

• 药材与资源 •

ITS2 条形码序列对海南大戟科植物的鉴定

李 栎¹, 徐腊红², 唐历波^{1*}

1. 海南医学院理学院, 海南 海口 571101

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

摘要: 目的 利用 DNA 条形码技术评估 ITS2 序列对海南大戟科植物的鉴定能力。方法 利用 PCR 测序法, 对供试样本 ITS2 片段进行双向测序, 所得序列经 Codon Code Aligner 拼接后, 利用 MEGA 6.0 进行相关数据分析, 构建邻接 (NJ) 树。利用 TAXON DNA 软件分析序列种内、种间变异并作 barcoding gap 分析。从 ITS2 数据库中获得供试样本的预测 ITS2 二级结构。结果 大戟科供试样本 ITS2 序列中变异位点与信息位点分别占总序列长度的 84% 和 69.67%。供试各种在构建的 NJ 树中均各自成束, 表现出单系性; 基于 ITS2 序列的种内最大变异距离值 0.067 3; 种间最小变异距离值 0.119 1, 各 ITS2 二级结构种内无明显差异; 种间存在明显差异。结论 所得 ITS2 条形码序列对海南大戟科植物鉴定能力强, 可作为 DNA 条形码序列对海南大戟科植物进行快速鉴定。

关键词: 大戟科; ITS2; DNA 条形码; 鉴定; PCR 测序

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)09-1572-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.021

Identification of plants in Euphorbiaceae in Hainan by ITS2 barcoding sequence

LI Li¹, XU La-hong², TANG Li-bao¹

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

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To evaluate the ability of ITS2 region as a DNA barcode for identifying the plants in Euphorbiaceae in Hainan. **Methods** The ITS2 of ribosomal DNA was amplified and sequenced by bidirectional sequencing of PCR products. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed by using Codon Code Aligner. Phylogenetic study was performed using software MEGA 6.0 in accordance with Kimura-2-parameter (K2P) model, and the phylogenetic tree was constructed by using the Neighbor-joining (NJ) method. The ITS2 secondary structure was predicted using the ITS2 Database server. The distribution of intra-versus inter-specific variability was compared using DNA bar coding gaps. **Results** The variable sites and the informative sites were accounted for 84% and 69.67% of the ITS2 regions length. In the cluster dendrogram, all species showed monophyletic. The maximum intra-specific distance was 0.067 3, and the minimum inter-specific distance was 0.119 1. There was significant bar coding gap between intra-specific and inter-specific variation. To compare the ITS2 secondary structure, we noticed that it had no obvious distinguishment of intra-specific, while had obvious distinguishment of inter-specific. **Conclusion** ITS2 sequence can be used as a DNA barcode for the rapid identification of the plants in Euphorbiaceae in Hainan.

Key words: Euphorbiaceae; ITS2; DNA bar coding; identification; bidirectional sequencing of PCR products

大戟科 (Euphorbiaceae) 是被子植物中的一个
大科, 约 300 属, 8 000 种以上; 除北极及寒冷
的高山带以外, 遍布全球; 中国有 66 属 864 种^[1], 主
要分布在西南、华南; 是热带和亚热带植物区系中的

重要组成部分^[2]。海南大戟科植物包含了粮食作
物木薯, 战略植物橡胶树, 能源植物麻风树、油
桐; 药用植物巴豆和大戟等约 46 属 139 种 (不含栽
培种)^[3]。大戟科植物多数种类有毒, 许多植物因为

收稿日期: 2015-12-29

基金项目: 海南省 2013 自然科学基金项目 (813190)

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

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

其毒性或药用价值被人们所熟知,如巴豆 *Croton tiglium* L.、大戟 *Euphorbia peginensis* Rupr.、泽漆 *Euphorbia helioscopia* L.、甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex S. B. Ho、续随子 *Euphorbia lathyris* L.、蓖麻 *Ricinus communis* L. 等^[4]。因此对寻求准确快速的鉴定大戟科植物的方法显得尤为重要。一直以来,对大戟科植物的分类处理争议众多,实验研究很不充分。基于形态学的分类将大戟科分为 4 个亚科叶下珠亚科 (Phyllanthoideae Ascherson)、铁苋菜亚科 (Acalyphoideae Ascherson)、巴豆亚科 (Crotonoideae Pax)、大戟亚科 (Euphorbioideae)^[5]。在传统形态分类基础上,有人通过花粉亚显微形态特征、核型以及保守基因序列分析^[6-8]等方法对该科植物分类进行了探索性研究,取得了一定的进展。但是目前对于大戟科植物分类研究仍然缺乏一个能被普遍接受的分类系统。

2003 年由加拿大动物学家 Hebert 等^[9]首次提出的 DNA 条形码技术,给人们对生物分类的研究提供了

新的方法。这一技术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;与传统分类学方法相比 DNA 条形码技术不依赖标本的形态特征也能对其实现正确鉴定。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^[10-16],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,ITS2 被有些研究者提出可作为药用植物鉴定的标准条形码序列^[17-19],但 ITS2 对植物分类鉴定的效率仍缺少在更大样本量中的验证。本研究选取采自海南地区的大戟科植物 25 个种 56 个样品评估 ITS2 序列作为 DNA 条形码对海南大戟科植物的鉴定能力。

1 材料与方法

1.1 材料

以采自海南地区的大戟科植物 25 个种 56 个样品为实验材料。由海南医学院唐历波教授鉴定,数字影像信息及凭证标本保存于海南医学院理学院动物学与植物学教研室。实验材料来源详见表 1。

表 1 样本来源
Table 1 Sources of samples

序号	中文名	拉丁学名	产地	标本号
1	巴豆	<i>Croton tiglium</i>	乐东尖峰岭	HPS-061-MT02
2	白饭树	<i>Flueggea virosa</i>	乐东尖峰岭	HPS-083-MT01
3	白饭树		儋州研究院	HPS-083-MT02
4	山地五月茶	<i>Antidesma montanum</i>	兴隆热带植物园	HPS-102-MT01
5	山地五月茶		兴隆热带植物园	HPS-102-MT02
6	山地五月茶		儋州研究院	HPS-102-MT03
7	叶象花	<i>Euphorbia heterophylla</i>	儋州研究院	HPS-131-MT01
8	叶象花		兴隆热带植物园	HPS-131-MT02
9	闭花木	<i>Cleistanthus sumatranus</i>	兴隆热带植物园	HPS-187-MT01
10	锡兰叶下珠	<i>Phyllanthus mytifolius</i>	兴隆热带植物园	HPS-197-MT01
11	红桑	<i>Acalypha wikesiana</i>	海口海南医学院校园	HPS-303-MT01
12	红桑		海口海南医学院校园	HPS-303-MT02
13	红桑		海口火山口	HPS-303-MT03
14	变叶木	<i>Codiaeum variegatum</i>	海口海南医学院校园	HPS-304-MT01
15	变叶木		海口海南医学院校园	HPS-304-MT02
16	变叶木		海口火山口	HPS-304-MT03
17	红背桂	<i>Excoecaria cochinchinensis</i>	海口海南医学院校园	HPS-305-MT01
18	红背桂		海口火山口	HPS-305-MT03
19	蓖麻	<i>Ricinus communis</i>	海口海南医学院校园	HPS-306-MT01
20	蓖麻		海口火山口	HPS-306-MT02
21	蓖麻		海口海南医学院校园	HPS-306-MT03
22	木薯	<i>Manihot esculenta</i>	海口红旗镇	HPS-308-MT01

续表 1

序号	中文名	拉丁学名	产地	标本号
23	木薯		海口火山口	HPS-308-MT02
24	木薯		海口火山口	HPS-308-MT03
25	白背叶	<i>Mallotus apelta</i>	海口火山口	HPS-310-MT01
26	白背叶		海口红旗镇	HPS-310-MT02
27	白背叶		海口海南医学院校园	HPS-310-MT03
28	麻风树	<i>Jatropha carcas</i>	海口火山口	HPS-311-MT01
29	麻风树		海口火山口	HPS-311-MT02
30	麻风树		海口红旗镇	HPS-311-MT03
31	毛果算盘子	<i>Glochidion puberum</i>	海口火山口	HPS-312-MT01
32	毛果算盘子		海口火山口	HPS-312-MT02
33	油桐	<i>Vernicia fordii</i>	海口火山口	HPS-314-MT01
34	油桐		海口火山口	HPS-314-MT02
35	乌柏	<i>Sapium sebiferum</i>	海口火山口	HPS-315-MT01
36	一品红	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	海口海南医学院校园	HPS-316-MT01
37	一品红		海口海南医学院校园	HPS-316-MT02
38	一品红		海口火山口	HPS-316-MT03
39	大飞扬草	<i>Euphorbia hirta</i>	海口金牛岭	HPS-317-MT02
40	大飞扬草		海口火山口	HPS-317-MT03
41	绿玉树	<i>Euphorbia tirucalli</i>	海口金牛岭	HPS-318-MT01
42	绿玉树		海口金牛岭	HPS-318-MT02
43	绿玉树		海口金牛岭	HPS-318-MT03
44	龙骨	<i>Euphorbia trigona</i>	海口金牛岭	HPS-319-MT01
45	龙骨		海口金牛岭	HPS-319-MT02
46	春峰	<i>Euphorbia lactea f. cristata</i>	海口金牛岭	HPS-320-MT01
47	春峰		海口金牛岭	HPS-320-MT02
48	虎刺梅	<i>Euphorbia splendens</i>	海口金牛岭	HPS-321-MT01
49	虎刺梅		文昌东郊椰林	HPS-321-MT02
50	虎刺梅		文昌东郊椰林	HPS-321-MT03
51	红雀珊瑚	<i>Pedilanthus tithymaloides</i>	文昌东郊椰林	HPS-322-MT01
52	红雀珊瑚		文昌东郊椰林	HPS-322-MT02
53	红雀珊瑚		文昌东郊椰林	HPS-322-MT03
54	木奶果	<i>Baccaurea ramiflora</i>	兴隆热带植物园	HPS-501-MT01
55	全缘叶珊瑚	<i>Viburnum awabuki</i>	兴隆热带植物园	HPS-502-MT01
56	全缘叶珊瑚		兴隆热带植物园	HPS-502-MT02

1.2 方法

取变色硅胶(青岛海洋化工有限公司)干燥的叶片,利用DNA球磨仪(Retsch MM300,德国)研磨30 s(2 000 r/min)。采用植物基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,中国)提取总DNA。PCR扩增测序引物一致,正向为5'-GCGAT-ACTTGGTGTGAAT-3',反向为5'-GACGCTTCTC-CAGACTACAAT-3'(引物的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 μL,体系包括MgCl₂ 2 μL(25 mmol/L),dNTP 2 μL(2.5 mmol/L),PCR缓冲液2.5 μL,引物各1.0 μL(2.5 μmol/L)(生工生物工程股份有限公司,中国),聚合酶1.0 U(博彩生物科技有限公司,中国),总DNA 1 μL(约30 ng)。扩增程序:94 ℃,变性5 min;94 ℃变性30 s;56 ℃退火30 s;72 ℃延伸45 s(进行40个循环);72 ℃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深圳华大基因生物医学工程有限公司完成。测序峰图经 Codon Code Aligner 拼接后,利用 MEGA 6.0 进行相关数据分析,并构建邻接 (NJ) 树。利用 TAXON DNA 软件分析序列种内、种间变异并作 bar coding gap 分析。从 <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/> 获得供试样本的预测 ITS2 二级结构。具体方法参考文献方法^[20]。

2 结果与分析

2.1 DNA 模板及 PCR 扩增效率、测序成功率

本实验 56 份样本中提取的 DNA, 获得较高质量 DNA 序列占 42.4%。56 份 DNA 样品进行扩增, 扩增成功率为 95.2%; 扩增产物测序成功率为 93.3%, 即序列获得率 88.8%。

2.2 序列长度和变异系数分析

用 MEGA 6.0 软件对所得序列进行比对分析, 比较不同序列变异位点数与信息位点数。结果表明, ITS2 序列长度 199~229 bp, 全序列排序比对长度为 300 个位点, 其中有 252 个变异位点, 209 个简约信息位点, 分别占总序列长度的 84% 和 69.67%。

2.3 种内、种间变异距离值及 barcoding gap 分析

应用 MEGA 6.0 软件基于 K2P 距离模型计算供试样本种内、种间变异距离值, 结果表明供试样本最大种内变异距离值为 0.067 3; 最小种间变异距离值为 0.119 1。再通过 TAXON DNA 软件做 barcoding gap 图 (图 1)。从图 1 中可以看出 ITS2 序列种内、种间变异的分布情况, 种内变异和种间变异分布呈两边开的趋势, 存在明显的 barcoding gap。此结果表明, ITS2 序列对供试样本在种水平的鉴定能力较强。另外从图 1 中可以发现种间变异距离值在 0.15~0.35、0.90~1.28 出现 2 个密集区间, 进一步分析这 2 个区间发现: 0.15~0.35 这一区间主要是由巴豆亚科与大戟亚科、

巴豆亚科与铁苋菜亚科的种间变异距离值组成, 而 0.90~1.28 主要由叶下珠亚科与大戟科另外 3 个亚科之间的种间变异距离值组成。

用 MEGA 6.0 软件对 ITS2 基因进行序列比对和系统发育分析, 结果见图 2, 供试的 25 个种 56 个样本被分为 2 分支 (I 和 II)。分支 I 中包括 17 个种 41 个样本, 分支 II 包括 8 个种 15 个样本, 从图 2 中可以看出 ITS2 序列对供试的 25 个种 56 个样本在种的水平上能很好地分开, 鉴定成功率达 100%。

2.4 ITS2 的二级结构分析

根据 ITS2 数据库 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) 所预测的供试样本 ITS2 二级结构结果可以看出所有物种的二级结构均由 1 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 (图 3)。在比较样本中各

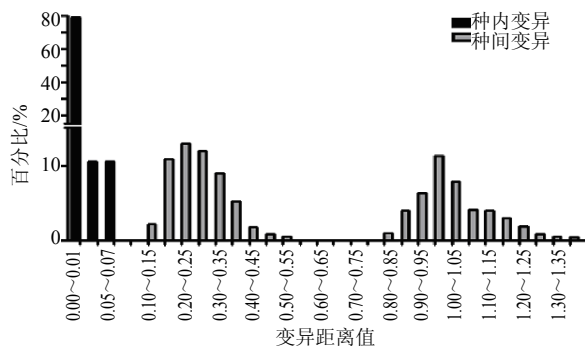


图 1 56 个供试样本基于 ITS2 序列的 barcoding gap

Fig. 1 Bar coding gap of ITS2 sequence for 56 samples

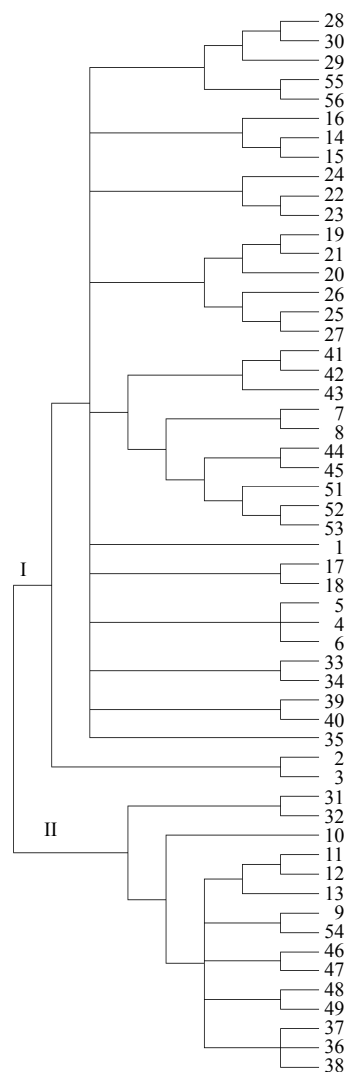


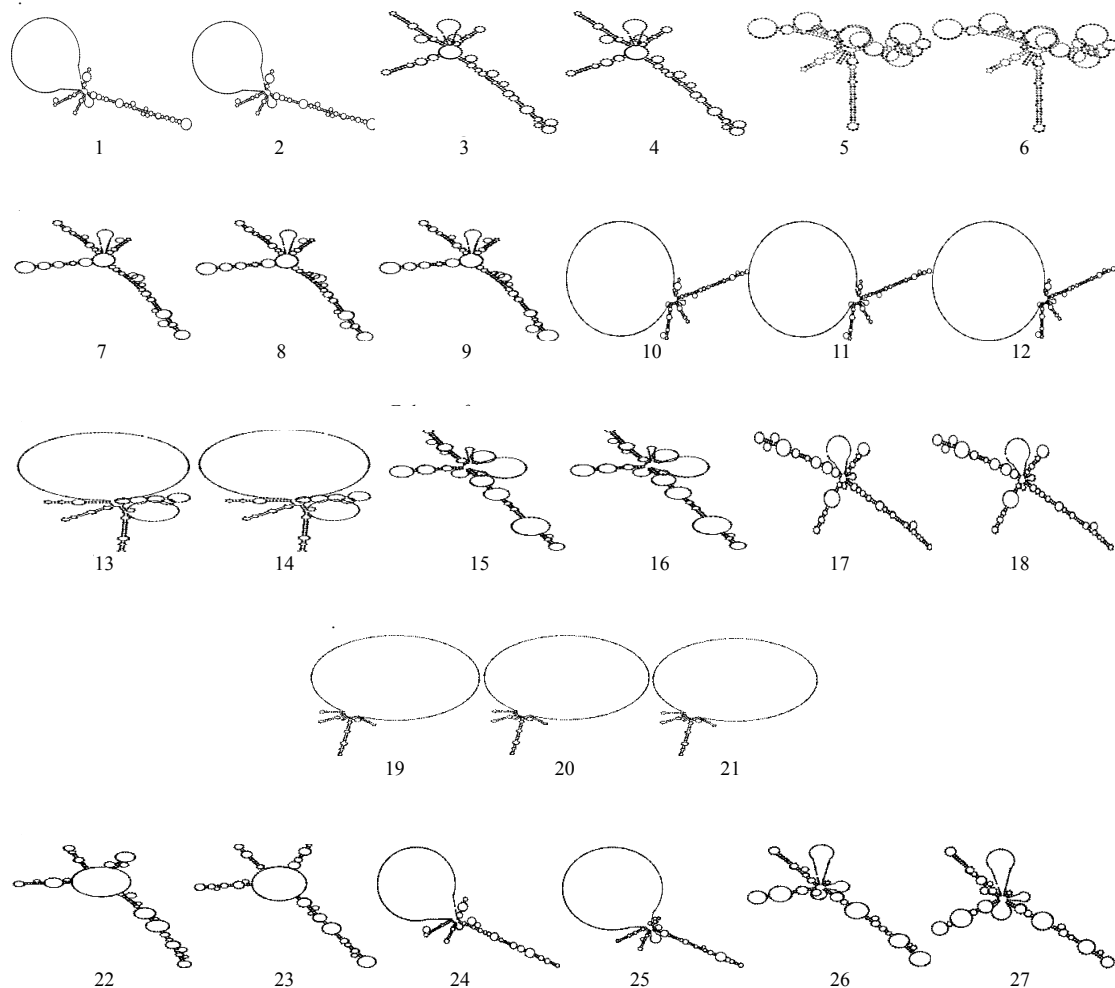
图 2 基于 ITS2 序列构建的 56 个样本的 NJ 树

Fig. 2 NJ Dendrogram of 56 species based on ITS2 sequences

种内 ITS2 二级结构时发现,红背桂、白背叶、大飞扬草、蓖麻、一品红、绿玉树、春峰、红雀珊瑚、麻风树的种内 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;红桑种内 2 样本 ITS2 二级结构差异主要表现在螺旋 I 区和螺旋 III 区,螺旋 II 区和螺旋 IV 区较保守;变叶木 2 样本 ITS2 二级结构在螺旋 IV 区较保守,

在螺旋 I 区、螺旋 II 区和螺旋 III 区均存在差异;龙骨 2 样本 ITS2 二级结构在螺旋 I 区、螺旋 II 区和螺旋 III 区较为保守,在螺旋 IV 区有较小差异。

在比较样本种间 ITS2 二级结构时发现,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。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。



1、2-红背桂 3、4-白背叶 5、6-大飞扬草 7~9-蓖麻 10~12-一品红 13、14-绿玉树 15、16-春峰 17、18-红雀珊瑚
19~21-麻风树 22、23-红桑 24、25-变叶木 26、27-龙骨
1, 2-*Excoecaria cochinchinensis* 3, 4-*Mallotus apelta* 5, 6-*Euphorbia hirta* 7-9-*Ricinus communis* 10-12-*Euphorbia pulcherrima*
13, 14-*Euphorbia tirucalli* 15, 16-*Euphorbia lactea f. cristata* 17, 18-*Pedilanthus tithymaloides* 19-21-*Jatropha carcas*
22, 23-*Acalypha wikesiana* 24, 25-*Codiaeum variegatum* 26, 27-*Euphorbia trigona*

图 3 ITS2 序列预测二级结构图

Fig. 3 Comparison on ITS2 secondary structure

3 讨论

DNA 条形码技术旨在建立一种准确、方便、快捷且对形态学分类技术要求不高的一种生物分类鉴定方法。这一技术方法的建立必须基于大量样本对 DNA 条形码鉴定能力的测定与评估。虽然近年来国

内外学者在这方面做了不少的工作,但样本的数量还远远不够。本研究通过海南地区基于形态学上的大戟科植物 25 个种 56 个样本评估 ITS2 序列作为 DNA 条形码对海南大戟科植物的鉴定能力。

本研究的结果显示变异位点与简约信息位点在

ITS2 序列中均占较高的比例,说明 ITS2 序列中存在大量的物种分类进化信息,因此,ITS2 序列适于对大戟科植物在种的水平上进行鉴定。在对种间的遗传距离进行分析时发现,较大种间变异距离值主要由叶下珠亚科与大戟科另外 3 个亚科之间产生,此结果揭示了叶下珠亚科与其他 3 个亚科之间在亲源关系上距离较远。

综合种内、种间的变异距离值、barcoding gap 分析、NJ 树构建及 ITS2 序列预测二级结构图分析等方法从多方面对 ITS2 条形码序列对海南大戟科植物鉴定能力进行了分析鉴定,结果均显示 ITS2 条形码序列对海南大戟科植物在种的水平上鉴定能力强,可作为 DNA 条形码序列对海南大戟科植物进行快速鉴定。另外,在 DNA 提取量少与完整性不好的情况下,ITS2 序列也能获得并扩增,且不影响鉴定效果。因此在利用 ITS2 条形码序列鉴定植物时,对实验室的条件及操作者要求均不高,从而有利于该技术的广泛推广与应用。

参考文献

- [1] 刘明生. 黎药学概论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [2] 钟捷东. 黎族医药 [M]. 海口: 海南出版社, 2008.
- [3] 曾 渝, 刘明生, 杨俊斌. 海南黎族医药亟待抢救发掘 [J]. 中国药业, 2006, 15(11): 18-19.
- [4] 吴征镒. 新华本草纲要第二册 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1991.
- [5] 吴征镒. 中国植被 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [6] 杨士雄, 郑 卓, 陈碧珊, 等. 大戟科现代植物花粉形态 [J]. 植物学报, 2013, 48(5): 550-560.
- [7] 薛恒钢, 周颂东, 何兴金, 等. 中国大戟属 13 种 15 个居群的核型报道 [J]. 植物分类学报, 2007, 45(5): 619-626.
- [8] 邹 智, 杨礼富, 安 锋, 等. 大戟科植物 MVK 基因家族的全基因组鉴定与分析 [J]. 西南林业大学学报, 2013, 33(4): 64-71.
- [9] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [10] 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(23): 8369-8374.
- [11] Pennisi E. Wanted: a barcode for plants [J]. *Science*, 2007, 318(5848): 190-191.
- [12] Sass C, Little D P, Stevenson D W, *et al.* DNA barcoding in the *Cycadales*: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of Cycads [J]. *PLoS One*, 2007, 2(11): e1154.
- [13] Lahaye R, vander Bank M, Bogarin D, *et al.* DNA Barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [14] Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A D, *et al.* Testing candidate Plant barcode regions in the Myristicaceae [J]. *Mol Ecol Res*, 2008, 8(3): 480-490.
- [15] Newmaster S G, Fazekas A J, Ragupathy S. DNA barcoding in landplants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach [J]. *Can J Bot*, 2006, 84(3): 335-341.
- [16] 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.
- [17] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 116-121.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 李 栎, 肖 憬, 苏振宇, 等. ITS2 条形码序列对茜草科黎药植物的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1814-1818.