

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.09.001

基于 ITS2 序列片段的药用植物栝楼 及混淆品分子鉴定研究^①

吕泽芳¹, 于 杰^{1,2}

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400716

摘要: 应用 ITS2 条形码序列片段对我国市场药用植物栝楼与其混淆品共 8 份材料进行分子鉴定, 对所有材料根部进行 DNA 提取纯化、PCR 扩增并双向测序得到 ITS2 序列, 将所得 8 条序列与 Genbank 中 7 条序列用 Clustal X 软件进行比对, BioEdit 软件人工校正; 利用 MEGA5.0 软件计算种内、种间遗传距离, 并采用 K2P 距离法构建 NJ 和 ML 树, 评价序列的鉴定效果. 中药材植物各物种内遗传距离变异区间为 0~0.077 9, 平均为 0.019, 物种间遗传距离变异区间为 0.004~0.594, 平均 0.436, 种间距离明显大于种内距离; 构建药用植物栝楼各物种 NJ 和 ML 系统进化树, 二者结果一致, 各物种均聚为一支, 形成单系类群, 支持率均在 50% 以上. ITS2 条形码序列能够快速准确地从种的水平鉴定药用植物栝楼真伪.

关键词: 栝楼; 混淆品; ITS2 序列片段; 分子鉴定

中图分类号: S567

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)09-0001-06

栝楼 *Trichosanthes kirilowii* 隶属于葫芦科 Cucurbitaceae 栝楼属 *Trichosanthes* L. 植物, 是市场上常见中药材, 具有广泛的药理作用. 2010 年《中国药典》中记载, 栝楼属植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* 或中华栝楼 *Trichosanthes rosthornii* 干燥成熟果实的种子、果皮和根均可入药, 具有润肺化痰、滑肠通便、清热化痰、利气宽胸、消肿排脓等功效^[1]. 此外, 天花粉蛋白(Trichosanthin, 即 TCS)是从其块根中提取的一种核糖体失活蛋白, 被用于引产, 治疗葡萄胎、恶性葡萄胎、宫外孕及抗肿瘤等方面. 栝楼除传统药用价值外, 近年来又发现了新的药用、保健和食用价值^[2]. 但是, 目前市场上栝楼的混淆品种类众多, 常见的混淆品有旋花科植物番薯 *Ipomoea batatas*; 萝藦科植物隔山消 *Cynanchum wilfordii*、飞来鹤 *Cynanchum auriculatum*; 毛茛科植物猫爪草 *Ranunculus ternatus*; 葫芦科植物湖北栝楼 *Trichosanthes hupehensis*、川贵栝楼 *Trichosanthes crenulata*、罗汉果 *Siraitia grosvenorii*、木鳖子 *Momordica cochinchinensis* 等. 因此, 对药用植物栝楼的基源鉴定是用药安全的重要保证.

传统栝楼真伪鉴别常依赖于形态学鉴定, 对鉴定材料、鉴定人员都有严格要求. 黄璐琦等^[3]采用形态学方法, 借助花粉粒类型、种皮类型的划分对栝楼植物进行鉴定, 但因鉴定的性状较少, 即使同一器官因受环境、部位等影响也不尽相同, 仅依据植物形态的差异进行划分容易引起争议^[2]; 季龙宝等^[4]根据断面

① 收稿日期: 2016-06-14

基金项目: 国家自然科学基金(31171930); 中央高校基本科研业务费资金项目(XDJK2016D037).

作者简介: 吕泽芳(1992-), 女, 山西大同人, 硕士研究生, 主要从事园艺植物资源与应用研究.

质地、味、根横切面、粉末等特征对天花粉与伪品湖北栝楼进行鉴定；巢志茂等^[5-6]对栝楼干燥成熟果实的甲醇渗漉物进行化学成分研究，得出半乳糖酸 γ -内脂和半乳糖为该属植物特征化学成分，可用于该属植物鉴定；黄婷霞等^[7]采用蛋白电泳的方法对栝楼属种子类药材进行鉴别，取得了良好的鉴定效果；黄璐琦等^[8]、宁志怨等^[9]利用分子标记 RAPD 方法对栝楼植物进行鉴定，并对栝楼属植物种质资源亲缘关系进行分析，将分子生物学方法运用于栝楼属植物鉴定中，但最新分子生物学技术 DNA 条形码未见在药用植物栝楼及其伪品鉴定中应用。本研究以现有栝楼植物形态鉴定为基础，利用 DNA 条形码技术及分子系统学的方法对栝楼及其混淆品植物根部药材进行分子鉴定，建立栝楼中药材基原植物栝楼的“分子身份证”，提供药用植物栝楼正品与混淆品的分子鉴定依据，进而为其他药用植物分子鉴定提供方法借鉴。此研究对丰富药用植物栝楼的鉴定方法、特有资源的保护和利用具有重要的理论和实践价值。

1 材料与方法

1.1 材 料

8 份中药材植物成熟根部材料中栝楼、罗汉果、隔山消、飞来鹤、猫爪草和番薯于 2015 年购于重庆市中药材批发市场，湖北栝楼和川贵栝楼分别购于湖北和贵州中药材市场；其余 7 种选用 Genbank 数据库已公布的 ITS2 序列。各中药材植物材料 ITS2 序列信息见表 1。

表 1 药用植物栝楼及混淆品的 ITS2 序列信息

来源	拉丁学名	种名	GenBank 号	编号	长度/bp	C+G 百分比/%
GenBank	<i>Trichosanthes crenulata</i>	川贵栝楼	GU059529.1	1	383	68.9
	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	栝楼	KC733407.1	2	299	68.2
	<i>Siraitia grosvenorii</i>	罗汉果	JN407453.1	3	228	66.2
	<i>Cynanchum wilfordii</i>	隔山消	AB109974.1	4	235	65.1
	<i>Cynanchum auriculatum</i>	飞来鹤	KM279350.1	5	248	65.1
	<i>Ranunculus fuegianus</i>	猫爪草	FJ605809.1	6	329	61.1
	<i>Ipomoea batatas</i>	番薯	KC621813.1	7	220	70.7
重庆市中药材市场	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	栝楼		8	235	68.9
贵州中药材市场	<i>Trichosanthes crenulata</i>	川贵栝楼		9	236	70.9
湖北中药材市场	<i>Trichosanthes hupehensis</i>	湖北栝楼		10	230	72.3
重庆市中药材市场	<i>Siraitia grosvenorii</i>	罗汉果		11	233	66.4
	<i>Cynanchum wilfordii</i>	隔山消		12	236	65.1
	<i>Cynanchum auriculatum</i>	飞来鹤		13	235	65.1
	<i>Ranunculus fuegianus</i>	猫爪草		14	238	61.0
	<i>Ipomoea batatas</i>	番薯		15	229	71.0

1.2 方 法

中药材根部经变色硅胶干燥后，称取 200 mg 左右，加入少量非溶性聚乙烯吡咯烷酮 PVP，在液氮条件下迅速研磨。研磨后的样品使用 CTAB 法提取基因组总 DNA，采用 1% 琼脂糖凝胶电泳法检测其提取质量。

采用 PTC-100 PCR 仪对基因组 DNA 进行聚合酶链式反应(PCR)，反应体系及扩增条件参照文献[10]，即反应体系为 dNTP Mixture(2.5mM)2 μ L、PCR buffer(10 $\times$)2.5 μ L、正反向引物(2.5 μ M)各 1.0 μ L、Taq DNA 聚合酶 1 μ L、总 DNA 约 1 μ L(30~50 ng)，其余用 ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 扩增引物

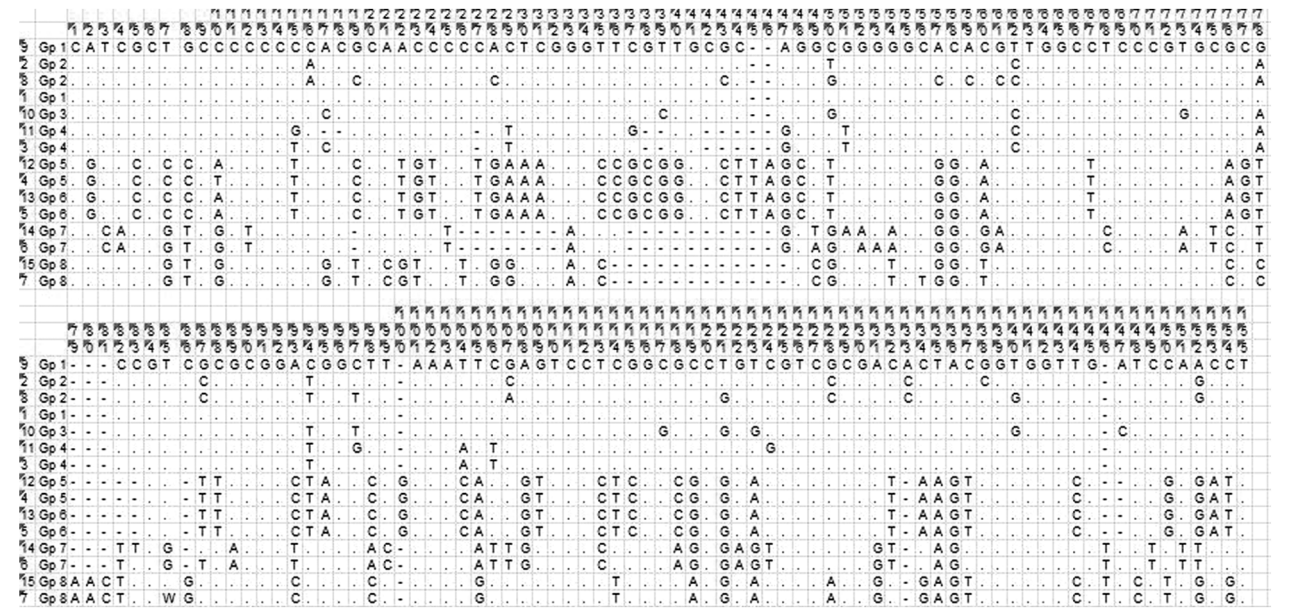
ITS2, 正向序列 ATGCGATACTTGGTGTGAAT, 反向序列 GACGCTTCTCCAGACTACAAT. 扩增程序如下: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 退火温度 55 ℃ 持续 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 34 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 7 min; 12 ℃ 保温 10 min. 用 1% 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增情况, 得到的 PCR 产物送北京华大科技有限责任公司进行序列纯化及测定. 为保证测序的准确性, 采用正、反双向测序.

实验所得序列与 GenBank 数据库下载序列利用软件 Clustal X 对齐, BioEdit 辅以人工校正, 去除引物区及测序质量较差的区域, 得到供分析的 ITS2 序列; 利用 MEGA5.05 软件分析各中药材植物序列间的变异频率, 计算各物种种内、种间距离; 采用 K2P 距离法构建 NJ (Neighbor-Joining) 树和 ML (Maximum Likelihood) 距离树, 利用 Bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率.

2 结果与分析

2.1 药用植物栝楼及混淆品的序列比对信息分析

药用植物栝楼及混淆品的 ITS2 序列经 ClustalX 软件比对后总长度为 155 bp, 其中保守位点为 53 bp, 变异位点为 102 bp, 信息位点为 95 bp, 蛋白位点为 7 bp; 碱基转换率为 21%, 颠换率为 21% (图 1).



左侧 1—15 表示序列编号; 上方数字表示序列长度; 图 1 中“.”表示碱基保守位点, A,T,C,G 表示变异位点的碱基.

图 1 药用栝楼及混淆品植物种内和种间序列比对

2.2 种内和种间差异分析

通过软件 MEGA5.0 对药用植物栝楼及混淆品植物各物种内遗传距离和种间遗传距离进行计算, 种内遗传距离变异范围为 0~0.077 9, 平均变异值为 0.019; 种间遗传距离变异范围为 0.004~0.594, 平均变异值为 0.436. 种间变异显著大于种内变异, 符合条形码鉴定物种种间变异大于种内变异的要求.

2.3 物种聚类分析

利用软件 MEGA5.0 的 K-2P 距离法对所有序列构建 NJ 树 (图 2) 和 ML 树 (图 3), 用 1 000 次重复的自展检测评估拓扑结构的可靠性.

由 NJ 树 (图 2) 可知, 药用植物各物种自上而下依次为川贵栝楼 *Trichosanthes crenulata*、罗汉果 *Siraitia grosvenorii*、湖北栝楼 *Trichosanthes hupehensis*、栝楼 *Trichosanthes kirilowii*、猫爪草 *Ranunculus fuegianus*、隔山消 *Cynanchum wilfordii*、飞来鹤 *Cynanchum auriculatum* 和番薯 *Ipomoea batatas*. 川贵栝楼 2 条序列 1 与 9 聚为一支, 支持率为 73%; 罗汉果 2 条序列 3,11 聚为一支, 支持率为 98%; 栝楼 2 条

序列 2,8 聚为一支,支持率为 65%;湖北栝楼序列 10 与栝楼序列 2,8 聚为一支,支持率为 66%;猫爪草 2 条序列 6,14 聚为一支,支持率为 100%;隔山消 2 条序列 4,12 与飞来鹤 2 条序列 5,13 聚为一支,支持率为 100%,其中序列 5,12,13 聚为一支的支持率为 68%;番薯 2 条序列 7,15 聚为一支,支持率为 100%;番薯、隔山消、飞来鹤所有序列聚为一支,支持率为 80%.

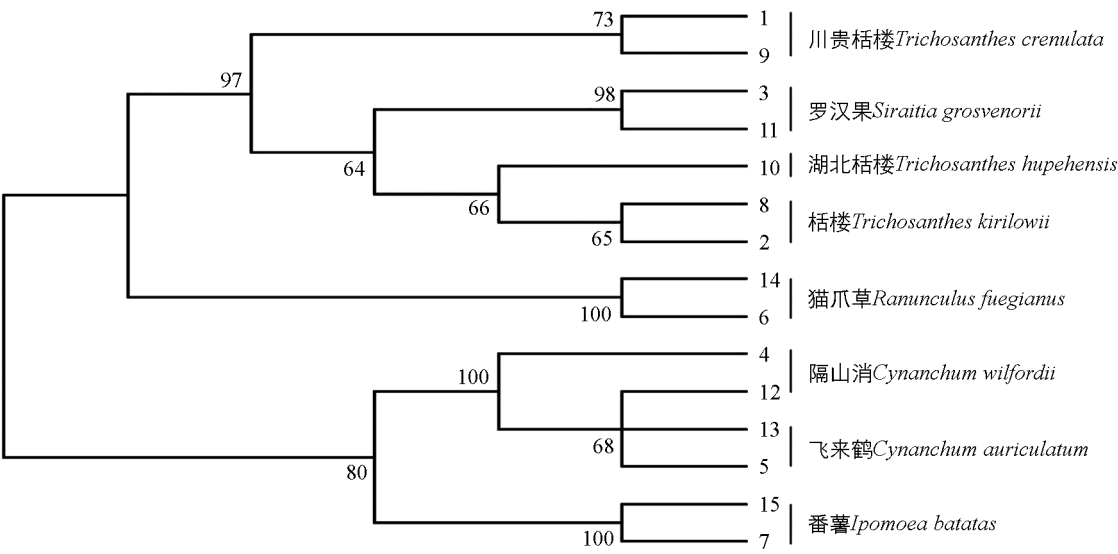


图 2 基于 ITS2 序列构建的药用植物栝楼及混淆品的 NJ 树

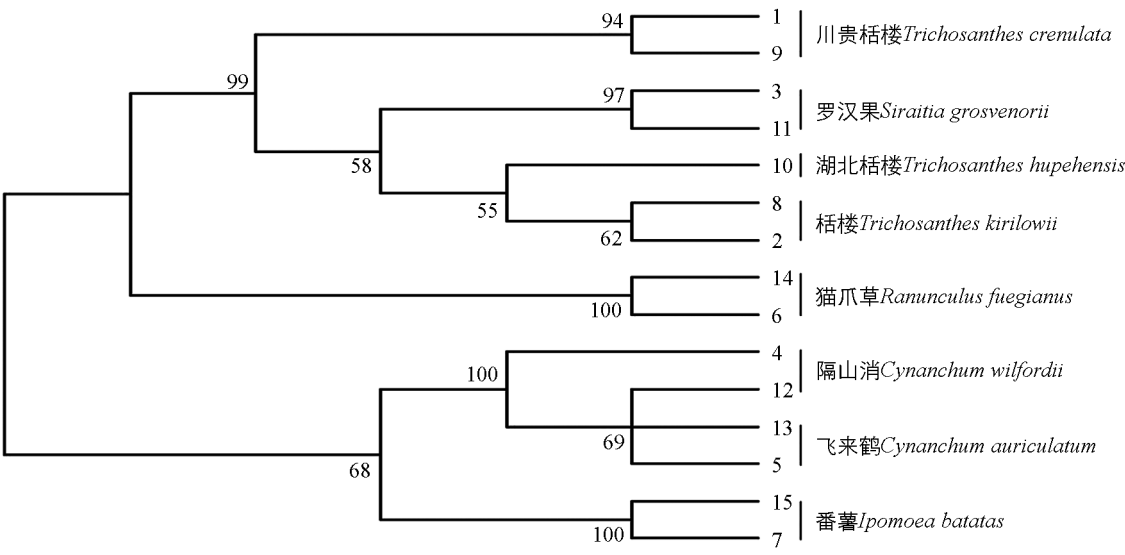


图 3 基于 ITS2 序列构建的药用植物栝楼及混淆品的 ML 树

ML 树(图 3)的聚类形态与 NJ 树一致,但是各分支的 Bootstrap 支持率稍有差异. 川贵栝楼 2 条序列聚为一支的支持率在 NJ 中为 73%,在 ML 树中为 94%;罗汉果序列在 NJ 中支持率为 98%,而在 ML 中为 97%,略有差异;栝楼 2 条序列在 NJ 中支持率为 65%,湖北栝楼与栝楼序列聚为一支的支持率为 66%,而在 ML 中,栝楼序列的支持率为 62%,湖北栝楼与栝楼聚为一支的支持率为 55%;番薯、隔山消和飞来鹤所有物种聚为一支的支持率在 NJ 中为 80%,高于 ML 树的支持率 68%.

从 NJ 和 ML 2 个系统进化树对比可以看出,药用植物栝楼及混淆品各物种形成单系类群,而且 2 个系统发育树的 Bootstrap 支持率差异较小,满足 DNA 条形码鉴别要求,具有较好的鉴定效果.

3 讨论与结论

随着分子生物学特别是 DNA 测序技术的快速发展,基于 DNA 条形码技术进行物种鉴别已成为植物分类学、系统与进化生物学、植物资源学等学科最活跃的研究领域和新的发展方向^[11-12]. DNA 条形码(DNA barcode)是一种基于 DNA 分子进化原理,利用短的 DNA 片段和现代分子系统学的原理和方法对“传统物种”在分子水平进行身份鉴定的最新物种生物学技术^[13-14]. DNA 条形码技术与传统的物种鉴定方法相比,具有准确性高(DNA 序列信息可以避免形态变异或趋同导致的物种鉴定误差)、效率高(通过建立数据库,可一次性快速鉴定大量标本)、不受被鉴定对象的环境和个体发育及鉴定专家个人因素影响(物种的身份是通过实验技术来鉴定的,不受专家个人因素的影响)等优点^[15]. DNA 条形码技术自 2003 年诞生以来,已在动、植物物种鉴定中得到了广泛应用^[16-17],并在动物的物种鉴定与分类中取得了很大成功.

本研究运用 ITS2 条形码序列对常见药用植物栝楼及混淆品进行 DNA 条形码鉴定,K-2P 距离图表明栝楼及混淆品各物种间有较大的种间差异,而各物种种内变异较小,满足种间大于种内变异的要求;在 NJ 和 ML 系统树中栝楼 *Trichosanthes kirilowii* 与其混淆品罗汉果 *Siraitia grosvenorii*、湖北栝楼 *Trichosanthes hupehensis*、川贵栝楼 *Trichosanthes crenulata*、猫爪草 *Ranunculus fuegianus*、番薯 *Ipomoea batatas*、隔山消 *Cynanchum wilfordii* 和飞来鹤 *Cynanchum auriculatum* 各物种形成单系类群.因此,ITS2 序列能将药用植物栝楼及混淆品有效地分开,达到预期鉴定效果,对今后深入研究药用植物的遗传多样性产生和分化、生态环境的适应性及杂交育种中的作用也具有重要的理论指导意义.

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] 宋振巧,王洪刚,王建华. 栝楼的研究进展 [J]. 山东农业科学,2005(5): 72—75.
- [3] 黄璐琦,乐崇熙,杨 滨,等. 栝楼属(*Trichosanthes* L.)的系统学研究 [J]. 江西中医学院学报,1999,11(2): 75—78.
- [4] 季龙宝,袁 瑶. 天花粉及其伪品的鉴别 [J]. 基层中药杂志,2001,15(6): 42.
- [5] 巢志茂,刘静明. 双边栝楼化学成分研究 [J]. 中国中药杂志,1991,16(2): 97—99.
- [6] 巢志茂,何 波. 栝楼果实的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志,1999,24(10): 612—613.
- [7] 董婷霞,徐国钧,金蓉鸾,等. 栝楼属种子类药材的蛋白电泳鉴别 [J]. 中国药科大学学报,1990,21(4): 249—250.
- [8] 黄璐琦,王 敏,杨 滨. 栝楼农家品种苗期的分子标识鉴别 [J]. 中国药学杂志,1999,34(9): 66.
- [9] 宁志怨,董 玲,陈静娴,等. 栝楼种质资源亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. 安徽农业大学学报,2007,34(4): 560—563.
- [10] 陈士林. 中药材 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京:人民卫生出版社,2012.
- [11] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological Identifications Through DNA Barcodes. [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003a, 270: 313—321.
- [12] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, de WAARD J R. Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003b, 270: 596—599.
- [13] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA Barcoding Australia's Fish Species [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences, 2005, 360: 1847—1857.
- [14] 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: 8369—8374.
- [15] 赵 明,谭 玲,莫帮辉,等. DNA 条形码识别 Ⅲ. 媒介蚊类 DNA 条形码芯片的初步研究 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2008,19(2): 99—103.

- [16] 张金梅, 王建秀, 夏 涛, 等. 基于系统发育分析的 DNA 条形码技术在澄清芍药属牡丹组物种问题中的应用 [J]. 中国科学(C 辑: 生命科学), 2008, 38(12): 1166—1176.
- [17] 冯 毅, 王 莉, 白云峰, 等. 基于 COI 序列快速鉴定花蓟马的 DNA 条形码芯片初探 [J]. 生物技术通报, 2009(8): 169—173.

Molecular Identification of *Trichosanthes kirilowii* and Its Adulterants Using ITS2 Sequence Fragments

LV Ze-fang¹, YU Jie^{1,2}

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400716, China

Abstract: Molecular identification based on ITS2 sequence fragments was conducted of *Trichosanthes kirilowii*, a Chinese herbal medicine plant, and its adulterants on the medicine market. We treated the roots of 8 experimental samples for DNA extraction and purification, PCR amplification and bidirectional sequencing to get the ITS2 sequences. Then the 8 ITS2 sequences obtained by experiment and 7 downloaded ITS2 sequences from GenBank database were aligned using ClustalX, with manual adjustments assisted by BioEdit. MEGA program version 5.0 was employed to estimate the intraspecific and interspecific genetic distance. NJ and ML trees were constructed using K-2P distance method in order to evaluate the identification results. The range of intraspecific difference space of all Chinese herbal plants was 0—0.077 9, with a mean value of 0.019, while the interspecific distance ranged from 0.004 to 0.594, with a mean value of 0.436. The interspecific value was significantly greater than the intraspecific value. NJ and ML phylogenetic trees of different species of *T. kirilowii* and its adulterants were constructed and the two phylogenetic trees were consistent with each other. Each species was clustered into one branch, thus forming a monophyletic group, with a support rate of >50%. The results showed that the ITS2 barcoding is a fast and accurate method for the identification of *T. kirilowii* and its adulterants.

Key words: *Trichosanthes kirilowii*; adulterant; ITS2 sequence fragment; molecular identification

责任编辑 夏 娟

