用引物^[10-11]ITS4(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')和ITS5(5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3'),对红木总DNA进行rDNA-ITS序列扩增。DNA聚合酶链式反应(PCR)采用20 μL反应体系。

扩增参数:95℃预变性3 min,94℃变性1 min,56℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环,72℃延伸10 min。PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,120V电泳30 min,经SYBR Green I染色后,用Tannon-4100全自动数码凝胶图像分析系统观察、拍照。

2.3 PCR 产物纯化、连接和转化

PCR扩增产物采用DNA凝胶回收试剂盒进行割胶回收。降香黄檀rDNA-ITS序列的PCR扩增产物从1%的琼脂凝胶中割胶纯化。纯化产物连接到pMD18-T-Vector载体,连接产物转化到大肠杆菌*Escherichia coli* JM109感受态细胞,进行氨苄青霉素选择和蓝白斑的筛选。

2.4 PCR 检测与测序

挑取单克隆菌液进行测序,得到的序列与GenBank中已有的ITS区序列进行比较,得到该序列大概的分子系统发育关系。

2.5 序列分析与系统发育树的建立

将GenBank数据库中与降香黄檀ITS序列同源性较高的6条同属不同种的ITS序列、降香黄檀ITS2

序列、试验测得的降香黄檀 ITS 序列, 和豆科紫檀属檀香紫檀(*Pterocarpus santalinus*)一起导入 MEGA (Version 6.06) 软件, 其中檀香紫檀作为外类群, 使用 Clustal W 多序列比对功能, 进行对位排序, 空位处作缺失状态。以序列用软件中的最大简约法 (Maximum Parsimony) 构建系统进化树, 系统发育树的各分支置信度用自举检验法 (boot-strap text) 作 1000 次可信度分析。

表 1 GenBank 获取的 ITS 序列物种名称及编号
Tab.1 Names and GenBank accession numbers of ITS sequences of relative species

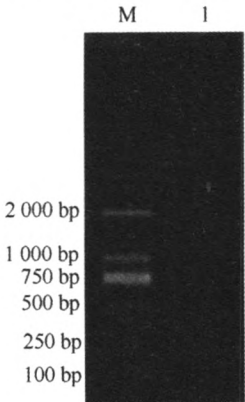
物种名称	GenBank 注册登记号
奥氏黄檀 <i>D. oliveri</i>	AB828652
巴西黄檀 <i>D. nigra</i>	EF451074
多裂黄檀 <i>D. rimosa</i>	AB828655
南岭黄檀 <i>D. balansae</i>	AB828612
印度黄檀 <i>D. sissoo</i>	KM276202
两粤黄檀 <i>D. benthamii</i>	AB828614
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	GQ434362
越南黄檀 <i>D. tonkinensis</i>	FR854141
檀香紫檀 <i>P. santalinus</i>	KM887419

3 结果与讨论

3.1 DNA 提取结果

试验所用的 CTAB 中含有 5% PVP, PVP 可以络合酚, 减少酚对 DNA 的降解。取 1×TE 回溶的降香黄檀总 DNA 样品 3uL, 用 SYBR Green I 作为显色剂进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统记录的结果, 见图 1。

图 1 显示, 样品的总 DNA 主带清晰, 片段完整。



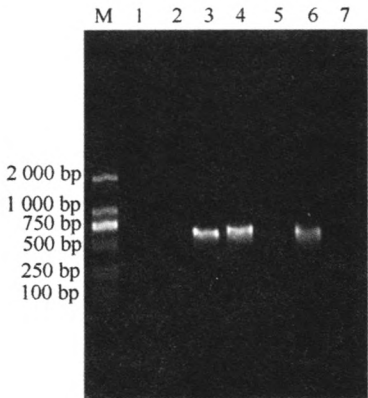
M: DNA marker; 1: 降香黄檀边材

图 1 总 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA samples

3.2 降香黄檀 ITS 序列 PCR 扩增结果

以提取的总 DNA 为模板, 模板浓度按 1、10、10²、10³、10⁴ 倍的梯度稀释后, 进行 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增。模板浓度梯度扩增结果见图 2。

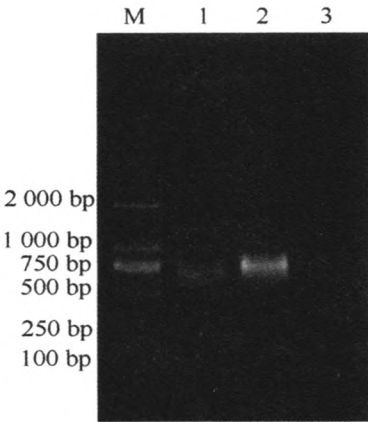


M: DNA Marker; 1: 1×; 2: 10×; 3: 10²×; 4: 10³×; 5: 10⁴×; 6: 阳性对照; 7: 阴性对照

图 2 模板总 DNA 浓度稀释梯度 PCR 扩增
Fig.2 PCR amplification of gradient template concentration

由图 2 可知, 模板浓度稀释倍数在 10²、10³ 倍时条带较亮; 而 10 倍和 10⁴ 倍时条带较暗。原因是前者模板溶液中仍有 PCR 抑制物, 后者模板浓度太低, 导致扩增效果不佳。因此, 进行降香黄檀 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增的模板浓度稀释倍数范围在 1×10²~1×10³ 倍。

降香黄檀 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3。



M: DNA marker; 1: 降香黄檀; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照

图 3 最佳模板浓度下 PCR 扩增
Fig.3 PCR amplification with optimal template concentration

由图3可知,降香黄檀 rDNA-ITS 序列 PCR 产物主条带清晰,非特异扩增条带少,大小在 700 bp 左右。由此可见,在最佳的模板浓度下,可以减少降香黄檀中多糖、酚等抑制物对 PCR 的不利影响。

3.3 ITS 序列分析

将单克隆菌液的测序结果与 GenBank 比对,与已发表的越南黄檀 ITS 序列 (FR854141) 有 99% 相似度,与已发表的多裂黄檀 ITS 序列 (AB828655) 有 98% 相似度。根据 GenBank 上已登录的黄檀属 ITS 序列,确定样品 ITS2 序列的界限后,获得 ITS2 序列,并重新在 GenBank 上进行比对,与已发表的降香黄檀 ITS2 序列 (GQ434362) 有 100% 相似度。这是由于 GenBank 上尚未登记降香黄檀的完整 ITS 序列,同时也说明,降香黄檀与越南黄檀和多裂黄檀在 ITS 序列上,具有高度相似性。

通过对实测降香黄檀、GenBank 登记的降香黄檀、越南黄檀和多裂黄檀的 ITS2 序列比对,共发现 4 个变异位点 (见表 2),可利用 ITS2 序列进行物种鉴定。

表 2 三种黄檀 ITS2 序列的特异性鉴别位点
Tab.2 Identification sites in ITS2 sequence of three species of genus *Dalbergia*

物种	位点			
	21 bp	157 bp	165 bp	200 bp
样品	-	A	C	T
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	-	A	C	T
越南黄檀 <i>D. tonkinensis</i>	-	A	A	T
多裂黄檀 <i>D. rimosa</i>	C	C	C	C

实测的 ITS2 序列与表 1 所列 ITS 序列比对后,用最大简约法 (MP) 构建系统发育树,见图 4。

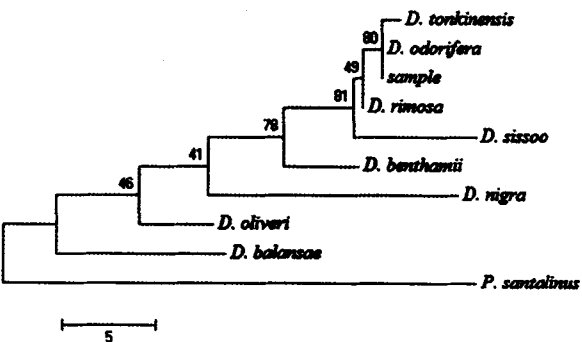


图 4 基于 ITS2 序列构建的 MP 树
Fig.4 Phylogenetic tree obtained by MP method based on ITS2 region

由图 4 可知,所有黄檀属物种聚为一支,外类群紫檀属檀香紫檀单独聚为一支,与传统分类结果相同。多裂黄檀处于不同于降香黄檀和越南黄檀的分支,说明多裂黄檀与后两者不属于同一植物类群。

两个降香黄檀和越南黄檀聚为一支,支持强度为 85%,其中越南黄檀进化距离比降香黄檀远,说明降香黄檀和越南黄檀有较近的亲缘关系,且有遗传差异性,主要体现在 ITS2 序列碱基位点的变异上。

4 结论

1)采用改良 CTAB 法提取降香黄檀边材总 DNA,并以此为模板,利用通用引物 ITS4 和 ITS5 进行多梯度 PCR 扩增,可提取出较完整的 DNA,PCR 模板浓度稀释倍数范围在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ 倍时可扩增出条带清晰的 ITS 序列。

2)对黄檀属多个物种的序列分析和遗传学分析表明:降香黄檀、越南黄檀、多裂黄檀的 ITS2 序列有 4 个变异位点,基于 ITS2 序列构建的系统发育树,可对其进行区分。

参考文献:

[1] 韦直,陈德昭,陈邦余,等.中国植物志(40卷)[M].北京:科学出版社,1994.
[2] 姜笑梅,殷亚方,刘波.木材树种识别技术现状、发展与展望[J].木材工业,2010,24(4):36-39.
[3] 沈明月,章启元,朱仲良.基于 HPLC 技术及模式识别方法鉴别 4 种红木[J].林业科学,2012,48(5):168-172.
[4] 朱涛.基于 GC-MS 技术不同进样方式的红木识别研究及其指纹图谱构建[D].安徽:安徽农业大学,2013.
[5] 焦立超,殷亚方,孙清鹏,等.基于 DNA 的木材识别新技术发展与应用[J].木材工业,2012,26(1):27-30.
[6] 张蓉,殷亚方,徐魁梧,等.DNA 技术在木材来源鉴定中的应用[J].木材工业,2015,29(3):31-34.
[7] Nguyen T P Trang, N M Ducl, N V Sinh, et al. Application of DNA barcoding markers to the identification of Hopea species[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(3): 9181-9190.
[8] Jiao L C, Yin Y F, Cheng Y M, et al. DNA barcoding for identification of the endangered species Aquilaria sinensis: comparison of data from heated or aged wood samples[J]. Holzforschung, 2014:68(4):487-494.
[9] 余敏,张浩,刘盛全,等.降香黄檀木材 DNA 提取及 rDNA-ITS 序列条形码分子鉴定[J].林产化学与工业,2014,34(5):103-108.
[10] Innis M A, Gelf and D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications[M]. San Diego: Academic Press, Inc. C A. 1990.
[11] Chou S J, Yen J H, Fang C L, et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers[J]. Planta Med, 2007, 73(13): 1421-1426.

(责任编辑 姜征、劳万里)