

牛奶菜属植物及其近缘植物的 ITS2、rbcL 序列分析

张忠廉, 宋美芳, 李海涛, 管燕红, 牛迎凤, 张丽霞*

中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所云南分所, 西双版纳州傣药南药重点实验室, 云南 景洪 666100

摘要: 目的 分析 ITS2、rbcL 序列在牛奶菜属植物及其近缘植物间的鉴别能力, 并对牛奶菜属植物及其近缘植物的系统进化进行初步分析。方法 采用直接测序法测定所分析样品的 ITS2、rbcL 序列, 获得的序列采用软件 CodonCode Aligner 人工校正, Contig 软件拼接, 用 MEGA 4.0 软件分析比对并进行遗传距离等分析, 用 NJ 法对对比的序列构建系统分支树。结果 ITS2、rbcL 序列对牛奶菜属植物及其他所分析样品有较好的鉴别能力, 且鉴别能力 ITS2 优于 rbcL; 南山藤属、匙羹藤属植物与牛奶菜属植物间的亲缘关系非常相近。结论 条形码 ITS2、rbcL 序列能很好地区分牛奶菜属植物, 且鉴别能力 ITS2 优于 rbcL; 建议将南山藤属、匙羹藤属等小属植物归入牛奶菜属内。

关键词: 牛奶菜属; DNA 条形码; ITS2; rbcL; 南山藤属; 匙羹藤属

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)16-2300-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.021

ITS2 and rbcL sequence analysis on plants of *Marsdenia* R. Br. and its related species

ZHANG Zhong-lian, SONG Mei-fang, LI Hai-tao, GUAN Yan-hong, NIU Ying-feng, ZHANG Li-xia

Key Laboratory of Dai and Southern Medicine of Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture, Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China

Abstract: **Objective** To identify and preliminarily analyze the plants of *Marsdenia* R. Br. and its related species by ITS2 and rbcL sequences. **Methods** The ITS2 and rbcL regions were amplified and sequenced directly. The sequence was manually calibrated using CodonCode Aligner, and splited and jointed by Contig software. The genetic distance analysis was carried out by MEGA 4.0 and the phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-joining method. **Results** The samples analyzed were well identified by ITS2 and rbcL sequences, and the authentication ability of ITS2 was superior to rbcL. The genetic relationship among the plants of *Marsdenia* R. Br., *Dregea* E. Mey., and *Gymnema* R. Br. was very close. **Conclusion** ITS2 and rbcL sequences could distinguish *Marsdenia* R. Br. species very well, and the authentication ability of ITS2 is superior to rbcL. The preliminary studies suggest that the *Dregea* E. Mey. and *Gymnema* R. Br. should be classified into genus *Marsdenia* R. Br.

Key words: *Marsdenia* R. Br.; DNA barcoding; ITS2; rbcL; *Dregea* E. Mey.; *Gymnema* R. Br.

牛奶菜属 *Marsdenia* R. Br. 为萝藦科植物, 中国有 22 种 5 变种, 分布于我国华东、华中及西南各省区, 其中云南省境内分布有 16 种, 2 变种^[1]; 该属多种植物均有作为傣药及民间常用药的沿用历史, 具有清热解毒、止咳平喘、活血止血、祛风除湿、强壮筋骨等疗效, 现代药理学研究揭示该属植物具有多种药理活性, 包括抗肿瘤、抗生育、平喘、降压、活血、抗炎、镇痛、提高机体免疫等作用^[2]。因具有丰富的药理活性, 使得该属植物的临床应用日益增多, 国内外学者对其活性成分及药理作用机

制等方面的研究也在不断深入。

随着应用的不断增多、研究的不断深入, 如何建立一种准确、快速、简捷的牛奶菜属物种鉴定方法成为当前亟待解决的问题; 此外, 关于萝藦科牛奶菜族植物及其下属的组成及划分问题历来争议不断, 2000 年, Endress 等^[3]发表的萝藦科分类系统中, 牛奶菜族包括眼树莲属 *Dischidia* R. Br.、金凤藤属 *Dolichopetalum* Tsiang、纤冠藤属 *Gongronema* Decne 球兰属 *Hoya* R. Br.、牛奶菜属 *Marsdenia* R. Br.、扇叶藤属 *Micholitzia* N. E. Br.、夜来香属 *Tebsma* Coville

收稿日期: 2013-04-08

基金项目: 中国医学科学院药用植物研究所中央级公益性科研院所基本科研业务专项 (YZYN-09-04)

作者简介: 张忠廉 (1982—), 男, 助理研究员, 研究方向为热带药用植物资源及分子生物学研究。E-mail: zzl0605@163.com

*通信作者 张丽霞, 副研究员。E-mail: zlx0428@yahoo.com.cn

和荛蕨藤属 *Cosmostigma* Wight; 而 Forster^[4]建议将匙羹藤属 *Gymnema* R. Br.、黑蔓藤属 *Jasminanthes* Thou、南山藤属 *Dregea* E. Mey.、马兰藤属 *Dischidanthus* Tsiang、箭药藤属 *Bebstemma* Wallex Wight 等小属归并到牛奶菜属, 但《中国植物志》未采纳 Forster 的观点, 仍将匙羹藤属、黑蔓藤属、南山藤属、马兰藤属、箭药藤属保留为独立的属。

DNA 条形码技术是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来进行物种鉴定的新方法, 由加拿大分类学家 Paul Hebert 首次提出, 因其具有操作简便、可重复性强、结果稳定可靠等优点, 引起国际相关学者的广泛关注^[5-6]。ITS2 (internal transcribed spacers 2) 及编码核酮糖 1, 5-二磷酸羧化酶大亚基的 *rbcL* 序列作为 DNA 条形

码序列, 因其分辨率高、易于扩增等特点, 现已广泛应用于植物界物种鉴定及不同分类阶元的分子系统学研究^[7-10]。本研究旨在通过比较牛奶菜属植物及其近缘植物的 ITS2 及 *rbcL* 序列, 分析二者对牛奶菜属及其近缘植物的鉴别能力, 构建分子系统进化树, 并进一步探讨牛奶菜属及其近缘属植物间的亲缘关系, 为该属植物的准确划分奠定理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验所用的 21 份材料均野外采集后经本单位李海涛副研究员鉴定, 收集当年生新鲜嫩叶, 经变色硅胶快速干燥后带回实验室内-20 ℃低温保存, 备用。具体材料中文名、拉丁名及缩写代码见表 1。

表 1 供试材料名称及缩写代码

Table 1 Names of samples used for test and their abbreviation code

中文名	缩写	拉丁名	中文名	缩写	拉丁名
大叶牛奶菜	DYNNC	<i>Marsdenia koi</i>	裂冠牛奶菜	LGNNC	<i>M. incisa</i>
通光散	TGS	<i>M. tenacissima</i>	球花牛奶菜	QHNNC1	<i>M. globifera</i>
云南牛奶菜	YNNNC	<i>M. balansae</i>	大百解	DBJ1	<i>M. griffithii</i>
蓝叶藤	LYT	<i>M. griffithii</i>	大百解	DBJ2	<i>M. griffithii</i>
圆头牛奶菜	YTNNC	<i>M. tsaiana</i>	海枫屯	HFT	<i>M. officinalis</i>
球花牛奶菜	QHNNC2	<i>M. officinalis</i>	球花牛奶菜	QHNNC3	<i>M. officinalis</i>
翅果藤	CGT	<i>Myriopteron extensum</i>	马连鞍	MLA	<i>Streptocaulon griffithii</i>
华萝藦	HLM	<i>Metaplexis hemsleyana</i>	南山藤	NST	<i>Dregea volubilis</i>
古钩藤	GGT	<i>Cryptolepis buchananii</i>	牛角瓜	NJG	<i>C. gigantea</i>
白花牛角瓜	BHNJG	<i>Calotropis procera</i>	大叶匙羹藤	DYSGT	<i>Gymnema tingens</i>
大花藤	DHT	<i>Raphistemma pulchellum</i>			

1.2 仪器与试剂

DNA 提取试剂盒, Tiangen (DP305); 引物, 上海生工生物技术有限公司合成; rTaq DNA 聚合酶 (大连宝生物工程有限公司, DR001B) 包括: TaKaRa TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL), 10×缓冲液 (Mg²⁺ free), dNTP mixture (各 2.5 mmol/L), MgCl₂ (25 mmol/L); Marker, 北京鼎国生物技术有限公司 (B031); 其他试剂均为分析纯。

扩增仪 (Biometra Professional Standard), 电泳仪 (Biometra 公司), 凝胶成像系统 (Uvitec 公司)。

2 方法

2.1 样品 DNA 的提取、PCR 扩增及测序

供试材料经灭菌水清洗后晒干, 将嫩叶剪成碎块状后经液氮迅速充分研磨, 按照 DNA 快速提取

试剂盒所提供方法提取基因组 DNA。所提 DNA 样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经适当稀释后-20 ℃保存备用。扩增 ITS2 序列所用引物, 正向为 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', 反向为 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'; 扩增 *rbcL* 序列所用引物正向为 5'-ATGTCACCACAAACAG-AAAC-3', 反向为 5'-TCGCATGTACCTGCAGTAGC-3'。PCR 反应体系为 20 μL: 2 μL 10×PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 U Taq 酶, 上游和下游引物各 0.5 μmol/L, 模板 10~50 ng。扩增程序为 94 ℃预变性 4 min, 94 ℃变性 45 s, 50 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环, 最后延伸 10 min; PCR 产物经 PCR 清洁试剂盒 (AXYGEN) 纯化后, 送由上海英俊生物科

技有限公司进行正反测序, 测序产物同 PCR 扩增引物。

2.2 数据处理

获得的序列采用软件 CodonCode Aligner (CodonCode Co, USA) 进行人工校正, 去除低质量序列及引物区, contig 软件拼接, 对于 ITS2 序列, 拼接得到一致序列后使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8 S 和 26 S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[11], 应用 Clustal X 软件进行序列比对, 用 MEGA 4.0 软件分析比对并进行遗传距离等分析, 用 NJ 法对比对的序列构建系统分枝树, 用靴带分析 (bootstrap analysis, 1 000 replicates) 检验简约树中各分支的支持率。

3 结果与分析

3.1 序列信息、PCR 扩增效率和测序成功率

本次所用通用引物在所有分析样品中显示出很好的通用性。ITS2 序列分析及 rbcL 序列分析中, PCR 效率均为 100%, 测序效率 ITS-2 为 90.5% (样品 TGS、YNNNC 因聚核酸位点导致直接测序失败, 后采用载体克隆测序成功), rbcL 为 100%; ITS2 序列分析表明, 序列最长的为 YNNNC (259 bp), 最短的为 MLA (220 bp), ITS2 比对后序列长度为 284 bp, 变异位点为 148 bp (67.15%), 其中多态性信息位点为 90 bp (46.93%), G+C 量为 52.1%~73%, 碱基转换 (transition) 数为 26, 置换 (transversion) 数为 24, 二者比值为 1.1; rbcL 序列分析表明, 所有样品的序列长度较一致, (702~708 bp), 最短的为 DYSGT, rbcL 比对后序列长度为 710 bp, 变异位点为 52 bp (7.32%), 其中多态性信息位点为 37 bp (5.21%), 变异系数较 ITS2 片段低很多, G+C 量为 42.9%~44.8%, 碱基转换数为 8, 置换数为 5, 二者比值为 1.6。

3.2 牛奶菜属植物亲缘关系分析及 NJ 树鉴定

ITS2 及 rbcL 序列分析均表明, 所分析牛奶菜属样品中, 种间亲缘关系最近的为通光散与大百解, 亲缘关系最远的大叶牛奶菜与通光散, 不同的是 2 种分析方法所显示的最大、最小遗传距离不同, ITS2 序列分析显示的种间最大、最小遗传距离分别为 0.134、0.040, 而 rbcL 序列分析显示的最大、最小遗传距离分别为 0.018、0.001。由此可知, ITS2 序列分析方法与 rbcL 序列分析方法相比较, 鉴别能力较强。

利用 MEGA 4.0 软件构建的 NJ 系统树见图 1、

图 2, 两种分析方法所得 NJ 系统树大体分为 3 大支, 后又分为数个小分支。虽 2 种方法所得系统树在个别细小分支及各分支支持率上有所差别, 但总体来说, 2 种分析方法所得系统树大体相同, 说明所得分析结果准确度较高, 且所分析样品均处于不同分支, 均能被很好的鉴别开来。而 2 系统树在细节处所展现出的个别差异及各细小分支支持率的不同, 恰能说明 2 种分析方法在物种鉴别方面所展现出的能力差异。如同为球花牛奶菜物种的不同样品, 基于 rbcL 序列构建的系统树显示三者完全相同, 而基于 ITS2 序列构建的 NJ 系统树却能很好地显示出三者的差异, 且支持率很高 (分别为 99、93), 进一步证明 ITS2 序列分析方法鉴别能力较高。

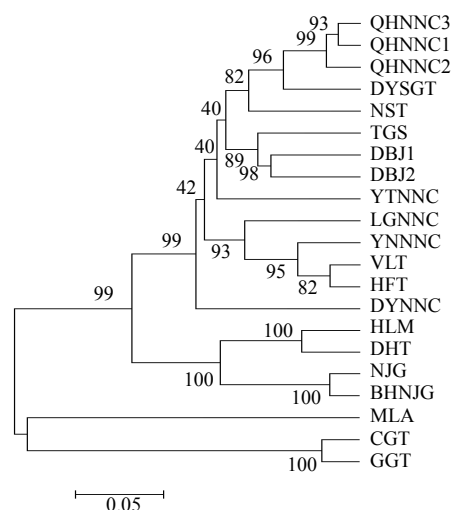


图 1 基于 ITS2 序列构建的 NJ 系统树
Fig. 1 NJ tree based on ITS2 sequences

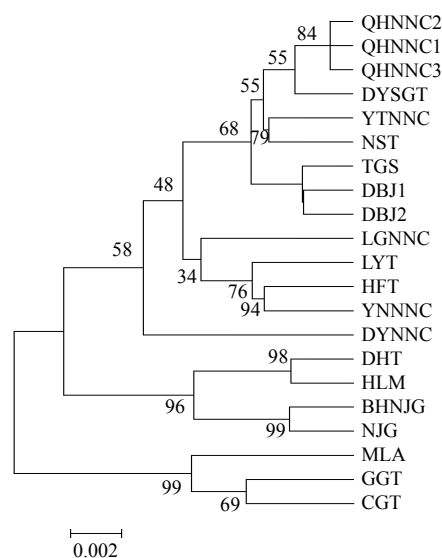


图 2 基于 rbcL 序列构建的 NJ 系统树
Fig. 2 NJ tree based on rbcL sequences

3.3 牛奶菜属植物及其近缘植物的系统进化分析

利用 ITS2 及 *rbcL* 序列构建的 NJ 系统树,大体可分为 3 支,1 支由古钩藤、翅果藤及马莲鞍组成,三者同为杠柳亚科植物;第 2 支包括牛角瓜属的牛角瓜及白花牛角瓜、萝藦属的华萝藦以及大花藤属的大花藤,4 份样品同属于马利筋族;第 3 支除包括所有牛奶菜属样品外,还包括南山藤属的南山藤、匙羹藤属的大叶匙羹藤,且 2 份样品与牛奶菜属植物间的亲缘关系非常相近,甚至其与个别牛奶菜属植物的亲缘关系小于牛奶菜属种间亲缘关系,如南山藤与圆头牛奶菜、大叶匙羹藤与球花牛奶菜,充分说明此 2 属植物与牛奶菜属植物间亲缘关系很近。

4 讨论

随着科技的进步、社会的发展,人们对中草药及传统药物的重视程度越来越高,应用范围及使用频率也日益增多,但随之而来的问题就是药物应用的安全性及准确性。多种牛奶菜属植物因其良好的临床疗效在民间应用广泛,如何能够快速、准确地鉴别牛奶菜属植物及其近缘植物已成为亟待解决的问题。本研究利用 ITS2 及 *rbcL* 序列作为分析手段,试图区分牛奶菜属植物及其近缘植物,从而为牛奶菜属植物及其近缘植物的分类及鉴别提供依据。研究证明,利用此 2 种序列能很好地区分出所分析物种,且论鉴别能力,ITS2 序列优于 *rbcL* 序列。

此外,本研究利用 ITS2 及 *rbcL* 序列对所分析物种构建的 NJ 系统树显示,南山藤属、匙羹藤属植物与牛奶菜属植物间具有很好的亲缘关系,个别物种的属间亲缘关系比牛奶菜属植物种内亲缘关系更近。而早在 1995 年,Forster 就建议将匙羹藤属 *Gymnema* R. Br.、黑蔓藤属 *Jasminanthes* Thou.、南山藤属 *Dregea* E. Mey.、马兰藤属 *Dischidanthus* Tsiang、箭药藤属 *Bebstemma* Wallex Wight 等小属归并到牛奶菜属内,但《中国植物志》一直未采纳,

仍按原系统分类法分类。虽本研究所分析样品数量较少,初步研究结果推荐采纳 Forster 所提建议,但仍需收集大量样品做进一步分析之后才能做出准确判断。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 63 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [2] 曹巧巧, 张如松. 牛奶菜属植物化学成分和药理作用研究概况 [J]. 中国现代药物应用, 2008, 1(2): 1-5.
- [3] Endress M E, Bruyns P V. A revised classification of the *Apocynaceae*. I [J]. *Bot Rev*, 2000, 66(1): 1-56.
- [4] Forster P I. Circumscription of *Marsdenia* (Asclepiadaceae: Marsdenieae), with a revision of the genus in Australia and Papuasia [J]. *Austral Syst Bot*, 1995, 8: 703-933.
- [5] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identification through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003a, 270: 313-321.
- [6] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): e312.
- [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(1): e8613.
- [8] Coleman A W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons [J]. *Trends Genet*, 2003, 19: 370-375.
- [9] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12794-12797.
- [10] Kellogg E A, Juliano N D. The structure and function of Rubisco and their implication for systematic studies [J]. *Am J Bot*, 1997, 84: 413-428.
- [11] Wolf M, Achtziger M, Schultz J, et al. Homology modeling revealed more than 20, 000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structure [J]. *RNA*, 2005, 11: 1616-1623.