

黄思远,孙宁阳,石晏丞,等.藏药波棱瓜属药用植物 DNA 条形码鉴定[J].江苏农业科学,2019,47(11):66-70.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.013

藏药波棱瓜属药用植物 DNA 条形码鉴定

黄思远¹,孙宁阳¹,石晏丞¹,顾健¹,谭睿²

(1.西南民族大学,四川成都 610041;2.西南交通大学生命科学与工程学院,四川成都 610031)

摘要:为评价 DNA 条形码候选序列对藏药波棱瓜属植物的鉴定作用,探讨波棱瓜属植物鉴定新方法,本研究采用不同产地、不同海拔波棱瓜植物的 *ITS2*、*PsbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 通用引物对 110 份样品进行 DNA 提取、PCR 扩增和测序,比较 4 条 DNA 序列扩增效率和测序成功率;分析种内和种间变异;通过 Barcoding gap 分析,构建 NJ 系统进化树,评价各序列对西藏自治区、云南省、四川省不同海拔波棱瓜药材的辨别能力。研究结果表明,*ITS2* 序列在所研究的波棱瓜属药用植物中的扩增效率和测序成功率均为 100%,其种内种间变异、Barcoding gap 与其他 DNA 条形码候选序列相比具有明显的优势,以 *ITS2* 序列作为 DNA 条形码,可对波棱瓜进行准确、快速识别和鉴定,准确地弄清楚不同地区不同海拔所生长的波棱瓜之间的进化关系,为该药用植物的质量控制、安全用药及资源合理开发利用提供理论依据。

关键词:波棱瓜属;DNA 条形码;*ITS2*; *matK*; *rbcL*; *PsbA-trnH*

中图分类号:S567.21+9.01

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2019)11-0066-05

波棱瓜作为传统的藏药材,其用药部位为其干燥种子。它的药理作用在藏药学著作《月王药诊》中被著述,波棱瓜子味苦、性寒,可和纤毛婆婆纳、藏茵陈、止泻木按一定剂量进行配伍煎汤,藏医主要用其治疗赤巴炎症;此外波棱瓜子与玉石等配伍主要治疗各种肝病^[1]。波棱瓜子木脂素部位及其单体常用于治疗黄疸、肝炎、消化不良及肝胆疾病。相关文献报

道,波棱瓜子的药理作用主要有抗肝损伤^[2]、抗肝炎^[3]等。

DNA 条形码技术通过测定植物 DNA 序列进行比较来反映其遗传差异,通过建立生物 DNA 条形码系统能够实现快速、准确、自动化的物种鉴定^[4-5]。目前,研究者们已经测定了 10 多条植物候选 DNA 条形码序列^[6],并在不同的类群中对各条形码的鉴定能力进行了考察。*ITS2* 序列中含有丰富的变异位点和信息位点,并且该序列在植物中广泛存在,因此可以应用于物种的鉴定,对植物有较高的鉴别能力^[7-8]。可以通过 *ITS2* 序列来区分波棱瓜植物的产地,进行快速准确识别和鉴定,对研究波棱瓜的分布有指导作用,对其遗传育种研究、种质资源的生乳研究以及资源保护和全利用都具有重要的理论和实践价值。

本研究应用近年来提出的植物 DNA 条形码候选序列 *ITS2*、*PsbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 对波棱瓜属植物进行研究,考察

收稿日期:2018-03-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:81274168、81573563);四川省中医药管理局科研项目(编号:2016C062)。

作者简介:黄思远(1992—),女,内蒙古满洲里人,硕士研究生,研究方向为中药及民族药物开发与研究。E-mail:413183598@qq.com。

通信作者:顾健,博士,教授,博士生导师,研究方向为中药及民族药物创新研究与开发。E-mail:gujiancd@163.com。

[24]王梦亮,任晓琳,崔晋龙,等.野生红景天的 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析[J].中草药,2016,47(3):469-473.

[25]宋宪军,聂磊,张涛,等.柞蚕部分品种及杂交种的 RAPD 分析[J].蚕业科学,2004,30(4):428-431.

[26]赵非伙,焦成瑾,李志明,等. RAPD 法鉴定紫花苜蓿品种的条件优化[J].湖南农业科学,2016(1):1-5.

[27]曹兰娟,杨宝山,李俊,等.不同地区栗蚕(*Dictyoploca japonica*)的 RAPD 的分析[J].蚕业科学,2007,33(2):293-296.

[28]Wang X L, Wang X L, Chang C R. RAPD analysis of *Rosa laevigata* Michx. from different origins[J]. Agricultural Biotechnology, 2015, 4(5):33-36.

[29]王卓,曹兰娟,刘振林,等.不同地区及不同季节的柞蚕寄生蝇 RAPD 分析[J].蚕业科学,2008,34(2):354-358.

[30]王小武,付开,丁新华,等.基于 RAPD 标记的新疆荒漠稻区稻水象甲遗传多样性分析[J].新疆农业科学,2016,53(11):2069-2076.

[31]王凤成,刘丹梅,全振祥,等.用 RAPD 标记分析部分柞蚕二化虫品种资源的遗传多样性[J].蚕业科学,2009,35(1):148-153.

[32]郭晓丽,白丽荣.10 个小黑麦品种(系)的遗传多样性分析[J].河北农业科学,2016,45(2):26-28.

[33]程道军,鲁成,周泽扬,等.几种绢丝昆虫遗传多样性的 RAPD 研究[J].蚕业科学,2002,28(4):277-282.

[34]Gui M Y, Zuo Z H, Wang X M, et al. Application of RAPD technique in genetic relationship of silk insect. II. Genetic variance in *Antheraea pernyi*[J]. Heredity, 2001, 23(5):452-454.

[35]钟伯雄,张金卫,丁农,等. RAPD 技术在家蚕杂交率检验中的应用[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2003,29(3):321-324.

[36]Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89(3):583-590.

[37]陈莹玉,袁思思,吴春兰,等.广西金秀野生茶遗传多样性及分子指纹图谱研究[J].广东农业科学,2016,43(3):21-28.

[38]刘彦群,鲁成,向仲怀.中国柞蚕 DNA 多态性的 RAPD 分析[J].蚕业科学,2002,28(4):283-288.

[39]乔利 MS,林华生.柞蚕属种的分布与分化[J].国外农学-蚕业,1983(4):3-9.

不同 DNA 条形码候选序列在波棱瓜属药用植物鉴定中的能力,以期建立波棱瓜属药用植物数字鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

笔者所在课题组共收集 110 份波棱瓜属样本,具体样本见表 1。试验样本经西南民族大学药学院顾健教授鉴定为波棱瓜属[*Herpetospermum pedunculosum* (Ser.) C. B. Clarke]叶片和种子。其中叶片样本 100 份,都为硅胶干燥的叶片,10 份为成熟种子,采样时间为 2016 年 9 月。测序公司为生工生物工程(上海)股份有限公司。

表 1 波棱瓜收集样本信息

产地	海拔(m)
西藏白玉村	2 886
西藏棠木村	3 064
西藏麦差村	3 220
西藏帮肯村	3 043
泸定清风村	1 880
泸定下马厂村	2 067
泸定马厂梁村村组 1	2 202
泸定马厂梁村村组 2	2 260
迪庆尼史村村组 1	3 257
迪庆尼史村村组 2	3 380
荷花池购买的种子	不祥

注:各产地样本数量均为 10 份。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 提取、PCR 扩增及测序 取干燥药材 30 mg,加入液氮充分碾磨,使用植物 DNA 提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., China)提取总 DNA。*matK*、*rbcl*、*PsbA-trnH*、*ITS2* 的扩增引物见表 2;候选 DNA 条形码序列的 PCR 扩增体系见表 3。

表 2 候选 DNA 条形码引物

目标片段	引物	碱基序列(5'→3')
<i>PsbA-trnH</i>	<i>PsbAF</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
	<i>TrnH2</i>	CGCGCATGGTGGATTTCACAATCC
<i>ITS2</i>	<i>ITS2F</i>	ATGCGATACTTGTGTGAAT
	<i>ITS3R</i>	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
<i>matK</i>	3F_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTACGAG
	1R_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAATCTTTGGTTC
<i>rbcl</i>	<i>rbclLa_F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
	<i>rbclLa_R</i>	GTAAAAATCAAGTCCACCRGC

1.2.2 数据处理 试验主要应用的软件有 DANMAN、MEGA version 5.1 和 SPSS 16.0。运用 DANMAN 软件查看测序成功

表 3 *PsbA-trnH*、*ITS2*、*matK*、*rbcl* 序列 PCR 反应体系

序列	反应物	体积(μL)
<i>PsbA-trnH</i>	样品 DNA	3.0
	Primer 1	1.0
	Primer 2	1.0
	2 × <i>Taq</i> PCR Master Mix	12.5
	ddH ₂ O	7.5
	总体积	25.0
<i>ITS2</i>	样品 DNA	1.5
	Primer1	1.0
	Primer2	1.0
	2 × <i>Taq</i> PCR Master Mix	12.5
	ddH ₂ O	9.0
	总体积	25.0
<i>matK</i>	样品 DNA	1.0
	Primer1	1.0
	Primer2	1.0
	2 × <i>Taq</i> PCR Master Mix	6.5
	ddH ₂ O	15.5
	总体积	25.0
<i>rbcl</i>	样品 DNA	1.0
	Primer1	1.0
	Primer2	1.0
	2 × <i>Taq</i> PCR Master Mix	7.5
	ddH ₂ O	14.5
	总体积	25.0

的序列,并将序列录入到 MEGA version 5.1 软件中,进行序列之间遗传距离的分析进而构建系统进化树,分析保存序列的变异位点、序列的遗传距离;运用 SPSS 16.0 进行 Wilcoxon 秩和检验分析,比较各个序列的变异程度;通过 Barcoding gap,查看序列的种内、种间差异情况,观察是否出现显著 gap,进一步挑选合适的 DNA 条形码片段;运用 MEGA version 5.1 软件中的邻接法(NJ),分析不同序列物种识别和鉴定能力。根据系统进化树计算 K2P 距离,设 100 次重复检验。

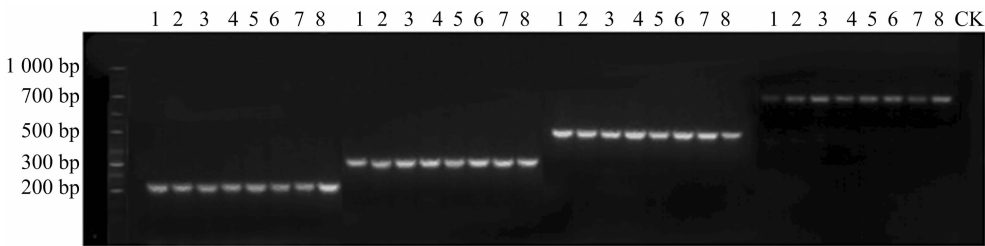
2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

阴性对照(CK)采用加入和模板等量 ddH₂O 后扩增的 PCR 产物,从图 1 可以看出,CK 组无条带,说明样品 PCR 扩增成功,不存在真菌污染,4 条序列样本电泳条带均明亮,满足试验要求。

2.2 PCR 扩增率和测序成功率

对样本的 *ITS2*、*matK*、*PsbA-trnH*、*rbcl* 等 4 条候选序列进行 PCR 扩增效率(出现明显条带)和测序成功率(测序获



从左到右分别为 *ITS2*、*matK*、*PsbA-trnH*、*rbcl* 序列,1~8 为各个序列对应的 8 个重复

图1 *ITS2*、*matK*、*PsbA-trnH* 和 *rbcl* 序列部分 PCR 扩增电泳

得高质量序列)统计,结果(图 2)显示,*ITS2*、*matK* 序列为 100.0%,*PsbA-trnH* 序列扩增效率为 91.0%,*rbcL* 序列扩增效率为 85.0%;*ITS2* 测序成功率为 100.0%,*matK* 测序成功率为 88.9%,*PsbA-trnH*、*rbcL* 测序成功率都为 97.8%。

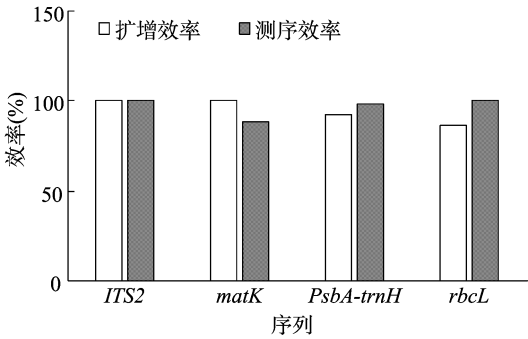


图2 4 条序列扩增效率和测序效率

2.3 候选 DNA 条形码序列特征

本研究对不同产地不同海拔波棱瓜样品的 4 个 DNA 片段 *ITS2*、*matK*、*PsbA-trnH*、*rbcL* 进行测序。测序所得的序列用 DANMAN 软件进行排列剪切,然后用 MEGA 5.1 软件统计序列的变异位点、保守位点、序列长度、GC 含量等基本信息。

表 5 种内和种间距离

项目	<i>PsbA-trnH</i>	<i>ITS2</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
种间变异平均值	0.041 ± 0.010	0.094 ± 0.070	0.015 ± 0.009	0.020 ± 0.009
种内变异平均值	0.038 ± 0.030	0.025 ± 0.004	0	0.010 ± 0.009
种间最小变异平均值	0.019 ± 0.024	0.020 ± 0.009	0.011 ± 0.015	0
平均联合深度	0.020 ± 0.030	0.042 ± 0.050	0	0.01 ± 0.090

2.5 候选 DNA 条形码 Wilcoxon 秩和检验

候选 DNA 条形码两两序列相关程度,一般通过 Wilcoxon 秩和来检验。此方法可以更加准确地反映出两两序列样本的

从表 4 可以看出,在 4 个基因片段中,*ITS2* 有 54 个变异位点,并且变异程度最高,为 22.7%;*rbcL* 变异程度最小,为 0.4%;变异程度表现为 *ITS2* > *PsbA-trnH* > *matK* > *rbcL*。因此选择基于 *ITS2* 基因对波棱瓜不同产地及海拔样品进行比对。序列 *matK* 的扩增片段最长,而 *ITS2* 最短。

表 4 候选条形码序列特征

序列	序列长度 (bp)	保守位点 数(个)	变异位点 数(%)	变异率 (%)	G + C 含量 (%)
<i>PsbA-trnH</i>	520	486	34	6.5	31
<i>ITS2</i>	238	184	54	22.6	43
<i>matK</i>	825	806	19	2.3	32
<i>rbcL</i>	545	543	2	0.4	57

2.4 种内种间的变异分析

从表 5 可以看出,4 种序列种间变异平均值由大到小的顺序为 *ITS2* > *PsbA-trnH* > *rbcL* > *matK*;种间最小变异的顺序为 *ITS2* > *PsbA-trnH* > *matK* > *rbcL*;种内变异平均值顺序为 *ITS2* > *PsbA-trnH* > *rbcL* > *matK*。通过对波棱瓜属各条形码候选序列的种间变异、种内变异、种间最小变异分析发现,*ITS2* 序列满足种间变异应当大于种内变异,并且种间最小变异应当小于种内变异这一条件。

差异程度。从表 6 可以看出,*ITS2* 序列与其他 3 条序列具有显著差异。通过检验发现,*ITS2* 序列种间的变异情况较其他序列快。

表 6 不同序列种间秩和检验结果

W +	W -	相关性序列,样本数,P 值	结果
<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	W + = 13, W - = 0, n = 6, P ≤ 0.001	<i>matK</i> > <i>rbcL</i>
<i>PsbA-trnH</i>	<i>matK</i>	W + = 0, W - = 11, n = 6, P ≤ 0.001	<i>PsbA-trnH</i> > <i>matK</i>
<i>ITS2</i>	<i>matK</i>	W + = 0, W - = 17, n = 6, P ≤ 0.001	<i>ITS2</i> >> <i>matK</i>
<i>rbcL</i>	<i>PsbA-trnH</i>	W + = 21, W - = 0, n = 7, P ≤ 0.01	<i>PsbA-trnH</i> > <i>rbcL</i>
<i>rbcL</i>	<i>ITS2</i>	W + = 28, W - = 1, n = 6, P ≤ 0.01	<i>ITS2</i> >> <i>rbcL</i>
<i>PsbA-trnH</i>	<i>ITS2</i>	W + = 45, W - = 0, n = 9, P ≤ 0.01	<i>ITS2</i> > <i>PsbA-trnH</i>

注:W +、W - 分别表示正秩序、负秩序,可通过 SPSS 求得。

2.6 DNA 条形码 Barcoding gap 检验

理想的条形码种间遗传变异应明显大于种内遗传变异,并在二者之间存在显著差异,形成一个明显的间隔区,即 Barcoding gap。从图 3 可以看出,*rbcL* 序列的种内遗传变异值和种间遗传变异值主要集中在 0 ~ 0.001 区域,*matK* 序列的种内遗传变异值和种间遗传变异值集中在 0.002 ~ 0.003 区域,重叠部分多,无明显 gap;*PsbA-trnH* 的种内遗传变异值小,均集中在 0 ~ 0.001 区域,种间遗传变异值在 0 ~ 0.001、0.002 ~ 0.003 区域均有分布,种内种间遗传变异重叠部分少,gap 不明显。*ITS2* 种内遗传变异值在 0 ~ 0.004 区域均有分布,种间遗传变异值分布范围广。*ITS2* 的种内种间遗传变异所形成的 bar coding gap 明显,但重区域较小,有利于区分物种。

2.7 *ITS2*、*PsbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 序列 NJ 系统进化树鉴定结果

根据各序列对所有样本构建 NJ 系统进行树(图 4、图 5、图 6、图 7)。从 NJ 进化树可以看出,*PsbA-trnH* 序列构建的系统进化树中的样本有明显的种内差异,没有明显的种间变异,不能鉴别出不同海拔样品。*matK* 序列和 *rbcL* 序列构建的进化树可将不同产地不同海拔的样本聚类成一大类,种间距离很小,无法区分,鉴别效果不理想。*ITS2* 序列构建的进化树可以很好地区别出云南波棱瓜,同时四川省和西藏自治区样品聚类为一类,与参照序列聚类距离远,有明显的种间距离。

3 讨论

波棱瓜为来源于葫芦科波棱瓜属的植物,以种子入药,是

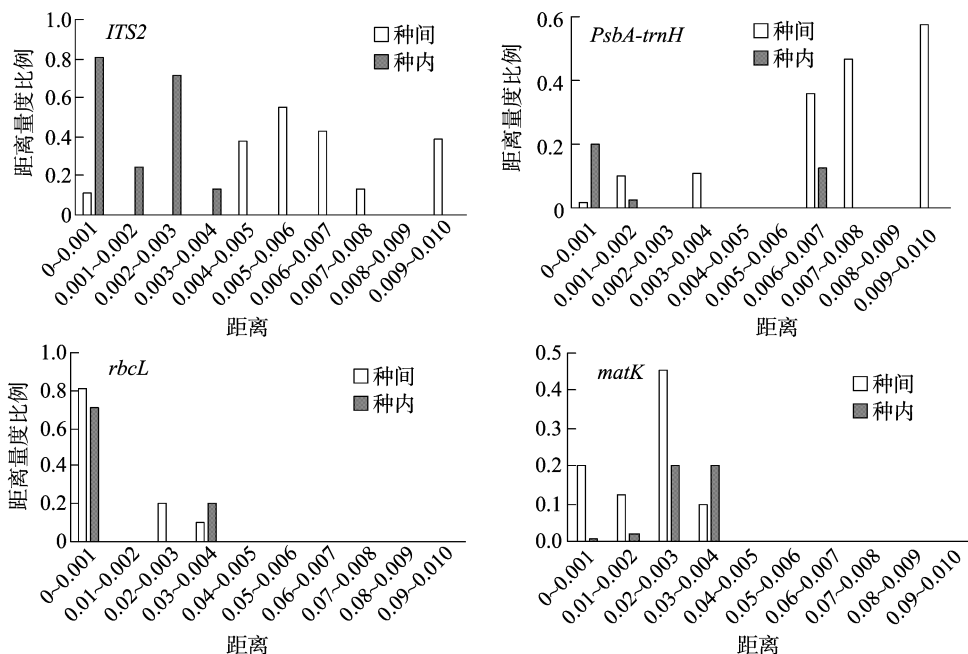
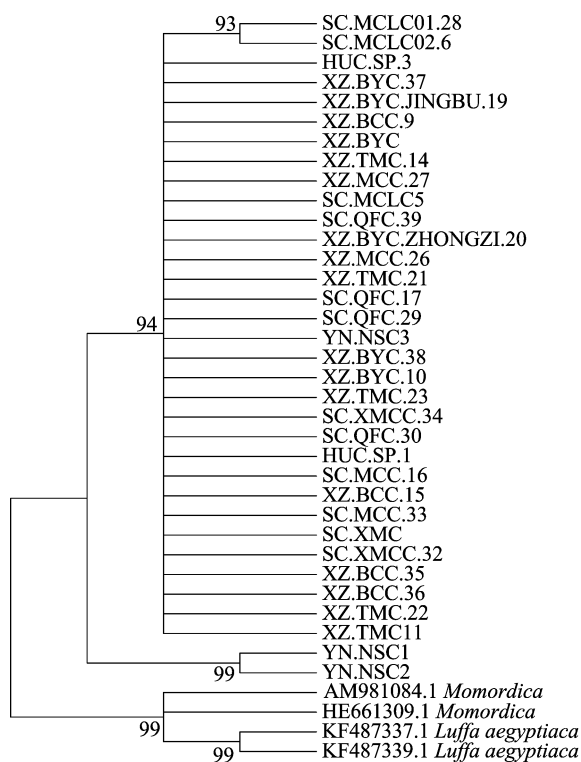


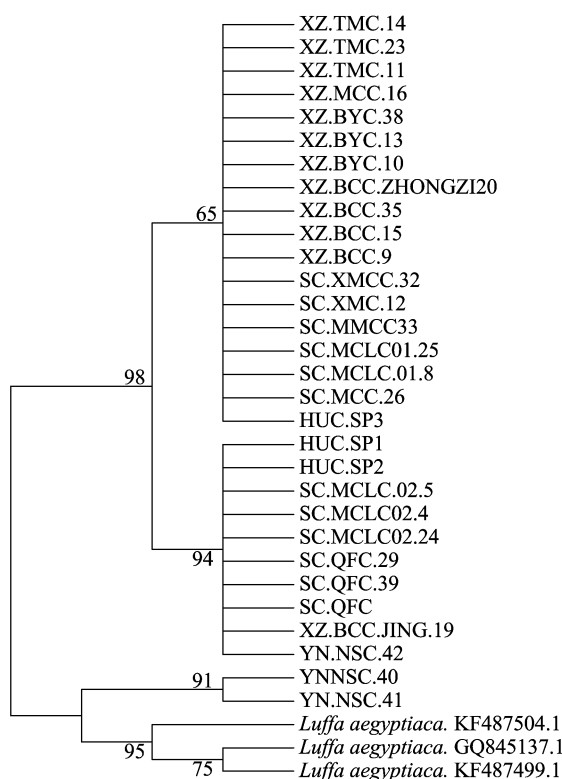
图3 4 条序列片段的种内和种间 Barcoding gap



图中 SC、XZ、YN 表示样品采集地，分别为四川省、西藏自治区、云南省。下同

图4 波棱瓜属 *ITS2* 序列NJ系统进化树(1 000次重复分析)

临床常用藏药。波棱瓜属植物主要分布于青藏高原地区,在我国主要分布在西藏自治区、四川省、云南省,在国外印度、尼泊尔也有分布。波棱瓜普遍生长在路边、林缘及山坡低矮灌木丛中,海拔为 2 300 ~ 3 500 m^[9-10]。波棱瓜药用历史悠久,但存在称谓混乱导致用药混乱的现象,因此对波棱瓜属植物进行准确识别和鉴定,对该药材的安全使用和波棱瓜资源的合理开发及保护都十分重要。

图5 波棱瓜属 *PsbA-trnH* 序列NJ系统进化树(1 000次重复分析)

本研究通过对不同产地不同海拔采集的波棱瓜植物样本进行 PCR 扩增、测序可知,*ITS2* 序列长度约为 238 bp,扩增成功率和测序成功率都为 100%,有 54 个变异位点,变异率为 22.7%,DNA 条形码变异率较高,种间种内差异明显,种间最小变异小于平均溯祖度。Wilcoxon 秩和检验的结果是 *ITS2* 变异检验值大于其他 3 个序列。从 Barcoding gap 图中能够看出,*ITS2* 种间遗传变异分布范围广,与种内遗传变异值的重叠区域较小,有利于区分物种。

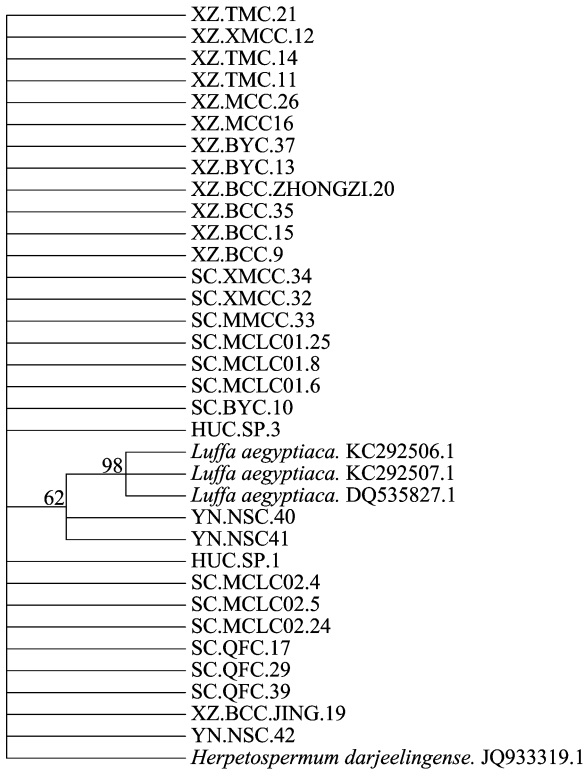


图6 波棱瓜属 *rbcL* 序列 NJ 系统进化树(1 000 次重复分析)

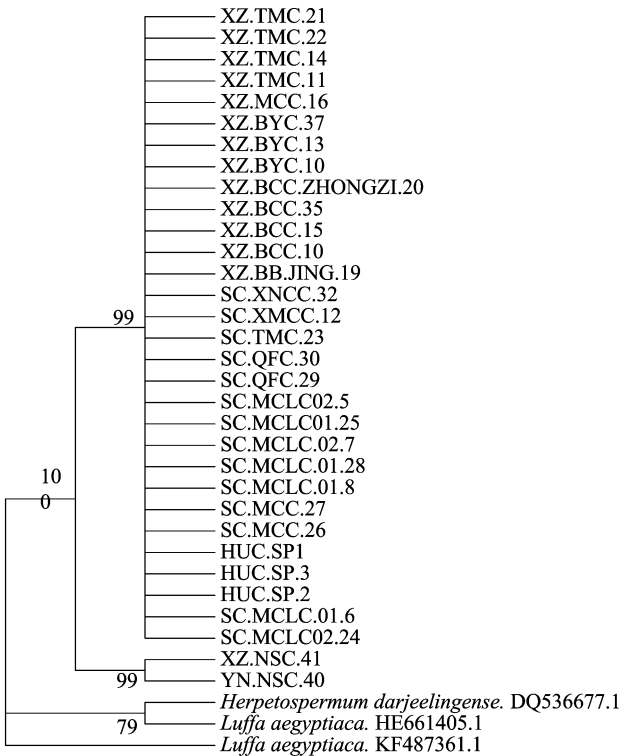


图7 波棱瓜属 *matK* 序列 NJ 系统进化树(1 000 次重复分析)

PsbA-trnH 间隔区在被子植物中具有高度变异性,其两端具有 75 bp 的保守区序列,便于设计通用引物^[6,11],在波棱瓜属中的扩增效率为 91%,从 Barcoding gap 图中可以看出,*PsbA-trnH* 序列的种内和种间遗传变异值的集中区域虽然没

有重叠,但 gap 不明显,所以 *PsbA-trnH* 序列不适合单独作为波棱瓜属植物的 DNA 条形码。*matK* 序列是植物叶绿体 DNA 中进化较快的一条编码区序列,也是多位研究者推荐的条形码序列之一^[6,12-15]。本试验中,*matK* 序列在波棱瓜属植物中扩增效率虽然高,但是测序成功率仅为 88.9%,低于其他 3 条序列,且种内种间重叠部分多,无明显 gap,因此 *matK* 不适合作为条形码对波棱瓜属植物进行鉴定。*rbcL* 序列的种间和种内遗传变异值分布区域接近且无明显 gap,因而判定 *rbcL* 也不适合作为波棱瓜属植物的 DNA 条形码序列。从 NJ 系统进化树图中能够看出,除 *ITS2* 序列构建的系统进化树以外,其他 3 条均不适合独自作为波棱瓜属的条形码来区分不同产地的波棱瓜。

参考文献:

- [1] 马哈也那,马世林,王振华,等. 月王药诊[M]. 兰州:甘肃民族出版社,1993.
- [2] 顾健,李佳川,樊利娜. 藏药波棱瓜子总木脂素对刀豆球蛋白(ConA)致免疫性肝损伤小鼠保护作用及其机制探讨[J]. 西南民族大学学报(自然科学版),2014,40(3):375-387,481.
- [3] 丛龙波,王琪,李仙义,等. 藏药波棱瓜子抗肝炎药效物质基础研究[J]. 医学研究杂志,2007,3(8):75-76.
- [4] Bhargava M, Sharma A. DNA barcoding in plants: evolution and applications of in silico approaches and resources[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2013,67(3):631-641.
- [5] 任瑶瑶,江南屏,刘睿颖,等. 应用 ITS2 序列鉴定四川车前、平车前、大车前[J]. 江苏中医药,2017,49(5):57-60.
- [6] 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.
- [7] Yao H, Song J, Liu C, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals[J]. PLoS One, 2010, 5(10):e13102.
- [8] 豆荣昆,毕振飞,白瑞雪,等. 黄花紫堇、多刺绿绒蒿及其同属近缘物种的 ITS2 条形码鉴定与分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(8):1453-1458.
- [9] 卢杰,兰小中,罗建. 林芝地区珍稀濒危藏药植物资源调查与评价[J]. 资源科学,2011,33(12):2362-2369.
- [10] 关法春,王超,权红,等. 西藏野生波棱瓜资源的调查和分类[J]. 西南农业学报,2011,24(2):832-834.
- [11] 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.
- [12] 魏星任,叶清莲,马新业,等. 凉粉草 DNA 条形码通用序列的筛选及其混伪品分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):32-35.
- [13] 刘政洋,刘博. 基于 ITS + matK 序列探讨部分藤黄属植物的种间亲缘关系[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):39-42.
- [14] Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. Taxon,2007,56(2):295-299.
- [15] Lahaye R, Van Der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(8):2923-2928.