

用 ITS2 鉴定芥辣类调味品中山葵、辣根和芥末组分

陈雪贞¹, 李兆雯², 吴新², 芦春斌^{*1}

(1. 暨南大学 生命科学技术学院, 广东 广州 510632; 2. 珠海天禾食品有限公司, 广东 珠海 519090)

摘要: 日式饮食中的芥辣类调味品主要以同属十字花科的山葵 (*Eutrema wasabi*)、辣根 (*Armoracia rusticana*)、芥末 (mustard) 做原料加工而成。利用核糖体 DNA 内部转录间隔区 II (Internal transcribed spacer 2, ITS2) 技术快速、准确地鉴定出山葵、芥末和辣根, 为该技术应用用于芥辣类产品质量检测提供参考。以 3 种植物材料(山葵、辣根、白芥末)为实验材料, 提取基因组 DNA, 通过引物 ITS2_S2 进行 PCR 扩增得到 ITS2 片段, 测序结果通过生物信息学分析进行物种鉴定。MEGA7.0 (Molecular evolutionary genetics analysis) 分析 ITS2 序列结果表明, 山葵、白芥末和辣根 K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离在 0.088~0.171, 均大于 0.01, 种间变异位点有 36 个, 初步推断利用 ITS2 序列能将山葵、白芥末和辣根 3 物种区分开来。另外, GenBank 中获得山葵以及近亲西北山葵菜、辣根、芥末的 ITS2 序列, MEGA7.0 进行种间序列分析, 计算 K2P, 并用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建进化树, 山葵与近亲西北山葵菜聚为一支, 棕芥末与白芥末、黑芥末聚为一大支, 而辣根单独为一支。通过分析 ITS2 序列, 发现山葵与近亲西北山葵菜、辣根、芥末的种间 K2P 遗传距离在 0.030~0.105, 均大于 0.01。研究表明, 利用 ITS2 技术可以鉴别山葵、辣根和芥末等近缘物种, 此技术可以用于芥辣类调味品特定原料成分鉴定及定量, 为食品质量控制和食品安全提供科学依据。

关键词: 山葵; 辣根; 芥末; 内部转录间隔区 II (ITS2); 物种鉴定

中图分类号: S 5-33; TS 207.7 文章编号: 1673-1689(2021)09-0094-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.09.012

Identification of Components of *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana* and Mustard in Pungent Condiment by Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

CHEN Xuezheng¹, LI Zhaowen², WU Xin², LU Chunbin^{*1}

(1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Zhuhai Kingzest Food Co., Ltd., Zhuhai 519090, China)

Abstract: In Japanese diet, the pungent condiments are mainly made from *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana* and mustard, which are in the Brassicaceae family. *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana* and mustard were quickly and accurately identified in the study by the internal transcribed spacer 2 (ITS2) technology, providing a reference for the technology used in the quality control of pungent products. In this study, three plant materials, i.e., *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana* and white mustard, were used as the experimental materials to extract the genomic DNA, and the ITS2

收稿日期: 2020-10-18

基金项目: 暨南大学联合培养研究生示范基地项目 (82619149); 暨南大学山葵和辣根分子标记筛选及其在加工产品中的定量检测技术研究项目 (40118137)。

* 通信作者: 芦春斌 (1964—), 男, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事转基因植物与生殖安全研究。E-mail: tcbliu@jnu.edu.cn

sequence was obtained by PCR amplification using the universal primer ITS2_S2. After sequencing, bioinformatics analysis was performed for species identification. MEGA7.0 (Molecular evolutionary genetics analysis 7.0) analysis of ITS2 sequence showed that the K2P genetic distance (Kimura 2-parameter) of *Eutrema wasabi*, white mustard and horseradish was between 0.088 and 0.171, which were all higher than 0.01, and there were 36 interspecies variation sites, preliminarily inferring that ITS2 sequence could be used to distinguish the three species of *Eutrema wasabi*, mustard and horseradish. In addition, ITS2 sequences of *Eutrema wasabi* and its close relatives, such as *Eutrema edwardsii*, *Armoracia rusticana* and mustard, were obtained from GenBank. MEGA7.0 was used to analyze the interspecies sequence, calculate K2P and build evolutionary tree by Neighbor-joining (NJ). *Eutrema wasabi* and *Eutrema edwardsii* were gathered into a large branch. In the meantime, brown mustard, white mustard, and black mustard were gathered into a large branch. And *Armoracia rusticana* was alone as a branch. ITS2 sequence analysis of *Eutrema wasabi* and its close relatives, such as *Eutrema edwardsii*, *Armoracia rusticana* and mustard, showed that the genetic distance of K2P between species was between 0.030 and 0.105, which were all higher than 0.01. This study showed that ITS2 technology could be used to identify the relative species such as *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana* and mustard. This technology can be used to identify and quantify the specific raw material ingredients of pungent condiments, providing a scientific basis for food quality control and food safety.

Keywords: *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana*, mustard, internal transcribed spacer II (ITS2), species identification

芥辣类调味品是日式饮食常见的调味品,在食品领域有重要的市场地位。十字花科的一些植物含有丰富的异硫氰酸酯,使其有特殊的辛辣刺鼻的风味。常见的植物原料有山葵、辣根和芥末。山葵属于十字花科山萮菜属,与同属十字花科的马萝卜属的辣根和芸苔属的芥末,在味道和口感上非常相似,但由于山葵种植的环境和条件苛刻,使其价格也非常昂贵。而辣根味道与山葵非常相近,市面上多通过添加绿色色素到辣根中来代替山葵。芥菜的籽研磨成粉状后(俗称“芥末”),加入水后能散发出更重的刺激味道,也常用于替代山葵。但是山葵与辣根和芥末还是有一定的区别的,山葵中的 5-甲硫基戊基异硫氰酸酯、6-甲硫基己基异硫氰酸酯、7-甲硫基庚基异硫氰酸酯使其具有独特的香气,而这 3 种成分在辣根和芥末中是没有的。而且,芥末含有一种由二硫键连接的重链和轻链组成的蛋白质,可引起过敏性皮肤病、呼吸道疾病哮喘等^[1],是一种常见的过敏原,芥末与花生及其制品、大豆及其制品等食品出现在欧盟 14 种食品过敏源名单中。所以,快速、准确地鉴定出加工产品中的山葵、辣根、芥末成分对食品生产、质控和食品安全有重要的意义。国

内外已有许多研究通过筛选特异引物检测食品中的芥末过敏原。Palle-reisch 等利用逆转录元件 13G42-26 引物检测酿造香肠中的黑芥末和棕芥末,并通过双重实时 PCR 技术进行定量检测^[2-3]。在国内,邵娟等利用芥末 Sin A1 管家基因设计特异性引物灵敏地检测食品中芥末成分^[4]。

由于食品在加热、高压、研磨等加工过程中,食品的成分会变得复杂且多变,传统的检测方法对食品进行精确检测的难度大大增加。谷秀兰^[5]证明用传统的异硫氰酸烯丙酯检测方法检测芥末成分,其工序复杂,检测数据重复性不好、不稳定,并且该方法也不能将山葵、芥末、辣根这 3 种品种区分开来,也不能满足市场上对其原材料溯源的要求。

植物中不同品种的分子标记,无论在新鲜食品还是加工食品中,都能较为稳定、精确、高效地追溯食品原料来源和验证食品的真实性。在已有的报道中,许多研究利用黑芥子酶基因作为十字花科的特征基因来设计特异引物,从而检测出芥辣类产品的成分。黄科等^[6]用黑芥子酶基因证实了十字花科各属之间的进化关系,为往后研究提供参考。Hara 等^[7-8]设计了辣根的特异引物,扩增出辣根中黑芥子酶基

因 *ArMY1* (登录号 AY822710), 并且利用山葵的特定引物通过巢式 PCR 扩增山葵黑芥子酶基因 *WjMY1* (登录号 AB194903)。然而, 黑芥子酶基因同源性很高, 设计特异引物难度大, 难以设计黑芥子酶基因的种属特异性引物对其进行鉴定, 且特异基因表达量低、检测灵敏度不够高、PCR 检测中可能存在交叉反应等问题使检测难度加大。而本研究中利用一段标准的、相对更短的 DNA 序列通用基因核糖体 DNA 内部转录间隔区 II (ITS2) 作为标记, 对样品中该标准序列进行 PCR 扩增和测序, 从而将山葵与其近缘物种辣根、芥末等成分快速、准确、自动化地鉴定出来, 这已是食品与药物检测和鉴定常用的方法。内部转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS) 序列是核糖体 RNA 基因中存在于结构 RNA 的非功能性 RNA 序列, 位于转录区的 5.8S rRNA 基因的两侧, 分别称为 ITS1 和 ITS2。被子植物的 ITS 长度比较稳定, 在 600~700 bp, 其中 ITS1 的长度为 187~298 bp, ITS2 的长度为 187~252 bp^[9], ITS1 和 ITS2 是中度保守区域。由于核糖体 rDNA 是高度重复的串联序列, 这些高度重复单位受到的选择压力非常小, 同步进化作用下, ITS 在大部分真核生物中表现出较广泛的序列多态性, 种间差异比较明显, 所以可以利用 ITS 表现出的差异性对近亲物种进行鉴定^[10-11]。Chen 等^[12]提出 ITS2 序列可以作为标准 DNA 条形码鉴别药用植物及其近缘物种。内部转录间隔区 (ITS) 序列的鉴定系统已在一些植物及中药药材的鉴定中广泛应用, 但在食品检测应用中尤其是芥辣类调味品中 ITS 检测尚无应用。

作者利用 ITS2 标记 DNA 技术对山葵及辣根、芥末进行种属特异性鉴定, 为食品生产和产品质量控制中特异性检测山葵、辣根、芥末提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验样品 山葵 (*Eutrema wasabi*)、辣根 (*Armoracia rusticana*)、白芥末 (*Sinapis alba*) : 珠海天禾食品有限公司提供 (均是冻干研磨而成的干粉)。实验样品信息见表 1。

1.1.2 试剂 PCR 扩增引物由生工生物工程有限公司合成; ITS2 引物序列 (ITS2_S2F: ATGCGATA CTTGGTGTGAAT; ITS2_S3R: GACGCTTCTCCAGAC

表 1 实验样品信息

Table 1 Sample information

样品号	基原植物	取样部位	ITS 登录号
1	山葵 (<i>Eutrema wasabi</i>)	根	JN387781.1
2	辣根 (<i>Armoracia rusticana</i>)	根	AF078032.1
3	白芥末 (<i>Sinapis alba</i>)	种子	MH645770.1

TACAAT)、2×Taq PCR MasterMix: 生工生物工程有限公司产品; DNA 提取试剂、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、氯仿、乙醇、异丙醇、β-巯基乙醇: 北京鼎国生物科技有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 称取样品干粉 100 mg, 根据 CTAB 法中提取植物 DNA 方法提取基因组 DNA, DNA 用 TE 缓冲液溶解。

1.2.2 PCR 扩增及测序 反应体积 10 μL: 2×Taq PCR MasterMix 5 μL, 上下游引物各 1 μL (10 μmol/L), 总 DNA 1 μL (100 ng/μL), ddH₂O 2 μL。引物 ITS2 扩增程序: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物送至生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 GenBank 中获取山葵、辣根和芥末序列信息 从数据库中搜索山葵、辣根和芥末 3 种植物 ITS2 序列的信息 (见表 2)。用 MEGA7.0 进行序列对比, 计算遗传距离, 构建邻接树 (Neighbor-joining tree, NJ tree), 设置 Bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支支持率。

表 2 数据库中获取的山葵、辣根和芥末 3 种植物 ITS2 序列信息

Table 2 Information of ITS2 sequence of three plants of *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana* and mustard in the database

序号	基原植物	GenBank 登录号
1	白芥末 (<i>Sinapis alba</i>)	AF128106.1
2	棕芥末 (<i>Brassica juncea</i>)	AF128093.1
3	黑芥末 (<i>Brassica nigra</i>)	AF128103.1
4	辣根 (<i>Armoracia rusticana</i>)	MG235336.1
5	西北山嵛菜 (<i>Eutrema edwardsii</i>)	MG237688.1
6	山葵 (<i>Eutrema wasabi</i>)	JN387781.1

1.3 数据分析

3 种样品的 PCR 产物测序后获得测序峰图文件,使用 MEGA7.0 计算种间遗传距离,用最大似然法(Maximum likelihood,ML)构建进化树。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取与 PCR 扩增检测

用 CTAB 法提取山葵、辣根、白芥末 3 种样品的基因组 DNA,经 Nanodrop 紫外分光光度计检测其浓度和纯度。用通用引物 ITS2_S2 分别对 3 种样品提取的 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测,3 种 DNA 样品均扩增出 198 bp 特异性 DNA 条带。PCR 产物在广州生工生物工程有限公司进行测序。

2.2 山葵与辣根、白芥末种间序列信息及变异位点分析

经 MEGA7.0 分析比对后,山葵、辣根及白芥末的 ITS2 序列比对后种间序列长度、变异位点和遗传距离等信息统计结果见表 3。其中,白芥末与辣根之

间的 K2P 遗传距离最大,为 0.171;山葵与白芥末之间的 K2P 遗传距离最小,为 0.088;辣根与山葵的 K2P 遗传距离为 0.150。所有样品比对后 K2P 遗传距离都较远,且大于 0.01,初步推断利用 ITS2 序列能将山葵、辣根和白芥末区分开来。山葵与辣根、白芥末 ITS2 序列比对后序列长度有 198 bp,平均 G+C 碱基的含量有 6.99%。3 种样品 ITS2 序列比对后变异位点有 36 个,其中山葵与白芥末比对后变异位点有 18 个,山葵与辣根之间变异位点有 26 个,白芥末与辣根比对后变异位点有 29 个,具体变异位点见表 4。

表 3 山葵、辣根及白芥末 ITS2 序列比对信息

Table 3 ITS2 sequence information of *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana* and white mustard

ITS2 序列信息(物种)	比对后种间序列长度/bp	变异位点总数/个	K2P 遗传距离
山葵/白芥末	198	18	0.088
山葵/辣根	197	26	0.150
白芥末/辣根	198	29	0.171
山葵/白芥末/辣根	198	36	

表 4 山葵、辣根及白芥末比对后变异位点

Table 4 Variation sites of *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana* and white mustard

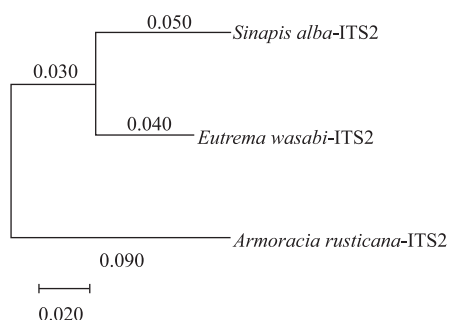
序列信息	突变位点																	
	17	19	26	27	28	29	30	32	33	35	36	44	70	92	100	101	102	104
白芥末-ITS2	C	C	C	T	C	G	A	G	A	A	T	A	C	T	T	T	T	G
山葵-ITS2	C	C	T	T	C	G	A	G	A	G	C	A	T	A	C	T	G	G
辣根-ITS2	T	T	T	C	T	T	G	A	T	T	T	G	C	T	C	C	G	A
序列信息	突变位点																	
	112	113	130	132	133	135	136	140	143	144	147	158	160	163	165	166	174	194
白芥末-ITS2	T	C	T	G	T	A	C	G	A	T	T	C	G	T	A	A	T	C
山葵-ITS2	T	C	T	C	A	T	T	G	A	A	T	T	T	C	G	G	C	C
辣根-ITS2	A	T	C	A	A	G	-	T	G	T	C	-	T	C	G	G	T	A

2.3 最大似然法(ML)构建进化树鉴别山葵、辣根及白芥末

通过 MEGA7.0 利用最大似然法(ML)分析山葵、辣根、白芥末 3 种样品,分析得山葵与白芥末和辣根之间 K2P 遗传距离分别为 0.090 和 0.160,白芥末与辣根之间的 K2P 遗传距离为 0.170。利用最大似然法(ML)构建的进化树(见图 1),辣根与白芥末之间的遗传距离最远,而白芥末与山葵之间的遗传距离最近。

2.4 用 ITS2 序列构建山葵及其近缘物种的邻接树(NJ tree)

从数据库 GenBank 中获取山葵、西北山嵛菜、白芥末、棕芥末、黑芥末、辣根的 ITS2 序列。利用 MEGA7.0 构建邻接树(NJ tree)(见图 2),山葵、西北山嵛菜以 99%的支持率聚为一大支,所以,山葵与其他物种用 ITS2 序列可明显区别开。而棕芥末与白芥末、黑芥末以 72%的支持率聚为一大支,白芥末和棕芥末以 75%的支持率聚为一支,支持率均大于



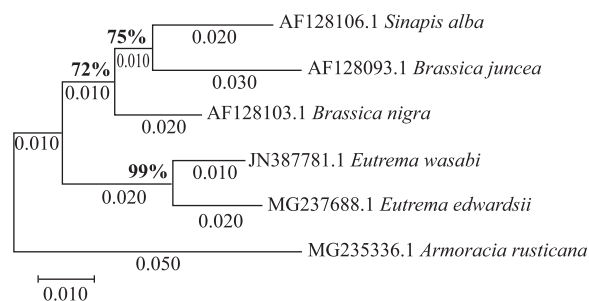
Bootstrap:None,分支上的数值显示 K2P 遗传距离

图 1 基于 ITS2 利用最大似然法 (ML) 构建山葵、辣根、白芥末的进化树

Fig. 1 ML method based on ITS2 to construct tree of *Eutrema wasabi*, *Armoracia rusticana*, and white mustard

70%。因此用 ITS2 序列可以将 3 种芥末与其他物种区分,且可以将黑芥末与白芥末、棕芥末区分开。分析 6 条 ITS2 序列的 K2P 遗传距离(见表 5),6 条序列之间 K2P 遗传距离在 0.030~0.105,均大于 0.01。其中山葵与西北山葵菜之间的遗传距离最近,为 0.030;棕芥末与辣根之间的遗传距离最近,为 0.105;3 种芥末之间的 K2P 遗传距离相近,在

0.045~0.049;而山葵菜属的山葵和西北山葵菜与芸苔属的 3 种芥末相比,K2P 遗传距离在 0.064~0.077;山葵菜属的山葵和西北山葵菜与辣根相比,K2P 遗传距离在 0.093~0.097;芸苔属的 3 种芥末与辣根相比,K2P 遗传距离在 0.080~0.105。所以山葵菜属与芸苔属 K2P 遗传距离最近,芸苔属与辣根之间 K2P 遗传距离最远。



Bootstrap:1 000 次重复,分支上的加粗数值显示为支持率(均 $\geq 50\%$),分支下数值显示为 K2P 遗传距离。

图 2 用 NJ 法基于山葵及其近缘物种 ITS2 序列构建进化树
Fig. 2 NJ method based on ITS2 sequences of *Eutrema wasabi* and its related species construct phylogenetic tree

表 5 山葵及其近缘物种 ITS2 序列 K2P 遗传距离分析

Table 5 Genetic distance analysis of ITS2 sequence of *Eutrema wasabi* and its related species

GenBank 登录号	AF128106.1 (白芥末-ITS2)	AF128093.1 (棕芥末-ITS2)	AF128103.1 (黑芥末-ITS2)	JN387781.1 (山葵-ITS2)	MG237688.1 (西北山葵菜-ITS2)	MG235336.1 (辣根-ITS2)
AF128106.1 (白芥末-ITS2)						
AF128093.1 (棕芥末-ITS2)	0.049					
AF128103.1 (黑芥末-ITS2)	0.045	0.049				
JN387781.1 (山葵-ITS2)	0.064	0.077	0.065			
MG237688.1 (西北山葵菜-ITS2)	0.072	0.077	0.064	0.030		
MG235336.1 (辣根-ITS2)	0.102	0.105	0.080	0.093	0.097	

2.5 讨论

食品成分检测因食品基质的极其复杂及不同程度的加工处理会使检测难度增加。利用动植物特定成分的基因特异性进行分子检测,尤其是进行有效成分和过敏源基因检测,在食品安全评估和测试中的应用尤为广泛。DNA 标记识别基因组核苷酸序

列的变异,可以突出物种间和物种内部的多样性。例如,线粒体 DNA 标记 *COI* 被证明对食品中动物物种的鉴定是有效的,该标记基因可用于鉴别牛品种和市面上标记错误的渔业产品^[13-14]。内部转录间隔区(ITS)是相近的种群中有着高度可变性的非功能片段,在区别或鉴定同属物种关系中具有重要作

用,这种技术不仅对真菌的鉴别成功率很高,还能通过分析 ITS 区域 DNA 序列鉴别引起食物中毒的蘑菇和鉴定不同产地的海藻干燥产品等植物材料^[15-16]。而 Amaia 等还基于 ITS 扩增利用 SYBR Green I 和 TaqMan 两种实时定量 PCR 检测方法检测炭疽曲霉的含量^[17]。

如今市面上许多芥辣类调味品用山葵为原材料,同时也有用近亲物种辣根和芥末掺入或代替,虽然辣根和芥末的风味与山葵相似,但山葵的价格与辣根、芥末相比还是不同的,而且芥末的鉴别对芥末过敏的人群来说也是非常重要的。已有许多研究利用特异引物检测食品中山葵和辣根、芥末成分,但因引物设计难度高和灵敏度低等原因使检测难度加大。DNA 条形码是一种利用基因组中标准和特定位置的短 DNA 序列来表征生物物种的技术手段。有研究人员就提出了两个叶绿体 DNA (cpDNA),分别是 *rbcl* 和 *matk*,作为植物 DNA 条形码^[18]。Alaklabi 等利用叶绿体基因 *matk* 和质体基因 *rbcl* 对濒危的植物芦荟特有假单胞菌进行分子鉴定^[19]。Fang 等通过对溺水动物的肺部浮游生物菌落的 *rbcl* 基因进行焦磷酸测序来辅助法医对溺水现场进行推断^[20]。但是,由于 cpDNA 在密切相关的分类群之间存在基因流动以及不能对系统发育精准分辨等潜在的问题,使这些序列进化速率低,限制了 cpDNA 在属或物种水平的分配能力,而 18S~25S 核糖体 DNA (ITS) 作为新的替代方法发展起来。Hao 等^[21]同时利用核 ITS 和 cpDNA 数据进行系统发育分析,证明中国四川省横断山脉的一种新种——大叶菊与云南属植物有明显区别。另外,目前大多数研究者认为 ITS2 比 ITS1、全长 ITS 更有利于进行植物鉴定^[22]。由于 ITS1 变化较大,无法保证保守的序列。Hoggard 等^[23]比较利用 ITS1、小亚基 rRNA 18S

(SSU)、大亚基 rRNA 26S (LSU) 和 ITS2 鉴定人类菌群,发现使用 ITS1、SSU 或 LSU 标记无法识别由 ITS2 标记识别的关键分类单元。而全长 ITS 序列比 ITS2 长很多,比 ITS2 测序所需要的成本高,且样品 DNA 降解也会影响全长 ITS 测序的精确性。另外 ITS2 有二级结构,比 ITS 序列保守性更高。因此,本研究中基于 ITS2 序列对芥辣类调味品中的山葵及辣根、芥末进行种属鉴定。

3 结 语

基于 ITS2 序列的物种鉴定和聚类分析结果可知,山葵与白芥末之间的 K2P 遗传距离最小,为 0.088;白芥末与辣根之间的 K2P 遗传距离最大,为 0.171。山葵与白芥末、辣根对比后变异位点有 36 个。K2P 遗传距离分析可以看出山葵、辣根和白芥末的彼此遗传距离较远,推测 3 种植物各归为一支,能用 ITS2 序列区分开来。从数据库获得山葵及其近缘物种 ITS2 序列,用 NJ 法进行系统分析表明,山葵和西北山葵菜以 99% 的支持率聚为一大支,白芥末、黑芥末和棕芥末聚为一大支。山葵菜属的山葵和西北山葵菜与芸苔属的 3 种芥末 K2P 遗传距离在 0.064~0.077,而芸苔属的 3 种芥末与辣根 K2P 遗传距离在 0.080~0.105, K2P 遗传距离都较远,且大于 0.01。这些结果表明,通过利用 ITS2 序列进行 DNA 扩增和测序分析能明显将山葵及其近缘物种鉴定出来。利用该方法可以鉴别芥辣类调味品中复杂成分,鉴定芥辣类产品中是否含有山葵、辣根或芥末。另外,还可以将该方法应用于实时定量 PCR,从而同时检测出含有山葵、辣根、芥末等成分的样品中各成分的含量,为芥辣类相关食品检测提供一种更高效、灵敏的检测方法。

参考文献:

- [1] FIGUEROA J, BLANCO C, DUMPIERREZ A G, et al. Mustard allergy confirmed by double-blind placebo-controlled food challenges: clinical features and cross-reactivity with mugwort pollen and plant-derived foods[J]. *Allergy (Oxford)*, 2005, 60(1): 48-55.
- [2] PALLE-REISCH M, WOLNY M, CICHNA-MARKL M, et al. Development and validation of a real-time PCR method for the simultaneous detection of black mustard (*Brassica nigra*) and brown mustard (*Brassica juncea*) in food[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 348-355.
- [3] PALLE-REISCH M, CICHNA-MARKL M, HOCHEGGER R. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of three mustard species (*Sinapis alba*, *Brassica nigra* and *Brassica juncea*) in food[J]. *Food Chemistry*, 2014, 153: 66-73.

- [4] 邵娟,曹际娟,刘洋,等. 实时荧光 PCR 检测食品中致敏原芥末成分[J]. 中国生物工程杂志,2011,31(1):61-64.
- [5] 谷秀兰. 异硫氰酸烯丙酯检测方法探讨[J]. 食品研究与开发,1997,18(4):48-50.
- [6] 黄科,郑金贵,温庆放,等. 十字花科植物中黑芥子酶基因的分子进化研究:中国园艺学会第十届会员代表大会暨学术讨论会论文集[C]. 长沙:中国园艺学会,2005,392-397.
- [7] HARA M,ODA M,YOGO T,et al. Detection of horseradish (*Armoracia rusticana*) myrosinase genes in samples containing horseradish[J]. **Food Science and Technology Research**,2008,14(4):389-394.
- [8] HARA M,YOGO T,SUMI T,et al. Detection of wasabi(*Wasabia japonica* Matsum.) in food products by using myrosinase genes [J]. **Food Science and Technology Research**,2007,13(4):380-394.
- [9] 王建波,张文驹,陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 中国科学院大学学报,1999,37(4):407-416.
- [10] ELDER, J F, TURNER B J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes[J]. **Quarterly Review of Biology**, 1995,70(3):297-320.
- [11] 刘艳玲,徐立铭,程中平. 基于 ITS 序列探讨核果类果树桃、李、杏、梅、樱的系统发育关系[J]. 园艺学报,2007,34(1):23-28.
- [12] CHEN S,YAO H,HAN J,et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. **Plos One**,2010,5(1):1-8.
- [13] CAI Y S,ZHANG L,SHEN F J,et al. DNA barcoding of 18 species of Bovidae[J]. **Chinese Science Bulletin**,2011,56(2):164-168.
- [14] FILONZI L,CHIESA R,VAGHI R,et al. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy[J]. **Food Research International**,2010,43(5):1383-1388.
- [15] MASAYAMA A,MURAKAMI T,SAKUMA D,et al. Discrimination of mushrooms causing food-poisoning incidents by using DNA sequence analysis[J]. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**,2012,53(5):237-242.
- [16] TOUHATA K,NAMIKOSHI A,SUZUKI T,et al. Origin identification of dried seaweed product “nori” by PCR-RFLP analysis of *Pyropia yezoensis* in the internal transcribed spacer ITS1 region[J]. **Fisheries Science**,2013,79(5):865-875.
- [17] AMAIA G S,BELÉN P,JESSICA G S,et al. Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR green and TaqMan quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene[J]. **FEMS Microbiology Letters**,2010(1):57-66.
- [18] GROUP C P W,HOLLINGSWORTH P M,FORREST L L,et al. A DNA barcode for land plants[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,2009,106(31):12794-12797.
- [19] ALAKLABI A,AHAMED A,AIQTHANIIN R N,et al. Molecular characterization of endangered endemic plant *Aloe pseudobroviolacea* using chloroplast *matk* and plastid *rbcl* gene[J]. **Saudi Journal of Biological Sciences**,2021,28(1):1123-1127.
- [20] FANG T,LIAO S,CHEN X,et al. Forensic drowning site inference employing mixed pyrosequencing profile of DNA barcode gene(*rbcl*)[J]. **International Journal of Legal Medicine**,2019,133(5):1351-1360.
- [21] HAO G,ZHANG C,Al-SHEHBAZ I A,et al. *Eutrema giganteum* (Brassicaceae), a new species from Sichuan, southwest China [J]. **Phytokeys**,2017(82):15-26.
- [22] HAN J,ZHU Y,CHEN X,et al. The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS[J]. **BioMed Research International**,2013(5):741476-741482.
- [23] HOGGARD M,VESTY A,WONG G,et al. Characterizing the human mycobiota:a comparison of small subunit rRNA,ITS1,ITS2, and large subunit rRNA genomic targets[J]. **Frontiers in Microbiology**,2018,9:2208-2221.