

崔志伟,王康才,郑 晖,等. DNA 条形码序列对不同品种金银花的鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):43-45.

DNA 条形码序列对不同品种金银花的鉴定

崔志伟¹,王康才¹,郑 晖²,张彦南¹

(1. 南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095; 2. 三明生物工程公司,江苏镇江 212000)

摘要:采用 DNA 条形码序列对不同品种的金银花进行鉴定,为金银花的鉴定提供分子依据。主要选择 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列进行评价,以扩增及测序成功率、变异位点数和 K-2-P 距离等指标评价各序列的鉴定能力。此外,基于 MEGA 4.0 分析不同品种金银花序列间 K-2-P 遗传距离并构建 NJ 树。结果表明:不同品种金银花 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列的扩增及测序成功率均较高,扩增成功率为 100%,*ITS2* 和 *psbA-trnH* 的测序成功率分别为 72.7%、91%,且两者均存在较多的变异位点,可以有效地区分金银花不同品种。说明 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 可以作为鉴定金银花不同品种的优势条形码组合。

关键词:DNA 条形码;*ITS2*; *psbA-trnH*; 金银花

中图分类号:S567.7⁺90.1

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2013)08-0043-03

金银花为忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica*)的干燥花蕾或带初开的花,具有清热解毒、凉散风热之功效^[1],是国内市场上的大宗药材。山东临沂地区和河南省新密县为道地产区,主要栽培品种有四季花、大毛花、鸡爪花等。近年来,由于市场对金银花的需求不断增加,价格偏高,国内多地大面积引种栽培,形成了许多金银花新产区。有研究发现,不同产地、不同品种金银花药材品质差异较大,因此如何保证金银花药材质量成为人们关注的问题。由于不同品种药材性状及原植物形态比较相似,因而亟需新的技术鉴别不同品种。目前,关于该项研究已有报道,如细胞学(包括核型和染色体多态性)和 RAPD、ISSR 等 DNA 分子标记方面的研究^[2-4]。近年来,DNA 条形码技术发展较快,可直接利用 DNA 序列进行物种的鉴定,具有过程简便、结果可靠性强等特点,为药用植物的鉴定提供了新的机遇^[5-7]。Chen 等首先运用内转录第 2 间隔区(internal transcribed space 2, *ITS2*)对被子植物、裸子植物等七大类群的 6 000 多份药用植物样本进行 DNA 条形码鉴定,其物种水平鉴定效率达 92.7%^[8]。而众多学者推荐的 *psbA-trnH* 序列在扩增成功率和物种识别率方面也有优良的表现^[9-11],尤其在有花植物中展现了较好的种间鉴别价值^[12],已被用于芍药属^[13]、薯蓣属^[14]等植物的种间鉴别研究,但未见关于金银花不同品种间鉴别的相关研究报道。因此,本试验研究上述 2 条 DNA 条形码在不同品种金银花中的差异,以期对不同金银花品种在分子水平上的鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

11 个金银花品种分别采自山东临沂、河南新密、河北巨鹿、陕西咸阳等地,经南京农业大学中药材研究所王康才教授

鉴定为忍冬科忍冬属忍冬(表 1)。试验材料种植于南京农业大学牌楼实验基地。

表 1 金银花品种采集地及 GenBank 登录号

编号	品种	采集地	GenBank 登录号	
1	四季花	山东临沂	JQ780993	HM228536
2	大毛花	山东临沂	JQ780989	HM228511
3	鸡爪花	山东临沂	JQ780990	HM228536
4	密银花	河南新密	JQ731173	HM228537
5	红银花	山东临沂	JQ780991	GU135313
6	九丰一号	山东临沂	JQ731715	HE966692
7	金花 3 号	陕西咸阳	—	HM228537
8	巨花 1 号	河北巨鹿	JQ780993	—
9	亚特	亚特生态公司	JQ780986	HM228537
10	亚特红	亚特生态公司	—	HM228511
11	亚特立本	亚特生态公司	—	HE966692

注:“—”表示测序未成功;下表同。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增、PCR 产物纯化及测序

选取新鲜的叶片 0.1 g,经液氮研磨后,使用植物 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取总 DNA,PCR 反应采用通用引物,反应体系及扩增程序均参照文献^[15],进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。随后用琼脂糖凝胶试剂盒(天根生化科技有限公司)对扩增目的片段进行回收,纯化后作为测序反应的模板,送至上海英骏(Invitrogen)生物技术公司进行双向测序,测序引物同 PCR 引物。

1.3 数据分析

ITS2 测序峰图利用 CodonCode Aligner V2.06 校对拼接,去除低质量序列及引物区。使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法^[16]用 CodonCode Aligner 去除两端的 5.8S 和 26S 获得间隔区序列。对 *psbA-trnH* 序列进行双向测序后利用 SeqMan 软件进行拼接,后利用 Clustal 进行多序列比对和查错,并辅以人工校对。应用 MEGA 4.0^[17]进行碱基组成、变异位点数、简约信息位点、转换和颠换数、转换和颠换比值 R、K-2-P 距离等分析,并构建系统聚类树。利用 BootStrap (1 000 次重复)检验各分支的支持率。

收稿日期:2013-02-09

基金项目:江苏省镇江市农业重点项目。

作者简介:崔志伟(1988—),男,山东东营人,硕士研究生,主要从事药用植物生理与栽培研究。E-mail:cuizhiwei1988@163.com。

通信作者:王康才。E-mail:wangkc@njau.edu.cn。

2 结果与分析

2.1 序列信息、PCR 扩增效率和测序成功率

ITS2 和 *psbA-trnH* 的扩增成功率均为 100%, 测序成功率分别为 72.7% 和 91%。不同品种金银花的条形码序列长度以及 GC 含量见表 2。由表 2 可以看出, *ITS2* 序列的长度较短, 为 225~229 bp, *psbA-trnH* 序列均为 339 bp。2 条序列的 GC 含量差别较大, 其中 *ITS2* 序列 GC 含量较高, 最高达 75.44%, 而 *psbA-trnH* 序列 GC 含量较低, 在 30% 左右。这说明 *ITS2* 序列比 *psbA-trnH* 序列发生变异的可能性小, 序列更稳定。

2.2 序列变异分析

应用 MEGA 4.0 对各序列进行对比, 发现不同品种之间的 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列存在较大的差异。由表 3 可以看出, *ITS2* 序列共有 9 个碱基位点发生了变异, 共发生 13 处碱基转换、3 处碱基缺失、1 处碱基插入, 并发生 1 处碱基颠换 ($R=13$), 简约信息位点数为 4 个, 序列之间的一致性达 98.64%。相比之下, *psbA-trnH* 序列发生的变异数较少, 共

表 2 不同条形码序列的序列特征

品种	<i>ITS2</i>		<i>psbA-trnH</i>	
	序列长度 (bp)	GC 含量 (%)	序列长度 (bp)	GC 含量 (%)
四季花	228	75.44	339	28.10
大毛花	228	75.00	339	29.79
鸡爪花	228	73.25	339	29.50
密银花	225	73.33	339	28.76
红银花	228	75.00	339	30.92
九丰一号	228	75.44	339	29.79
巨花一号	229	74.67	—	—
金花 3 号	—	—	339	29.50
亚特	228	75.00	339	29.50
亚特红	—	—	339	29.50
亚特立本	—	—	339	29.79

有 7 个碱基位点发生变异, 发生 6 处碱基转换, 无碱基缺失和插入, 并发生 4 次碱基颠换 ($R=1.5$), 简约信息位点数为 1 个, 序列一致性为 99.6%。

表 3 不同品种金银花的序列变异位点分布

品种	<i>ITS2</i>									<i>psbA-trnH</i>						
	19	21	27	47	61	69	178	188	205	44	280	305	309	320	323	330
四季花	G	·	C	G	C	C	C	G	C	T	T	T	T	T	A	G
大毛花	G	·	T	G	C	C	C	G	C	C	A	C	T	T	A	G
鸡爪花	A	·	T	G	C	T	T	A	C	T	A	C	T	T	A	G
密银花	A	·	T	G	·	T	T	·	·	T	A	C	T	T	A	G
红银花	G	·	T	G	C	C	C	G	C	C	A	C	C	G	C	C
九丰一号	G	·	C	G	C	C	C	G	C	C	A	C	T	T	A	G
巨花一号	G	G	C	T	C	C	T	G	C	—	—	—	—	—	—	—
金花 3 号	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	A	C	T	T	A	G
亚特	G	·	C	G	C	T	C	G	C	T	A	C	T	T	A	G
亚特红	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	A	C	T	T	A	G
亚特立本	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	A	C	T	T	A	G

注: “·”表示该位点无碱基序列。

2.3 遗传距离的计算及系统发育分析

应用 MEGA 4.0 进行分析, 以 Kimura-2 参数计算遗传距离, 结果见表 4。由表 4 可以看出, 四季花和红银花之间的 $K-2-P$ 遗传距离最大, 为 0.024; 而鸡爪花和密银花、金花 3 号、亚特、亚特红等品种的遗传距离均为 0, 表明鸡爪花与这几个品种属于近缘物种, 可能是由于栽培环境或者生长条件不一致, 造成外部形态和成分含量的差异, 也有可能是同一品种, 只是引种到不同的地区种植。本研究基于 *psbA-trnH* 序列, 运用邻接法 (NJ) 构建系统发育树, 由图 1 可以看出, 四季花和亚特聚为一支, 后与密银花聚为一支; 大毛花和红银花聚

为一支。从 NJ 树图可以看出, 不同品种的金银花均可以互相区分。

3 讨论

中药材的鉴定是中药生产、应用和研究至关重要的一步, 中药材物种、产地的不同可能会造成质量相差较大。因此, 中药材来源必须经严格鉴定, 中药的质量和疗效才能得到初步保证。传统的鉴定方法通常是以动植物的形态和显微特征等作为鉴定指标, 随着影响药材质量因素的多样化, 传统方法已不能满足实际需要。随着分子生物学技术的发展, 中药 DNA

表 4 *psbA-trnH* 序列的种间 $K-2-P$ 距离

品种编号	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11
1		0.006	0.005	0.005	0.008	0.006	0.005	0.005	0.005	0.006
2	0.012		0.003	0.003	0.006	0.000	0.003	0.003	0.003	0.000
3	0.009	0.003		0.000	0.007	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003
4	0.009	0.003	0.000		0.007	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003
5	0.024	0.012	0.015	0.015		0.006	0.007	0.007	0.007	0.006
6	0.012	0.000	0.003	0.003	0.012		0.003	0.003	0.003	0.000
7	0.009	0.003	0.000	0.000	0.015	0.003		0.000	0.000	0.003
9	0.009	0.003	0.000	0.000	0.015	0.003	0.000		0.000	0.003
10	0.009	0.003	0.000	0.000	0.015	0.003	0.000	0.000		0.003
11	0.012	0.000	0.003	0.003	0.012	0.000	0.003	0.003	0.003	

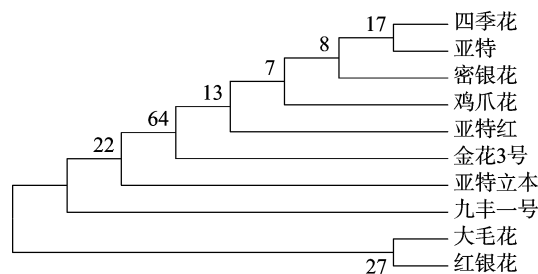


图1 基于 $psbA-trnH$ 序列构建的系统发育树
(支持率标注在分支上)

分子鉴定技术及基因芯片技术等被广泛应用于中药材鉴定^[18-19],如 RAPD(随机扩增多态性)、AFLP(随机扩增长度多态性)、SNP(核苷酸多态性)等。分子标记技术的发展固然为中药材的鉴定带来了一定的便利,但其本身存在许多缺陷,例如 RFLP 分析技术要求必须采用新鲜的植物材料,难以适合于干燥药材的鉴定,且该项技术操作复杂、耗时耗力、成本较高,普及应用的难度较大。

自从 DNA 条形码技术被提出以来,由于它具有操作简便、结果稳定等优势,因而被广泛应用于物种鉴定。理想的条形码应具有足够的种间差异,同时种内变异足够小,易于扩增,且引物通用性好,能够通过双向测序得到高质量的序列^[20]。目前,国际植物学界推荐的植物条形码序列主要是 $ITS2$ 、 $matK$ 、 $rbcl$ 、 $psbA-trnH$ 、 $rpoB$ 等,其中 $matK$ 的 PCR 扩增成功率较低,引物通用性较差,目前仍没有找到合适的通用引物,且 $matK$ 在忍冬科植物中几乎无法扩增成功; $rbcl$ 易于扩增,扩增和测序成功率都较高,但其差异主要存在于种以上的水平^[21],种内和种间的差异较为保守,更适合于物种科属级别的划分; $rpoB$ 因具有较大的种内变异也不利于分类和鉴定;而 $ITS2$ 和 $psbA-trnH$ 则显著弥补了上述片段的不足之处。本试验研究中发现, $ITS2$ 序列在鉴别金银花方面具有如下的优势:序列长度较短,易于扩增,引物通用性较好。 $ITS2$ 序列能与 5.8S 和 26S 形成特定的颈环二级结构,更加有利于 $ITS2$ 序列的处理和分析^[22-23]。刘震等发现 $ITS2$ 序列在鉴别忍冬属植物时无法将极为相近的灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬区分开来, $psbA-trnH$ 序列在忍冬属植物中有着很高的扩增效率和鉴定成功率,可以显著弥补 $ITS2$ 在鉴定忍冬属物种水平上的不足,起到相互辅助作用^[24]。

综上所述,本试验所采取的 2 个片段在鉴定水平上各有所长,既能准确的区分物种,又可以研究系统发生和亲缘关系的远近,具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 赵东岳,李勇,丁万隆. 我国金银花栽培品种的遗传多样性[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2011,13(4):650-653.
- [3] 董桂灵,胡尚钦,陈晓敏,等. 不同金银花种质资源 ISSR 遗传多样性研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2009,46(6):1834-1837.
- [4] 王文炳. 山东地道药材金银花三种品系的鉴别研究[D]. 济南:山东中医药大学,2010.
- [5] 陈念,赖小平. 药用植物 DNA 条形码物种鉴定技术[J]. 中药

材,2010,33(4):648-650.

- [6] 张璐,刘丽娟,陈随清,等. 叶绿体 DNA 序列分析在药用植物鉴定中的应用[J]. 河南中医学院学报,2008,7(4):94-96.
- [7] 陈士林,姚辉,宋经元,等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术:中药现代化,2007,9(3):7-12.
- [8] Chen S L, Yao H, Han J P et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One,2010,5(1):e8613.
- [9] Yao H, Song J Y, Ma X Y, et al. Identification of dendrobium species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast $psbA-trnH$ intergenic region[J]. Planta medica,2009,75(6):667-669.
- [10] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding $rbcl$ gene complements the non-coding $trnH-psbA$ spacer region[J]. PLoS One,2007,2(6):e508.
- [11] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well[J]. PLoS One,2008,3(7):e2802.
- [12] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2005,102(23):8369-8374.
- [13] Ding X Y, Xu L S, Wang Z T, et al. Allele-specific diagnostic PCR authentication of *D. devonianum* from other *Dendrobium* species[J]. Acta Pharm Sin,2002,37(11):897-901.
- [14] Crockett S L, Douglas A W, Scheffler B E, et al. Genetic profiling of *Hypericum* (St. John's Wort) species by nuclear ribosomal ITS sequence analysis[J]. Planta medica,2004,70(10):929-935.
- [15] Gao T, Yao H, Song J Y, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J]. Journal of Ethnopharmacology,2010,130(1):116-121.
- [16] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene,2009,430(1/2):50-57.
- [17] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[J]. Oxford, England: Bioinformatics,2001,17(12):1244-1245.
- [18] Sucher N J, Carles M C. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants[J]. Planta Medica,2008,74(6):603-623.
- [19] Yip P Y, Chau C F, Mak C Y, et al. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials[J]. Chinese Medicine,2007,2:9.
- [20] 朱英杰,陈士林,姚辉,等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学报,2010,45(3):376-382.
- [21] 宁淑萍,颜海飞,郝刚,等. 植物 DNA 条形码研究进展[J]. 生物多样性,2008,16(5):417-425.
- [22] Selig C, Wolf M, Müller T, et al. The ITS2 database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics[J]. Nucleic Acids Research,2008,36(Database issue):D377-D380.
- [23] Dassanayake R S, Gunawardene Y I, Silva B D. ITS-2 secondary structures and phylogeny of *Anopheles culicifacies* species[J]. Bioinformation,2008,2(10):456-460.
- [24] 刘震,陈科力,罗焜,等. 忍冬科药用植物 DNA 条形码通用序列的筛选[J]. 中国中药杂志,2010(19):2527-2532.