

不同地理居群破布叶的 psbA-trnH 和 ITS2 序列及其聚类分析

林 爽¹, 吴海燕², 张宏意¹, 李坤平^{2*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 探讨破布叶 *Microcos paniculata* 不同地理居群间的 DNA 序列变异与地理分布的关系, 为其种质资源评价和基原植物的分子鉴定提供参考。方法 对破布叶 14 个居群 14 份个体样品以改良的 3×CTAB 法提取基因组 DNA, 选择特异的引物扩增 ITS2 和 psbA-trnH 序列; PCR 扩增产物直接双向测序分析。DNAMAN 8.0 软件处理测序数据, MEGA6.0 软件计算 K2P 遗传距离, 运用 NJ 法构建系统聚类树。结果 破布叶 14 个居群的 ITS2 序列均为 462 bp, 共检测到 14 个变异位点, 居群间遗传距离 0.000 0~0.019 8。除云南景洪居群样本的 psbA-trnH 序列存在 8 bp 缺失外, 其他 13 个居群样本的 psbA-trnH 序列均长 387 bp, 无变异, 居群间遗传距离为 0.000 0。结论 不同地理居群破布叶的 psbA-trnH 较 ITS2 更为保守, 二者 PCR 扩增引物特异性好, 扩增效率和测序成功率高, 对其药材及基原植物的分子鉴定可采用 psbA-trnH 为主, ITS2 序列为辅的 DNA 条形码技术。

关键词: 破布叶; psbA-trnH; ITS2; DNA 条形码; 分子鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)07-1403-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.024

Cluster analysis on psbA-trnH and ITS2 sequences of *Microcos paniculata* from different geographical populations

LIN Shuang¹, WU Hai-yan², ZHANG Hong-yi¹, LI Kun-ping²

1. School of Chinese Traditional Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between variations of chloroplast DNA psbA-trnH and nuclear ribosomal DNA ITS2 sequences and the geographical origins of *Microcos paniculata*, and seek for some evidence for its germplasm resources evaluation and molecular identification. **Methods** Total genomic DNA was extracted from *M. paniculata* and the psbA-trnH and ITS2 sequences were amplified by PCR and directly sequenced. The raw data were dealt with DNAMAN 8.0 and the pairwise distance was calculated based on Kimura 2-parameter model using MEGA 6.0. The phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method. **Results** The ITS2 sequences of *M. paniculata* from different populations were 462 bp with 14 variable sites. The nucleotide divergence between ITS2 sequences in pairwise comparison was calculated and the result showed that the distances between *M. paniculata* populations is about 0.000 0 — 0.019 8. The sequences length of psbA-trnH was 387 bp, except for one isolated from Jinghong, Yunnan province which was 379 bp. **Conclusion** The psbA-trnH sequences of *M. paniculata* are more conservative than the ITS2 sequences, which can effectively identify *M. paniculata* from its adulterants and the closely relate species. The ITS2 sequence is so sensitive with the geographical variation that it can show the different characteristics of different populations in molecular level.

Key words: *Microcos paniculata* L.; psbA-trnH; ITS2; DNA barcoding; molecular identification

破布叶 *Microcos paniculata* L. 为多年生灌木或小乔木, 以叶入药, 谓之“布渣叶”^[1]。我国的破布叶资源主要分布于广东、广西、海南、云南等

省区, 大多野生, 尚未见规范化栽培。近年来, 随着我国凉茶饮料行业的快速发展, 破布叶的市场需求剧增, 人们对野生破布叶资源的无序和过度开发,

收稿日期: 2016-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31300273); 广东省科技计划项目 (2015A030302082)

作者简介: 林 爽 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源与次生代谢。E-mail: linsay.linshuang@foxmail.com

*通信作者 李坤平 (1978—), 男, 博士, 副教授, 从事中药制药和药用植物次生代谢方面的教学与研究。

Tel: (020)39352118 E-mail: lkpchina@hotmail.com

使得其种质资源破坏日益严重。当前,对破布叶的研究集中在其化学成分^[2-4]、药效作用^[5-7]、质量分析^[8-10]等方面,鲜有破布叶种质保护与开发,以及药材和基原植物分子鉴定的报道,相应的基础研究亟待深入。

DNA 条形码技术为近期发展起来的一种分子生物学鉴定方法,即通过比对一段通用 DNA 片段,对物种进行快速、准确的识别和认识^[11];该技术在中药基原植物及中药材鉴定等方面应用越来越广泛^[12-15]。DNA 条形码技术的核心是其条形码序列的筛选确定,理想的条形码应具有通用性,同时又要具有足够的变异以区别不同的物种。国际条形码协会植物工作组建议将 *rbcL*+*matK* 组合作为植物通用条形码^[16],中国 DNA 条形码植物工作组建议将 ITS/ITS2 作为种子植物的核心条形码^[17],《中国药典》2015 年版将 ITS2 和 *psbA-trnH* 作为植物类中药材及基原物种鉴定的 DNA 条形码^[18]。

ITS2 和 *psbA-trnH* 序列具有进化速率较快、

多态性位点丰富、便于测序等优点,在研究植物种质资源系统进化和遗传多样性研究中普遍采用^[11,15-18]。Liu 等^[19]将其作为生物地理研究的有效工具应用于中国亚热带森林资源的保护,Li 等^[20]用 ITS2 评价了不同花椒品系的遗传多样性。但上述序列在破布叶种质资源及遗传多样性研究极少;迄今,只有汤欢等^[21]利用 ITS2 序列对布渣叶及其混伪品进行分子鉴定的报道。本研究以 14 个居群的布渣叶为研究对象,扩增了其核糖体 DNA 的 ITS2 和叶绿体 DNA 的 *psbA-trnH* 序列,比较了不同居群间相应序列的遗传变异,结合部分 GenBank 数据构建了破布叶系统进化树。

1 材料与方法

1.1 破布叶样品的采集

不同地理居群破布叶样品于 2015 年 7~9 月采集,所有样品经本校药用植物教研室张宏意博士鉴定为椴树科破布叶属植物破布叶 *Microcos paniculata* L.,见表 1。

表 1 破布叶样品来源信息及其 ITS2 和 *psbA-trnH* GenBank 登录号

Table 1 Information of *M. paniculata* populations and corresponding accession numbers of GenBank

编号	居群位置	GenBank 登录号	
		ITS2	<i>psbA-trnH</i>
S1	广东省珠海市淇澳岛淇澳村	KU216469	KU216474
S2	广东省广州市番禺区滴水岩森林公园	KU601567	KU601568
S3	广东省广州中医药大学药王山	KX377376	KX377400
S4	广东省肇庆市鼎湖山自然保护区	KX377374	KX377398
S5	广东省云浮市郁南河口镇和都上替村	KU216472	KU216477
S6	广东省阳东县大八镇太安村	KX377378	KX377401
S7	广东省阳江大沟镇徐赤村	KX377377	KX377402
S8	广东省茂名市电白那霍镇茶山佳田村	KX377375	KX377399
S9	广东省湛江市徐闻下桥镇勇士农场	KU216470	KU216475
S10	广东省湛江市廉江石城镇铜锣埔军屯	KU216468	KU216473
S11	海南省定安县新竹镇卜优村	KU216471	KU216476
S12	海南省儋州市海南热带农业大学	KX377379	KX377403
S13	广西壮族自治区平南县官城镇八宝村上胡屯	KX377360	KX377384
S14	云南省景洪市勐罕镇曼累纳行政村曼远村	KU601571	KU601572

1.2 仪器与试剂

高速离心机(YG16-W);涡旋混合仪(QL901);PCR 仪(T100, BIO-RAD);全自动凝胶成像系统(Tacan-4100);电泳仪(DYY-8C);琼脂糖、Premix taq、DL2000、RNase 酶和 DNAiso Reagent 试剂盒(TAKARA);GOLDVIEW(鼎国生物);CTAB(BIOSHARP);氯仿、异戊醇、异丙醇、TRIS、EDTA、氯化钠(市售分析纯)。

1.3 破布叶总 DNA 的提取

取破布叶样品约 0.1 g,采用改良的 3×CTAB 法提取总 DNA,0.8%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像

仪处理并保存。同时,采用分光光度法测定 260 nm、280 nm 吸光度(*A*),并计算样品的 A_{260}/A_{280} 值。正向引物 ITS2 F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3',反向引物 ITS3 R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACA-AT-3'。正向引物 *psbA* F: 5'-GTTATGCATGAACGT-AATGCTC-3',反向引物 *trnH* R: 5'-CGCGCATGGT-GGATTCACAATCC-3'。PCR 扩增反应体系为 50 μL,含有正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL,模板 DNA 1 μL,premix taq DNA 聚合酶 25 μL,ddH₂O 补齐。ITS2 和 *psbA-trnH* 优化的 PCR 反应条件为预变性 94 ℃、5 min,之后进入下一循环:94 ℃、30 s,

57 ℃、30 s, 72 ℃、60 s, 40 个循环后 72 ℃延伸 10 min。

1.4 PCR 扩增产物测序与分析

PCR 产物委托北京六合华大基因广州分公司进行双向测序。获得的测序峰图用 BioEdit 查看峰形质量, 确保质量合格后利用 DNAMAN8.0 软件将双链序列进行拼接, 去除引物区。所得序列通过 BLAST 工具与 NCBI 数据库中破布叶相应序列进行比对, 确定序列的可靠性。利用 MEGA6.0 软件做 ClustalW 多序列比对, 再用 Kimura 2-Parameter

(K2P) 法计算遗传距离, 以 NJ 法构建系统聚类树。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取及扩增分析

破布叶中多酚、多糖等代谢产物量较高, 本研究在前期实验基础上选择改良的 3×CTAB 法提取总 DNA, 提取产物的 A_{260}/A_{280} 在 1.75~1.83。从图 1 和 2 可见, 引物 ITS2F/ITS2R 及引物 *psbA* F/*psbA* R 特异性较强, PCR 产物均为单一目的条带, 扩增效率高且亮度大, 可用于直接双向测序。

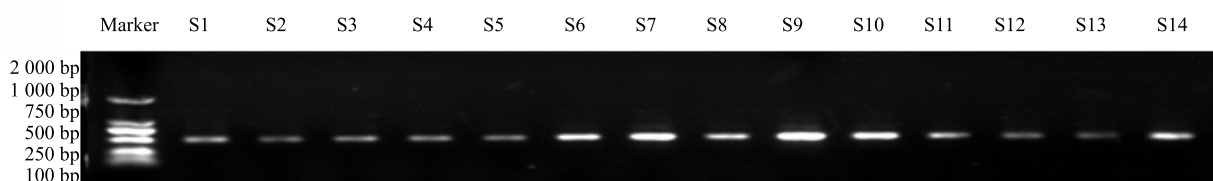


图 1 14 份破布叶样本的 ITS2-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of ITS2-PCR amplification products of 14 *M. paniculata* samples

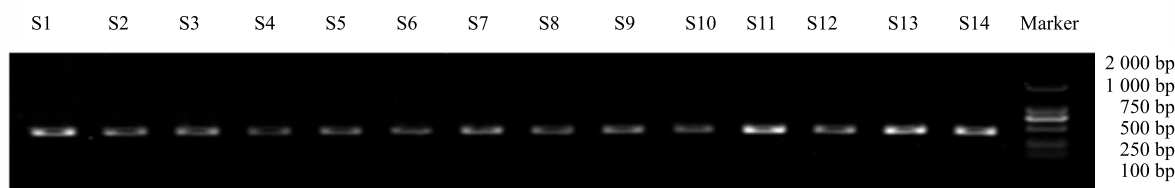


图 2 14 份破布叶样本的 *psbA*-trnH 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of *psbA*-trnH PCR amplification products of 14 *M. paniculata* samples

2.2 序列分析

实验所获得的 14 个居群的破布叶 ITS2 序列长度均为 462 bp, 包括 5.8 S 核糖体 RNA 部分基因 (1~84 bp), 完整 ITS2 基因 (85~327 bp) 及 28 S 核糖体 RNA 部分基因。将 14 条 ITS2 序列进行多序列比对, 发现共有 14 个变异位点 (图 3), 序列相似程度在 100%~98%。其中, S3、S7、S8、S11、S13 的 ITS2 序列相似度为 100%, 与 S10 相比, 相似度均为 98%; S4、S6、S9、S12 的 ITS2 序列的相似度为 100%; S14 与其他居群的样品相比, 相似度均为 98%。K2P 遗传距离计算显示不同地区来源样品的遗传距离为 0.000 0~0.019 8。ITS2 多位点变异的特点不仅在破布属的系统分类学研究中具有重要的指导意义, 而且可以作为初步判断破布叶来源的依据, 为破布叶“道地性”研究提供了参考。

经拼接去除引物区后得到的 *psbA*-trnH 中, S1~S13 的序列总长为 387 bp, (G+C) 量 30.5%, 相似度为 100%, 不存在差异位点 (图 4)。而 S14 的序列长度为 379 bp, (G+C) 量 30.6%, 与其他居群相比, 在第 247~254 个碱基处缺失了 1 个 8 bp

的片段, 相似度为 98%。整个序列包括 *psbA* 的部分 CDS (1~53 bp), 完整的 *psbA*-trnH 间隔区基因及携带组氨酸的 tRNA 部分基因。K2P 遗传距离计算结果显示 S14 与其他不同居群来源样品的遗传距离为 0.000 0。与破布叶的 ITS2 相比, 其 *psbA*-trnH 序列相对更为保守; 但对于 S14 居群而言, 其遗传变异明显, 可能是 S14 与其他破布叶居群地理位置遥远, 形成一个相对隔离的居群有关。

基于 ITS2 序列 (图 5-A) 和 *psbA*-trnH 序列 (图 5-B), 采用邻近法 (NJ) 构建的系统聚类树。无论是 ITS2 序列还是 *psbA*-trnH 序列, 破布叶及其同属植物海南破布叶 *Microcos chungii* (Merr.) Chun 都各自聚为一支, 表现出很好的单系性。从 NCBI 下载的其他近源种植物的 ITS2 序列和 *psbA*-trnH 序列, 如假苹婆 *Sterculia lanceolata* Cav.、阔叶槲 *Tilia platyphyllos* Scop. 等也各自聚为一支。这表明, ITS2 和 *psbA*-trnH 均能作为破布叶的 DNA 条形码, 其中 *psbA*-trnH 较 ITS2 更为保守, 可用于破布叶的物种鉴别; 而 ITS2 序列变异相对较大, 则更适合用来描述其不同地域来源的遗传变异。

Site	115	131	173	186	203	230	238	244	249	258	274	278	305	343
S1	- A -	- A -	- C -	- C -	- A -	- G -	- C -	- G -	- T -	- C -	- G -	- C -	- T -	- C -
S2	-	-	-	-	-	-	-	-	- g -	-	- a -	-	- g -	- t -
S3	-	-	-	- a -	- g -	-	-	- a -	-	- t -	-	-	- g -	- t -
S4	- g -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- g -	-
S5	-	-	-	- a -	- g -	-	-	- a -	-	-	-	-	- g -	- t -
S6	- g -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- g -	-
S7	-	-	-	- a -	- g -	-	-	- a -	-	- t -	-	-	- g -	- t -
S8	-	-	-	- a -	- g -	-	-	- a -	-	- t -	-	-	- g -	- t -
S9	- g -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- g -	-
S10	- g -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S11	-	-	-	- a -	- g -	-	-	- a -	-	- t -	-	-	- g -	- t -
S12	- g -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- g -	-
S13	-	-	-	- a -	- g -	-	-	- a -	-	- t -	-	-	- g -	- t -
S14	-	- c -	- t -	-	- g -	- a -	- g -	-	-	-	- a -	- g -	-	- t -

图 3 14 个破布叶居群的 ITS2 序列变异位点

Fig. 3 Variable sites in ITS2 sequences of 14 *M. paniculata* populations

Site	-----247 248 249 250 251 252 253 254-----									
S1	----- T T A A T G A G -----									
S2	-----									
S3	-----									
S4	-----									
S5	-----									
S6	-----									
S7	-----									
S8	-----									
S9	-----									
S10	-----									
S11	-----									
S12	-----									
S13	-----									
S14	----- * * * * * * * * -----									

*表示碱基缺失

* indicates base deletion

图 4 14 个破布叶居群的 psbA-trnH 序列变异位点

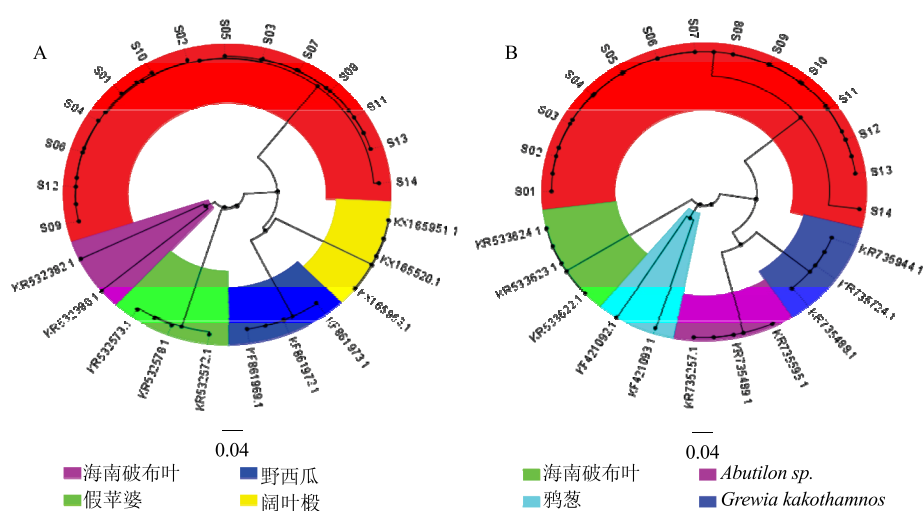
Fig. 4 Variable sites in psbA-trnH sequences of 14 *M. paniculata* populations

图 5 基于 ITS2 (A) 和 psbA-trnH (B) 构建破布叶及其近源种 NJ 系统聚类树 (Bootstrap 1 000)

Fig. 5 System cluster tree of *M. paniculata* and its closely related species constructed with ITS2 (A) and psbA-trnH (B) using Neighbor-Joining method

3 讨论

《中国药典》2015年版和卫生部新资源食品目录(2010)所收录的布渣叶,其规定的基原植物只有破布叶 *Microcos paniculata* L.。对布渣叶而言,其同属的海南破布叶 *Microcos chungii* (Merr.) Chun 和毛破布叶 *Microcos stauntoniana* G. Don 的干燥叶,三者形态上很难区分,极易混淆。本实验以我国破布叶的主要分布区域——广东、广西、海南、云南等地14个居群14份样本为对象,探讨了基于ITS2和psbA-trnH的DNA条形码技术在其分子鉴定和遗传变异研究方面的应用,具有重要的科学意义和应用价值。

14个居群破布叶样本的ITS2序列分析结果表明,不同居群破布叶ITS2序列长度相同,但存在不同位点碱基转换/颠换等变异,说明在不同的生长环境下,物种DNA序列会发生变化。而14个居群破布叶样本的psbA-trnH序列,除了云南景洪样本存在一个8 bp的碱基片段缺失以外,其他13份样本的psbA-trnH完全一致,说明破布叶的该序列高度保守。同时,在实验过程中,发现同一居群不同植株的ITS2和psbA-trnH序列未发生变异。对破布叶而言,其psbA-trnH和ITS2序列引物特异性好,扩增效率高,测序成功率高,故对其药材及基原植物的分子鉴定可采用psbA-trnH为主,ITS2序列为辅的DNA条形码技术。

破布叶在我国分布地域跨度较大,在所研究的14个居群中,既有海南定安、儋州等海岛生境、以及珠海淇澳岛等近岸小岛,也有广州滴水岩自然保护区和广西平南大瑶山原始生态居群,有较好的代表性。其中,云南景洪居群的地理位置变化最大,生境因子——海拔、温度、光照、土壤、降雨量等改变最显著,可能导致一些特殊的地理生态型的产生。实验结果表明,生长地域不同的破布叶,其ITS2和psbA-trnH序列存在不同程度的变异,这既与药材的道地性形成有关联,也是其种质资源保育和开发的基础。

破布叶的分子谱系地理学研究对其种质资源评价及核心种质构建不可或缺^[22]。上述不同地理居群破布叶ITS2和psbA-trnH序列变异的研究结果为研究破布叶属植物系统进化和遗传变异提供了参考,为道地性评价和形成机制研究奠定了基础。作为一种大宗的“药食两用”植物资源,布渣叶基原植物的分子鉴定及其遗传分化的地理格局研究,不但有

利于从源头保证其质量,亦有利于其优良种质的保育和开发。

志谢:海南大学陈致水副教授、海南省人民医院曾玉冰药师、昆明采智生物科技有限公司等在采样过程中给予帮助。北京六合华大基因广州分公司在测序过程中给予帮助。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李坤平, 陈艳芬, 岳春华, 等. 布渣叶保护急性心肌梗死有效部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 3373-3376.
- [3] Still P C, Yi B, González-Cestari T F, et al. Alkaloids from *Microcos paniculata* with cytotoxic and nicotinic receptor antagonistic activities [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(2): 243-249.
- [4] 冯世秀, 刘梅芳, 魏孝义, 等. 布渣叶中三萜和黄酮类成分的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(1): 51.
- [5] Aziz M A. Qualitative phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Microcos paniculata* barks and fruits [J]. *J Integr Med*, 2015, 13(3): 173-184.
- [6] 陈艳芬, 杨超燕, 李坤平, 等. 布渣叶总黄酮对大鼠急性心肌梗死的保护作用及其机制 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1003-1007.
- [7] 曾聪彦, 梅全喜, 高玉桥, 等. 布渣叶水提物镇痛药效学的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 22(8): 1757-1758.
- [8] 李坤平, 潘天玲, 高崇凯, 等. HPLC法测定布渣叶中牡荆苷和异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1746-1749.
- [9] 孙冬梅, 陈雪婷, 徐文杰. RP-HPLC同时测定布渣叶中4种黄酮类成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 72-74.
- [10] 李 洵, 罗文汇, 毕晓黎, 等. 布渣叶药材近红外指纹图谱的聚类分析 [J]. 广东药学院学报, 2013, 29(3): 270-272.
- [11] 陈士林, 庞晓慧, 姚 辉, 等. 中药DNA条形码鉴定体系及研究方向 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(5): 747-754.
- [12] Li M, Cao H, But P P H, et al. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes [J]. *J System Evol*, 2011, 49: 271-283.
- [13] 杨路存, 刘何春, 周学丽, 等. 羌活不同地理种群cpDNA trnT-trnL多态性分析 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3390-3395.

- [14] 倪梁红, 赵志礼, 孟千万, 等. ITS 和 psbA-trnH 序列鉴别绿绒蒿属藏药植物 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 541-545.
- [15] Tehen N, Parveen I, Pan Z Q, *et al.* DNA barcoding of medicinal plant material for identification [J]. *Cur Opin Biotechnol*, 2014, 25: 103-110.
- [16] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [17] China Plant BOL Group. Comparative analysis of a large dataset indicates that ITS should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [18] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [19] Liu J, Yan H F, Steven G N, *et al.* The use of DNA barcoding as a tool for the conservation biography of subtropical forests in China [J]. *Diver Distrib*, 2014, 21(2): 188-199.
- [20] Li X, Liu Y, Xie C X, *et al.* The chemical and genetic characteristics of Szechuan Pepper (*Zanthoxylum bungeanum* and *Z. armutum*) cultivars and their suitable habitat [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 467(7): 1-11.
- [21] 汤欢, 师玉华, 屠鹏飞, 等. 凉茶药材布渣叶及其混伪品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 1479-1484.
- [22] 李菁, 向婷婷, 许成, 等. 分子谱系地理学在药用植物基因水平的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1243-1246.