

• 药材与资源 •

ITS2 条形码序列对茜草科黎药植物的鉴定

李 栎¹, 肖 憬², 苏振宇¹, 黄 瑶³, 唐历波^{1*}

1. 海南医学院理学院, 海南 海口 571101

2. 武警甘肃总队医院 保健办门诊, 甘肃 兰州 530050

3. 海南惠普森医药生物技术有限公司, 海南 海口 570102

摘要: 目的 利用 DNA 条形码技术通过 ITS2 序列对海南茜草科黎药植物进行快速鉴定。方法 对样本的核基因 ITS2 片段进行 PCR 扩增并双向测序, 所得序列经 CodonCode Aligner 拼接后, 利用 MEGA5.0 软件进行数据分析, 并构建聚类树。从 ITS2 网站上获得 ITS2 二级结构信息, 利用 TAXON DNA 软件分析序列种内、种间变异并作 barcoding gap 分析。结果 构建的系统树各个种不同样本均分别聚在一起, 表现出单系性; 各 ITS2 二级结构种内无明显差异; 种间存在明显差异; 基于 ITS2 序列的 barcoding gap 图显示种内变异和种间变异存在明显的 barcoding gap。结论 ITS2 序列可以作为 DNA 条形码对海南茜草科黎药植物进行快速鉴定。

关键词: 茜草科; 黎药植物; ITS2; DNA 条形码; 二级结构

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)13-1814-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.021

Identification of *Li* Medicine plants in Rubiaceae using ITS2 barcode sequenceLI Li¹, XIAO Jing², SU Zhen-yu¹, HUANG Yao³, TANG Li-bo¹

1. College of Science, Hainan Medical University, Haikou 571101, China

2. Department of Healthcare, Gansu People Armed Police Corps Hospital, Lanzhou 530050, China

3. Hainan Helpeson Medicine and Biotechnology Co., Ltd., Haikou 570102, China

Abstract: Objective To identify *Li* Medicine plants in Rubiaceae using DNA barcode technique and ITS sequence. **Methods** The second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA was amplified by PCR and sequenced by bidirectional sequencing. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed by CodonCode Aligner. The related data analysis was performed using software MEGA 5.0 and the phylogenetic tree was constructed. The ITS2 secondary structure was predicted using ITS2 web server. The distribution of intra- and inter-specific variability was compared using TAXON DNA software and analysed by barcoding gaps. **Results** In the cluster dendrogram, all species showed monophyletic. There was no obviously distinguished intra-specific difference in ITS2 secondary structure, but there was obviously distinguished inter-specific difference. There are the significant barcoding gap between intra- and inter-specific variations. **Conclusion** ITS2 sequence could be used as a DNA barcode for the rapid identification of *Li* Medicine plants in Rubiaceae in Hainan.

Key words: Rubiaceae; *Li* Medicine plants; ITS2; DNA barcoding; secondary structure

茜草科是被子植物中的第四大科^[1-2], 全世界约有 500 属 6 000 种, 主要分布于热带和亚热带, 我国有 75 属 477 种, 大部分都属于未被开发的药用植物资源种类, 它们有着广泛的开发利用前景。近年来, 在国际上对茜草科的系统学及相关应用科学的研究已逐渐成为热点。对茜草科各等级分类群研究的专著

修订和区系研究, 宏观系统学、生殖生物学、DNA 分析和植物化学等各方面的研究也全面开展起来^[3-4]。然而, 我国还没有对该科植物进行深入研究, 对其分类及系统演化方面的研究还处于落后的地位。

黎族医药是黎族人民在长期与疾病斗争的医疗实践中不断积累的宝贵经验的总结, 是中华民族传

收稿日期: 2013-02-15

基金项目: 海口市重点科技计划项目 (20110036)

作者简介: 李 栎 (1978—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为植物 DNA 条形码。Tel: 18689877322 E-mail: liliml@163.com

*通信作者 唐历波 Tel: (0898)66893739 E-mail: 764825978@qq.com

统医药的重要组成部分。黎药治疗的疾病类型相对集中,主要有风湿、蛇伤、骨折等。由于黎族没有自己的文字,药物的使用、名称及药用植物的鉴定均是靠语言代代相传。在这种情况下利用现代科学技术手段对黎药进行正确的鉴定不仅关系着患者的身体健康,确保用药安全,也为及时抢救挖掘传统黎族医药,促进其发展有着积极的意义。

DNA 条形码 2003 年由加拿大动物学家 Hebert 首次提出^[5],它是利用基因组中一段公认的标准短序列来进行物种鉴定的分子诊断新技术,是近年来生物分类和鉴定的研究热点。截止目前,研究者们已经提出了 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。其中,作为分子系统进化研究中最重要标记之一,ITS2 已被提出作为药用植物鉴定的标准条形码序列^[7-10],ITS2 作为 DNA 条形码序列有以下优

点:其序列两端具有保守区便于通用引物的设计;序列容易扩增;序列具有足够的可变性以区分密切相关的物种。虽然 ITS2 条形码在植物鉴定方面显示出很大的潜力,但是目前还缺少对更大样本量的研究来确定 ITS2 的鉴定效率。本研究选取采自海南地区的茜草科黎族药用植物 11 个种 16 个样品以及从 GenBank 下载的 7 条 ITS2 序列评估 ITS2 序列作为 DNA 条形码对海南茜草科黎药植物的鉴定能力。

1 材料

以采自海南地区的茜草科黎族药用植物 11 个种 16 个样品为实验材料。由海南医学院唐历波副教授鉴定,数字影像信息及凭证标本保存于海南医学院理学院生物学教研室。从 Genbank 数据库(数据下载日期 2013 年 1 月 30 日)获得茜草科同种或其他种 ITS2 序列 7 条,实验材料来源和 GenBank 数据详见表 1。

表 1 样品来源和 GenBank 数据表
Table 1 Sample sources and GenBank data

序号	植物	拉丁学名	采集地	标本号	GenBank 登录号
1	海南九节	<i>Psychotria hainanensis</i>	儋州南药园	PS0270MT01	KC441053
2	海南九节		海口海医校园	PS0270MT02	KC441054
3	海南九节		海口海医校园	PS0270MT03	KC441055
4	巴戟	<i>Morinda officinalis</i>	海口海医校园	PS0111MT03	KC533831
5	巴戟		兴隆热带植物园	PS0111MT01	KC533832
6	巴戟		海口广安堂药店	PS0111MT02	KC533833
7	巴戟		儋州南药园	PS0111MT05	KC441036
8	巴戟		GenBank	GenBank	GQ434634
9	巴戟		GenBank	GenBank	GQ434633
10	乌檀	<i>Nauclea officinalis</i>	尖峰岭	PS0104MT02	KC441039
11	乌檀		儋州南药园	PS0104MT03	KC441040
12	乌檀		兴隆热带植物园	PS0201MT01	KC441041
13	重瓣栀子	<i>Gardenia angusta</i> var. <i>ovalifolia</i>	兴隆热带植物园	PS0216MT01	KC533836
14	海南龙船花	<i>Ixora hainanensis</i>	尖峰岭	PS0080MT01	KC533830
15	水锦树	<i>Wendlandia tinctoria</i>	尖峰岭	PS0127MT01	KC533834
16	水锦树		GenBank	GenBank	GQ434642
17	栀子	<i>Gardenia jasminoides</i>	兴隆热带植物园	PS0181MT01	KC533838
18	粉叶金花	<i>Mussaenda hybrida</i> cv. <i>alicia</i>	兴隆热带植物园	PS0191MT01	KC533837
19	风箱树	<i>Cephalanthus tetrandrus</i>	GenBank	GenBank	AY205363
20	风箱树		GenBank	GenBank	AJ346883
21	团花龙船花	<i>Ixora cephalophora</i>	GenBank	GenBank	AB491762
22	鸡矢藤	<i>Paederia scandens</i>	海口海医校园	PS0024MT01	KC441044
23	鸡矢藤		GenBank	GenBank	GQ434643

2 方法

2.1 DNA 提取

叶片样品经变色硅胶（青岛海洋化工有限公司）干燥后称取 10~15 mg，采用 DNA 球磨仪（Retsch MM300，德国）研磨 30 s（2 000 r/min），茎枝样品剪碎后用液氮研磨。研磨后的样品，使用 DNA 提取试剂盒（Tiangen Biotech Co.，中国）提取基因组总 DNA。利用 NanoDrop 2000（Thermo Scientific，美国）测定 A_{260}/A_{280} 值及 DNA 浓度。

2.2 PCR 扩增及测序

扩增、测序引物一致，正向为 5'-GCGATACTTGGTGTGAAT-3'，反向为 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'（引物合成由上海生工生物工程股份有限公司完成）。PCR 反应体系为 25 μ L，体系包括 $MgCl_2$ 2 μ L（25 mmol/L），dNTP 2 μ L（2.5 mmol/L），PCR 缓冲液 2.5 μ L，引物各 1.0 μ L（2.5 μ mol/L）（Sangon Co.，中国），聚合酶 1.0 U（Biocolor BioScience & Technology Co.，中国），总 DNA 1 μ L（约 30 ng）。扩增程序：94 $^{\circ}$ C，变性 5 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s；56 $^{\circ}$ C 退火 30 s；72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s（40 个循环）；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min^[7]。使用的 PCR 仪为 promega M7501 PCR Master Mix 10 reactions TAQ。PCR 扩增产物的测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成，使用 ABI 3730XL 测序仪（Applied Biosystems Co.，美国）进行双向测序。

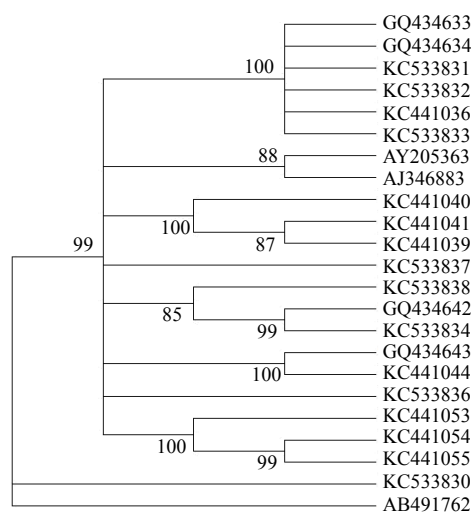
2.3 数据处理方法

测序峰图利用 Codon Code Aligner V2.6（Codon Code Co.，美国）进行校对拼接，去除低质量序列及引物区，获得严格的一致性序列。对所有序列采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8S 和 28S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[11]，进而获得 ITS2 序列的二级结构预测图。使用 MEGA 5.0 分析比对所有 ITS2 间隔区序列^[12-13]，并基于 K_2P 模型进行遗传距离分析，构建 UPGMA 系统聚类树。使用 TAXON DNA 软件^[14]分析序列种内、种间变异并作 barcoding gap 图。

3 结果与分析

3.1 聚类分析

基于 ITS2 序列，通过非加权配对算术平均法所构建的 UPGMA 系统聚类树（图 1）可以看出，除海南龙船花和团花龙船花以外，其他 8 个种 21 个样本被聚为一枝，支持率为 98%。供试样本各种种内样本均分别聚在一枝，表现出单系性，与其他种能



bootstrap 1 000 次重复，枝上仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 的数值
Bootstrap scores (1 000 replicates) are shown ($\geq 50\%$) for each branch

图 1 基于 ITS2 序列构建的 23 个样本的 UPGMA 树
Fig. 1 UPGMA dendrogram of 23 species based on ITS2 sequences

够明显地区分开。

3.2 二级结构分析

根据 <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/> 所预测的供试样本的 ITS2 二级结构结果可以看出所有物种的二级结构均为一个中心环及 4 个螺旋区构成，每个螺旋上又有或多或少的大小不一的茎、环结构。在比较样本中各种种内 ITS2 二级结构（图 2）时发现，海南九节、乌檀和巴戟种内 ITS2 二级结构在各螺旋区长度、茎环数目、大小、位置以及各螺旋之间的夹角等方面基本相同。水锦树与凤箱树种内 2 个样本 ITS2 二级结构比较时发现，在中心环上均有一个样本多出一短茎，其他结构差异不明显。在比较样本各种种间 ITS2 二级结构（图 3）时发现，各种种间 ITS2 二级结构在中心环大小及 4 个螺旋区结构上均存在明显差异，其中 13 号重瓣栀子、14 号海南龙船花及 21 号团花龙船花的 ITS2 二级结构明显与其他物种不同。由于网站资源限制，没有找到鸡矢藤的 ITS2 二级结构信息。因此，通过 ITS2 二级结构，可以将供试样本中的各个种直观地鉴别出来。

3.3 Barcoding gap 分析

利用 MEGA 5.0 分析 ITS2 序列，得出供试样本最大种内变异距离值为 0.093 7；最小种间变异距离值为 0.042 9。再通过 TAXON DNA 软件做 barcoding gap 图（图 4）。从图中可以看出 ITS2 序列种间、种内变异的分布情况，种内变异和种间变异分布呈两边

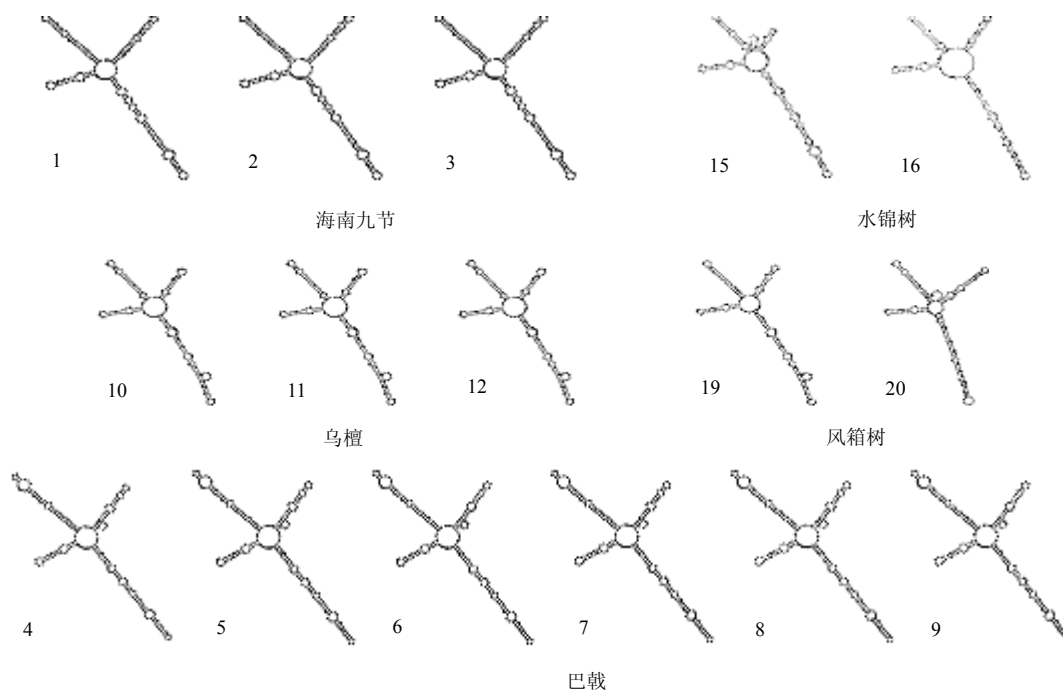


图 2 种内 ITS2 预测序列的二级结构比较

Fig. 2 Comparison on ITS2 secondary structure in intra-specific

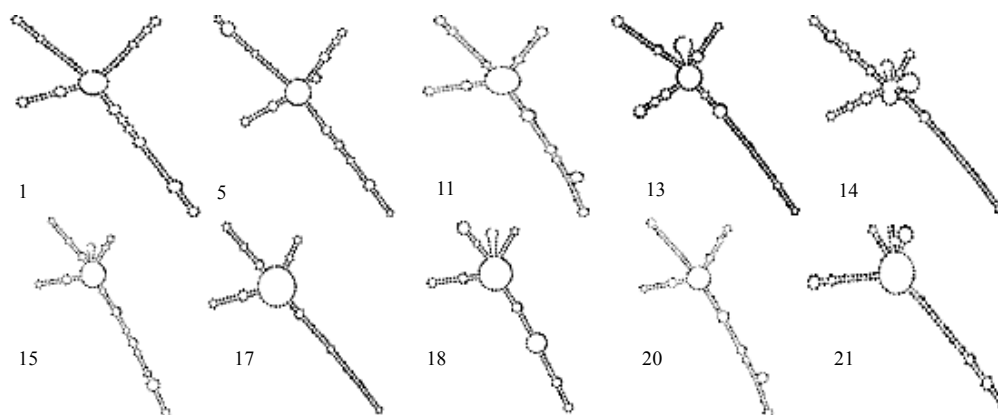


图 3 种间 ITS2 序列预测二级结构比较

Fig. 3 Comparison on ITS2 secondary structure in inter-specific

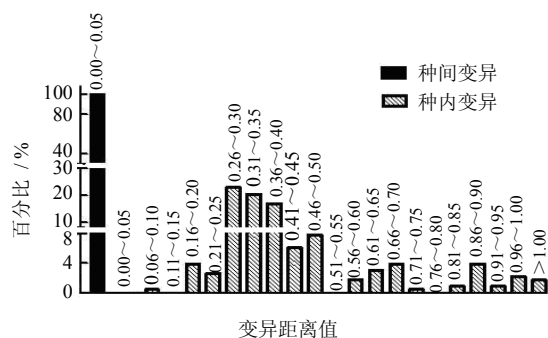


图 4 23 个供试样品基于 ITS2 序列的 barcoding gap

Fig. 4 Barcoding gaps of ITS2 sequence for 23 samples

分开的趋势, 存在明显的 barcoding gap。此结果表明, ITS2 序列可以作为 DNA 条形码对海南茜草科黎药植物进行快速的分子鉴定。

4 讨论

据文献记载和民间调查, 海南黎族使用的药用植物约有 515 种, 隶属于 125 科, 360 属。种数较多的科有豆科 23 属 36 种, 菊科 21 属 28 种, 大戟科 16 属 24 种和茜草科 12 属 22 种^[15]。关于豆科、菊科 DNA 条形码的相关研究已有文献报道^[16-17]。本研究小组正在进行大戟科及茜草植物的 DNA 条形码研究。本实验利用采自海南地区的茜草科黎族

药用植物 11 个种 16 个样品以及从 GenBank 下载的 7 条相关序列评估目前被广泛认可的 DNA 条形码 ITS2 序列片段对海南茜草科黎药植物的鉴定能力。

通过基于 ITS2 条形码序列所构建的系统聚类树,证明 ITS2 条形码序列能够准确鉴定所有的供试样品。对于不同采集地的样品鉴定无明显差异,同种样品均被聚为一支,表现为单系性。我们通过分析 ITS2 二级结构发现,各 ITS2 二级结构种内无明显差异;种间存在明显差异;另外,对种内与种间变异距离的 barcoding gap 分析显示种内变异和种间变异存在明显的 barcoding gap。综合以上结果,ITS2 序列可以作为 DNA 条形码对海南茜草科黎药植物进行快速的分子鉴定。如果要确定 ITS2 序列是否能够作为鉴定所有茜草科植物的 DNA 条形码,还需要进一步扩大采集样本的范围和数量。

参考文献

- [1] Robbrecht E. Tropical woody Rubiaceae [J]. *Oper Bot Belg*, 1988, 1: 14-176.
- [2] Mabberley D J. *The Plant Book: A Portable Dictionary of the Higher Plants* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
- [3] Taylor C M. First international conference of the Rubiaceae introduction [J]. *Ann Miss Bot Gard*, 1995, 82: 355-356.
- [4] Robbrecht E, Puffet C. Second international Rubiaceae conference: introduction [J]. *Oper Bot Belg*, 1996, 7: 9-10.
- [5] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 96-99.
- [6] Ning S P, Yan H F, Gang H, *et al.* Current advances of DNA barcoding study in plants [J]. *Biodiv Sci*, 2008, 16: 417-425.
- [7] 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: e8613.
- [8] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *Ethnopharmacology*, 2010, 130: 116-121.
- [9] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification [J]. *Cladistics*, 2010, 27(2): 165-170.
- [10] 辛天怡, 姚 辉, 罗 焜, 等. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究 [J]. *药学学报*, 2012, 47(8): 1098-1105.
- [11] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50-57.
- [12] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8369-8374.
- [13] Song J Y, Yao H, Li Y, *et al.* Authentication of the family Polygonaceae in Chinese Pharmacopoeia by DNA barcoding technique [J]. *Ethnopharmacology*, 2009, 124: 434-439.
- [14] Slabbinck B, Dawyndt P, Martens M, *et al.* Taxon gap: a visualization tool for intra- and inter-species variation among individual biomarkers [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24: 866-867.
- [15] 甘炳春, 李榕涛, 杨新全, 等. 海南五指山区黎族药用民族植物学研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2007, 89(6): 315-321.
- [16] 高 婷, 姚 辉, 马新业, 等. 中国黄芪属药用植物 DNA 条形码 (ITS2) 鉴定 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2010, 12(2): 222-227.
- [17] 胡志刚. 菊科药用植物 DNA 条形码及叶绿体基因组研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.