

# 菟丝子属六种杂草籽DNA条形码鉴定研究

姚磊<sup>1\*</sup>, 尤波<sup>1</sup>, 张箭<sup>1</sup>, 赵黎明<sup>2</sup>, 郑超<sup>3</sup>

<sup>1</sup>绥芬河海关综合技术中心, 黑龙江 牡丹江

<sup>2</sup>黄岛海关综合技术中心, 山东 青岛

<sup>3</sup>哈尔滨海关技术中心, 黑龙江 哈尔滨

收稿日期: 2021年11月1日; 录用日期: 2021年11月28日; 发布日期: 2021年12月8日

## 摘要

本研究通过比较用于植物鉴定的DNA条形码序列ITS1、ITS2、*rbcL*、*matK*在菟丝子属(*Cuscuta* L.) 6个种的杂草籽的种间差异, 分析研究菟丝子属DNA条形码鉴定的主要特征。通过对样品进行DNA提取、扩增、测序, 利用NCBI中的Nucleotide BLAST、邻接法(Neighbor-Joining)进行鉴定分析。经综合比较可以看出利用DNA条形码能够准确地鉴别菟丝子属杂草, 其中ITS2、*rbcL*序列的鉴定成功率较高, 适合作为鉴别菟丝子属杂草籽的条形码序列。本研究结果以期为DNA条形码技术在菟丝子属杂草籽的筛选鉴定中提供依据。

## 关键词

菟丝子属, 杂草种子, DNA条形码, ITS2, *rbcL*

# Identification of DNA Barcodes in Six Weed Species of *Cuscuta* L.

Lei Yao<sup>1\*</sup>, Bo You<sup>1</sup>, Jian Zhang<sup>1</sup>, Liming Zhao<sup>2</sup>, Chao Zheng<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Technology Center of Suifenhe Customs District, Mudanjiang Heilongjiang

<sup>2</sup>Technology Center of Huangdao Customs District, Qingdao Shandong

<sup>3</sup>Technology Center of Harbin Customs District, Harbin Heilongjiang

Received: Nov. 1<sup>st</sup>, 2021; accepted: Nov. 28<sup>th</sup>, 2021; published: Dec. 8<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

In this study, four DNA barcode fragments, ITS1, ITS2, *rbcL* and *matK* were used for plant identification in six species of *Cuscuta* L. to analyze the main characteristics of DNA barcoding identification of *Cuscuta* L.. Nucleotide BLAST and neighbor-joining in NCBI were used for DNA extraction,

\*第一作者。

**amplification and sequencing. Through comprehensive comparison, it can be seen that DNA barcoding can be used to identify weeds of *Cuscuta* accurately, and ITS2 and *rbcL* sequences have a higher success rate of identification, which is suitable for identifying *Cuscuta* L. seeds. The results are designed to establish the DNA barcode technique in the identification of *Cuscuta* L. seeds.**

## Keywords

*Cuscuta* L., Weed Seeds, DNA Barcode, ITS2, *rbcL*

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

菟丝子属(*Cuscuta* L.)是双子叶植物旋花科一年生寄生缠绕草本植物,为《中华草本》收录的草药,具有较高的药用价值,但因其生命力极强,一旦在农田发生,很难根除,易对大豆、玉米等产生直接危害,该属所有种都是《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中的检疫性杂草。菟丝子属在黑龙江口岸截获率较高,是进境大豆截获的主要检疫性有害生物之一[1]。主要是因为菟丝子可借助种子形态随寄主及其产品远距离传播,而且俄罗斯为提高产量,未完全遵循科学轮作制度,重茬种植现象较多,导致田间杂草增加[2] [3]。在实际检疫鉴定中,菟丝子属主要依靠形态特征进行鉴定,而由于该属种类多、种子小、形态特征相似,同时由于货物的装卸、远距离运输等原因,种子的外表形态被磨损的几率很大,因而成为鉴定的一大难题,此时利用DNA条形码技术进行鉴定显得尤为重要。在此背景下,本研究通过比较用于植物鉴定的DNA条形码序列ITS1、ITS2、*rbcL*、*matK*在田野菟丝子、中国菟丝子、南方菟丝子、欧洲菟丝子、单柱菟丝子及杯花菟丝子6个种的杂草籽的种间差异,比较其对菟丝子属杂草种类的鉴别能力,分析研究菟丝子属DNA条形码鉴定的主要特征,为口岸地区日常检疫工作中针对检疫性杂草筛选鉴定提供新的思路,在防止外来有害菟丝子属杂草籽的入侵等方面具有重要的意义。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 供试种子材料

本研究供试种子为绥芬河海关标本馆馆藏的菟丝子属6个近似种的种子标本,标本均来自原农业部植检所杂草室(1995年),共6个样品(编号为1~6)。具体品种名称及来源见表1。

**Table 1.** Code, scientific name and source of test materials

**表 1.** 供试材料代码、学名和来源

序号	中文名	学名(种拉丁名)	来源
1	田野菟丝子	<i>Cuscuta campestris</i>	原农业部植检所杂草室
2	中国菟丝子	<i>Cuscuta chinensis</i>	原农业部植检所杂草室
3	南方菟丝子	<i>Cuscuta australis</i>	原农业部植检所杂草室
4	欧洲菟丝子	<i>Cuscuta europaea</i>	原农业部植检所杂草室
5	单柱菟丝子	<i>Cuscuta monogyna</i>	原农业部植检所杂草室
6	杯花菟丝子	<i>Cuscuta cupulata</i> Engelm	原农业部植检所杂草室

## 2.2. 主要仪器设备及试剂

冷冻离心机 Z36HK (德国 HERMEL)、体视显微镜 OLYMPUS SZX12 (日本)、PCR 仪 EPPENDORF (德国)、电泳仪 EC 1000XL (美国)、凝胶成像系统 ImageQuant 300 (美国)、Premix Ex Taq、ROX Reference Dye II (50×) \* 4 试剂以及检测引物和探针均购于宝生物工程(大连)有限公司、营养琼脂(Nutrient Agar, BD)、植物基因组 DNA 提取试剂盒均购于北京天根生化科技有限公司。

## 2.3. 引物

选用四对特异性引物, 具体引物序列见表 2。

**Table 2.** Specific primer sequences for each DNA bar code amplification

**表 2.** 各 DNA 条形码扩增的特异性引物序列

marKer	Name of primers	Primer sequences 5'-3'	Mean size of the marKer (size range) in bp
ITS	5a fwd	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	707
	4 rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(571~1153)
ITS2	S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	226
	S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	(163~311)
<i>rbcL</i>	1f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	704
	724r	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	(702~883)
<i>matK</i>	390F	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	794
	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	(656~861)

## 3. 方法

### 3.1. 总 DNA 的提取

分别取菟丝子属不同种杂草籽 3 粒, 加入液氮迅速研磨至粉末状, 并将粉末转移到 1.5 mL 的离心管中, 提取 DNA 的方法采用改良后的天根新型植物基因组提取试剂盒, 具体方法参照试剂盒说明书进行操作。

### 3.2. RT-PCR 技术扩增基因序列片段

PCR 反应使用天根 PCR 反应预混液进行扩增, 反应采用 25 uL 体系: 2 uL DNA 模板, 上、下游引物各 1 uL, 补充 dH<sub>2</sub>O 至 25 uL。ITS、ITS2、*rbcL*、*matK* 的 PCR 扩增条件见表 3。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 由上海生工进行测序。

**Table 3.** PCR amplification conditions of DNA barcodes

**表 3.** 各 DNA 条形码的 PCR 扩增条件

基因序列	PCR 条件
ITS	94°C 5 min; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 cycles; 72°C 7 min
ITS2	94°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 45 s, 40 cycles; 72°C 10 min
<i>rbcL</i>	95°C 2 min; 94°C 1 min, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 34 cycles; 72°C 7 min
<i>matK</i>	95°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 cycles; 72°C 7 min

### 3.3. 系统进化分析

测序后将所得 DNA 条形码序列利用 NCBI 中的 Nucleotide BLAST 进行比对, 利用 MEGA 7.0 软件进行多重比对(Clustal W 方法), 分析不同基因片段间的核酸序列相似性; 使用 MEGA 7.0 软件, 邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树, 通过自举(bootstrap)对系统发育树进行检验, 1000 次重复。

## 4. 结果与分析

### 4.1. 样品 PCR 检测结果

由 ITS、ITS2、*rbcL*、*matK* 的 DNA 提取电泳图, 可以看出 6 个菟丝子种的 DNA 均被成功提取。由 ITS、ITS2、*rbcL*、*matK* 的 PCR 产物电泳图, 可以看出 ITS2, *rbcL* 对上述六种菟丝子鉴定成功率较高, 而 ITS、*matK* 对上述六种菟丝子的鉴定成功率为 0, 所以仅 ITS2、*rbcL* 可以用来鉴别菟丝子属种子。

### 4.2. DNA 条形码序列的多态性分析

本实验所测得的 6 个样品的 ITS2、*rbcL* 的序列长度、GC 含量见表 4。可以看出 *rbcL* DNA 条形码所扩增出的 DNA 序列长度均约为 727 bp, GC 含量相对较低, 在 41%~43%之间; 由 ITS2 DNA 条形码序列扩增出的 DNA 序列长度在 447~452 bp 之间, GC 含量在 49%~54%之间, 且 ITS2 基因所扩增出的 DNA 序列中 GC 含量差异要更显著一些。由于许多基因重要调控区域大都由高 GC 含量的 DNA 序列组成, 因此, 高 GC 含量的 DNA 条形码如果有较高的序列多态性, 更适宜用于较低级别分类单元(如种, 变种)的鉴定[4]。

**Table 4.** Analysis of sequence length and GC content of samples amplified based on two DNA barcode sequences

**表 4.** 基于 2 个 DNA 条形码序列扩增的样品序列长度及 GC 含量分析

样品	ITS2		<i>rbcL</i>	
	序列长度(bp)	GC 含量(%)	序列长度(bp)	GC 含量(%)
田野菟丝子	451	50	727	43
中国菟丝子	447	49	727	41
南方菟丝子	452	50	728	41
欧洲菟丝子	448	50	728	41
单柱菟丝子	449	54	727	43
杯花菟丝子	449	51	727	43

### 4.3. 基于 2 种 DNA 条形码构建的系统进化树分析

利用 MEGA 7.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 方法对 6 个测序样品构建出 NJ 系统发育树。基于 ITS2 条形码序列, 系统发育树分为两大支, 其中南方菟丝子(*Cuscuta australis*)、欧洲菟丝子(*Cuscuta europaea*)、田野菟丝子(*Cuscuta campestris*)、中国菟丝子(*Cuscuta chinensis*)、单柱菟丝子(*Cuscuta monogyna*)被分为一支; 杯花菟丝子(*Cuscuta cupulata* Engelm)单独分为一支, 从系统进化树可以看出 ITS2 序列可将杯花菟丝子、单柱菟丝子与其他四个种区分开来(见图 1)。基于 *rbcL* 条形码序列, 同样也聚为两类, 系统发育树分为两大支, 其中南方菟丝子、欧洲菟丝子、中国菟丝子被分为一支, 单柱菟丝子、田野菟丝子、杯花菟丝子被分为一支。南方菟丝子与欧洲菟丝子、田野菟丝子与杯花菟丝子的序列关系获得 100% 支持率, 说明此二者的种群亲缘关系较近, 独立性相对较弱(见图 2)。

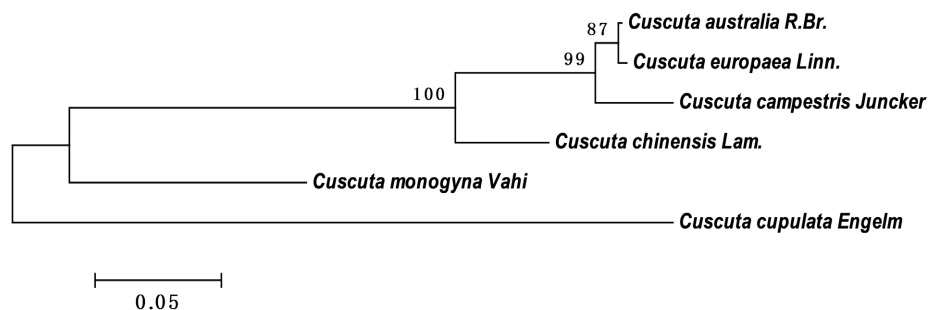


Figure 1. NJ phylogenetic tree constructed based on ITS2 DNA barcodes

图 1. 基于 ITS2 DNA 条形码构建的 NJ 系统进化树

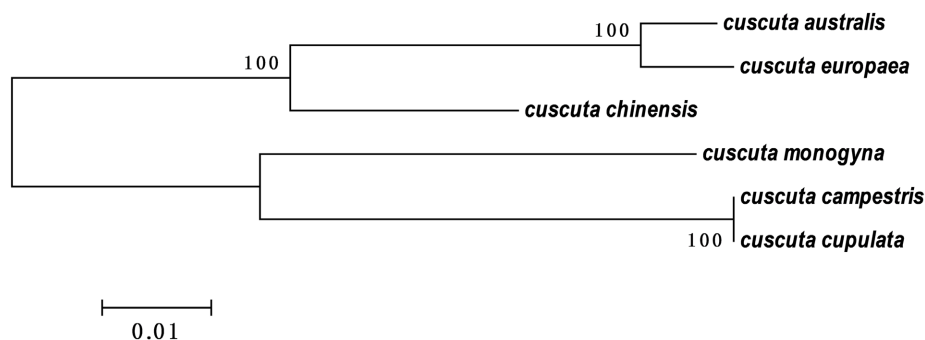


Figure 2. Phylogenetic tree of NJ based on *rbcL* DNA barcodes

图 2. 基于 *rbcL* DNA 条形码构建的 NJ 系统进化树

由以上数据可以得出, ITS2 序列构建的 NJ 树相对于 *rbcL* 序列的区分度更好, 更加适用于菟丝子属杂草的鉴别。

## 5. 讨论

目前, 菟丝子的鉴定方法有常规的形态学特征鉴定、化学分类标记法、色谱法、细胞学鉴定等[5]。DNA 条形码技术是一种利用一段高变异的标准基因片段, 快速、精确地进行物种鉴定的信息鉴别技术[6], 研究表明, ITS、*rbcL* 是植物中较为常用的 DNA 条形码[7], 然而在实际检疫鉴定中, DNA 条形码的应用依然有很多阻碍, 例如: 入境杂草多为子实形态, 未形成健全完善的鉴定信息, 无法利用 DNA 检查鉴定[8]。本研究比较分析了 ITS1、ITS2、*rbcL*、*matK* 四条 DNA 条形码对田野菟丝子、中国菟丝子、南方菟丝子、欧洲菟丝子、单柱菟丝子及杯花菟丝子 6 种菟丝子属杂草籽的鉴别情况。经综合比较可以看出 ITS2、*rbcL* 序列的鉴定成功率较高, 适合作为鉴别菟丝子属杂草籽的条形码序列。既可为菟丝子属不同种 DNA 鉴定提出探讨及对比分析, 同时也可作为菟丝子属种子检疫鉴定提供基础资料。

## 基金项目

原黑龙江出入境检验检疫局项目(2016HK011)。

## 参考文献

- [1] 魏尊苗, 艾嘉亮, 尤波, 等. 黑龙江口岸进口俄罗斯大豆疫情分析与建议[J]. 植物检疫, 2018, 32(4): 78-81.
- [2] 白雪梅, 西涅果夫斯基·米哈伊尔·奥列戈维奇. 俄罗斯大豆生产现状考察报告[J]. 黑龙江农业科学, 2017(4): 140-141.
- [3] Селихова, О.А., 魏然, 杰印, 等. 俄罗斯阿穆尔州大豆种植现状分析[J]. 黑龙江农业科学, 2021(1): 139-141.
- [4] Yan, H.F., Liu, Y.J., Xie, X.F., et al. (2015) DNA Barcoding Evaluation and ITS Taxonomic Implications in the Spe-

- 
- cies-Rich Genus *Primula* L. in China. *PLoS ONE*, **10**, 12-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122903>
- [5] 庄蓉, 黄可辉, 郭琼霞, 等. 菟丝子鉴定方法的研究进展[J]. 武夷科学, 2007, 23(12): 214-218.
- [6] Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., *et al.* (2003) Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**, 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- [7] Kress, W.J. and Erickson, D.L. (2007) A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PloS ONE*, **2**, e508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- [8] 于璇, 何瑞芳, 彭梅. 出入境检验检疫领域中植物 DNA 条形码技术的应用探究[J]. 中国新技术新产品, 2017(8): 14-15.