

DNA 条形码技术鉴定贝母属植物

俞超, 梁孝祺, 陈金金, 盛梦俊, 冯亚斌, 王忠华*

浙江万里学院 生物技术研究, 浙江 宁波 315100

摘要: 目的 采用 DNA 条形码技术, 比较了条形码序列 ITS1 和 ITS2 在贝母属植物中的鉴定效果。方法 从 8 个贝母属 21 个样品中提取了基因组 DNA, 进行 ITS1、ITS2 序列的 PCR 扩增和测序, 并比较了各样品 DNA 提取率、PCR 扩增率及测序成功率。测序数据采用 BLAST 搜索法评价 2 种序列的鉴定能力, 采用 SPSS 软件进行遗传距离分析, 采用 MEGA 软件进行系统发育树的构建。结果 对比不同物种 ITS1、ITS2 序列的一级结构差异, 发现其 ITS1 序列长度为 205~229 bp, 有信息位点 27 个(所占比例 11.8%), 鉴定成功率为 72.2%; ITS2 序列长度为 236~244 bp, 有信息位点 20 个(所占比例 8.2%), 鉴定成功率为 100%。ITS1 序列的种内及种间遗传距离分别为 0.001 8 和 0.066 1, 而 ITS2 序列的种内及种间遗传距离分别为 0.000 5 和 0.046 8, 且种内高度保守; 系统发育树构建结果显示, 2 种 ITS 序列能准确区分出浙贝母类群、川贝母类群和北方贝母类群, 而 ITS2 序列所构建的系统发育树准确度更高。结论 ITS2 序列能够更准确鉴定不同物种贝母, 适合作为贝母属植物的通用条形码序列。

关键词: 贝母属; ITS1; 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(2014)11-1613-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.021

Identification of plants in *Fritillariae* L. by DNA barcoding technology

YU Chao, LIANG Xiao-qi, CHEN Jin-jin, SHENG Meng-jun, FENG Ya-bin, WANG Zhong-hua

Institute of Biotechnology, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

Abstract: Objective DNA barcoding technology was employed to compare the identification efficiency of ITS1 and ITS2 sequences in plants of *Fritillariae* L. **Methods** Twenty-one samples from eight species of *Fritillariae* L. were collected. Genomic DNAs from these samples were extracted, ITS1 and ITS2 sequences were amplified by PCR, and the PCR products were sequenced. The DNA extraction rate, PCR amplification rate, and sequencing achievement ratio were compared. The identification efficiency of two sequences was evaluated by BLAST-Search, the distribution of genetic distance was analyzed by SPSS software, and the phylogenetic trees were constructed by MEGA software. **Results** Comparing the primary structures of ITS1 and ITS2 sequences amplified from different species, the results showed that the sequence length of IT1 was 205—229, informative sites were 27 and occupied 11.8%, and the identification achievement rate was 72.2%; The sequence length of IT2 was 236—244, informative sites were 20 and occupied 8.2%, and the identification achievement rate was 100%. Intra-specific and inter-specific genetic distances of ITS1 were 0.001 8 and 0.066 1, and those of ITS2 were 0.000 5 and 0.046 8, respectively; The results also showed that ITS2 was relatively conservative in intra-species; The NJ phylogenetic trees showed that these two sequences could accurately identify *Fritillaria thunbergii*, *F. cirrhosa*, and north-*Fritillaria*, but phylogenetic trees based on ITS2 had a higher degree of accuracy. **Conclusion** ITS2 sequence is optimal as barcoding sequence for *Fritillaria* L. genus and is more suitable for identifying the different species of *Fritillaria* L.

Key words: *Fritillaria* L.; ITS1; ITS2; DNA barcoding; molecular; identification

浙贝母是中国传统中药之一, 原产地为宁波象山, 现产地主要为鄞州、磐安、南通、东阳等地, 是著名的“浙八味”之一, 具有清热散结、化痰止咳的功效, 主治痰火咳嗽、肺病、乳痈、

疮毒、瘰癧等^[1], 在祛痰^[2]、平喘和镇咳^[3]上的效果显著, 以及在抗肿瘤^[4]及逆转多药耐药方面^[5]作用明显。

贝母属植物部分类群的特征性状相似性高, 如

收稿日期: 2013-10-22

基金项目: 浙江省中药材育种专项资助(2012C12912); 宁波市科技局择优委托项目资助(2012C10036); 浙江万里学院重中之重学科自设课题项目资助(ZS2013006)

作者简介: 俞超(1979—), 女, 讲师, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: 32897949@qq.com

*通信作者 王忠华 E-mail: wang1972@zwu.edu.cn

浙贝母与其近缘品种湖北贝母、东贝母性状相似性高,川贝母与米贝母、砂贝母、太白贝母等相似性较高,且市场流动的贝母多为干燥鳞茎切片,给药用植物的鉴定带来了困难,导致药材品质不一^[6]。近年来遗传物质多样性的鉴别方法技术十分热门,包括 RAPD、AFLP、ISSR 等分子标记方面的研究,都为浙贝母及其贝母属其他植物的物种鉴定提供了可行的方法^[7-8]。

DNA 条形码技术是一种建立在 PCR 技术及 DNA 测序技术基础之上的新型分子鉴定技术,它利用基因组中一段通用的标准短序列进行物种鉴定及种间亲缘关系的分析^[9-12]。动物 DNA 条形码的研究已经趋向成熟^[13],而在植物界,还未能找到一个能覆盖所有植物,具有高度通用性和高鉴定能力的 DNA 序列^[14-15]。但已有研究发现,ITS 区间在种间的变异距离较大^[16],是潜在的优秀 DNA 条形码候选序列^[17-18]。

本实验通过 DNA 条形码技术,利用 ITS1 和 ITS2 序列对包括浙贝母在内的贝母属主要物种进

行物种鉴定及聚类关系分析,评价其鉴定效果。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验的 8 种贝母属植物分别为浙贝母 *F. thunbergii* Miq.、暗紫贝母 *F. unibracteata* Hsiao.、卷叶贝母 *F. cirrhosa* D. Don.、梭砂贝母 *F. delavayi* Franch.、湖北贝母 *F. hupehensis* Hsiao.、伊贝母 *F. pallidiflorae*、东贝母 *F. thunbergii* Miq. Var. *Chekiangensis*、平贝母 *F. ussuriensis* Maxim., 其中浙贝母包括 5 个主要栽培品种(多子、狭叶、宽叶、三子、轮叶)及 5 个变种(变种 A、变种 B、变种 C、变种 D、变种 E)共 21 份样品,样品信息及来源见表 1。其中样品 P01~P11 采集地为宁波市章水镇养殖基地;样品 P12 采集地为江苏南通市养殖区;样品 P13 采集地为象山县下峙后村养殖地;样品 P14、P15 为磐安县新渥镇种植基地采集,其余样品均由宁波中药制药有限公司提供。上述样品均由浙江省中药研究所沈晓霞高级工程师鉴定。

表 1 贝母样品信息及其来源

Table 1 Samples information and sources

编号	种 名	性 质	产 地	编号	种 名	性 质	产 地
P01	浙贝母(多子)	叶片鲜品	浙江省宁波市章水镇	P12	浙贝母(狭叶)	鳞茎鲜品	江苏省南通市
P02	浙贝母(狭叶)	叶片鲜品		P13	浙贝母(狭叶)	鳞茎鲜品	浙江省宁波市象山县
P03	浙贝母(宽叶)	叶片鲜品		P14	浙贝母(狭叶)	鳞茎干片	浙江省金华市磐安县
P04	浙贝母(三子)	叶片鲜品		P15	东贝母	鳞茎鲜品	
P05	浙贝母(轮叶)	叶片鲜品		S01	暗紫贝母	鳞茎干品	四川省甘孜州东部
P06	浙贝母(变种 A)	叶片鲜品		S02	卷叶贝母	鳞茎干品	
P07	浙贝母(变种 B)	叶片鲜品		S03	梭砂贝母	鳞茎干品	
P08	浙贝母(变种 C)	叶片鲜品		S04	伊贝母	鳞茎干品	新疆省伊犁哈萨克自治州
P09	浙贝母(变种 D)	叶片鲜品		S05	湖北贝母	鳞茎鲜品	湖北省宜昌市五峰县
P10	浙贝母(变种 E)	叶片鲜品		S06	平贝母	鳞茎干品	黑龙江五常
P11	浙贝母(狭叶)	鳞茎鲜品					

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、PCR 扩增及测序 浙贝母新鲜鳞茎切片后,置于洗净灭菌的塑料方盒中,编号,65 ℃烘干 3~5 h。称取新鲜叶片 200~300 mg,加入适量液氮充分研磨;称取烘干的鳞茎样品 80~100 mg,直接研磨成粉末;所有浙贝母叶片和鳞茎样品使用北京康为世纪公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。在凝胶成像仪下观察拍照并筛选出提取效果较好的样品用于下一步的 PCR 扩增。

PCR 反应体积为 30 μL,体系内包含:ddH₂O 17 μL、2×Taq mastermix 10 μL、DNA 模板 1 μL、正向引物 1 μL、反向引物 1 μL。ITS1 序列正向引物为 5'-AAGGATCATTGTCGAGAACCG-3',反向引物为 5'-TTGCGTTCATAGACTCGATGG-3';ITS2 序列正向引物为 5'-GCATCGATGAAGAACGCAG-C-3',反向引物为 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

将反应体系中的所有成分准确移取至 PCR 管中并充分混匀后放入 PCR 仪中。扩增程序:ITS1 为 94 ℃变性 10 min,再进行 35 个循环(94 ℃变

性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s), 最后 72 °C 延伸 10 min。ITS2 为 94 °C 变性 10 min, 再进行 35 个循环 (94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s), 最后 72 °C 延伸 10 min。

选择 PCR 扩增成功的 DNA 样品交由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序。

1.2.2 数据处理 为了更准确地评价 ITS 序列的鉴定能力, 从 GeneBank 中下载了 12 种其他贝母属序列, 见表 2。并运用各种基础软件及生物技术软件对 DNA 测序结果进行分析, 其主要分析步骤及所用软件见表 3。除了 PC 端的软件外, 还利用 BLAST 在线搜索页面 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) 对测序结果进行初步搜

表 2 12 种其他贝母属序列信息

Table 2 Sequence information of 12 species of *Fritillaria* L. downloaded from GeneBank

编号	种名	GeneBank
Q01	甘肃贝母 <i>F. przewalskii</i>	GQ205115.1
Q02	暗紫贝母变种 <i>F. unibracteata</i> var. <i>longinectarea</i>	GQ205119.1
Q03	太白贝母 <i>F. taipaiensis</i>	HM045470.1
Q04	瓦布贝母 <i>F. wabuensis</i>	GQ205131.1
Q05	轮叶贝母 <i>F. maximoviczii</i>	HM045471.1
Q06	阿尔泰贝母 <i>F. meleagris</i>	AY616730.1
Q07	滩贝母 <i>F. karelini</i>	AY616727.1
Q08	黑百合 <i>F. camtschatcensis</i>	AY616714.1
Q09	大金贝母 <i>F. dajinensis</i>	GQ205114.1
Q10	厚叶贝母 <i>F. crassifolia</i>	AY616717.1
Q11	细叶百合 <i>L. pumilum</i>	AF088194.1
Q12	土贝母 <i>Bolbostemma paniculatum</i>	FJ980305.1

表 3 数据处理及软件

Table 3 Data processing and software

分析步骤	软件	文献
引物设计	Primer Premier	19
测序峰图查看、序列文本提取	Chromatogram 2.3	19
多序列对比、修剪	ClustaW 2	19
突变位点、保守位点统计	MEGA 4.0	20
遗传距离矩阵、转换/颠换计算	MEGA 4.0	20
系统发育树构建	MEGA 4.0	19-20
遗传分布、平均遗传分布计算	Matlab	21

索, 确认测序准确性。在序列信息分析步骤, 运用 SMS 网站的在线 DNA 和蛋白质序列处理工具 (http://www.91bio.com/SMS2/dna_stats.html), 对各个序列的碱基组成、G+C 量进行计算。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取、PCR 扩增及测序

本实验对 10 份叶片样品, 6 份鳞茎干品和 5 份鳞茎鲜品提取了总 DNA, 电泳鉴定结果见图 1, DNA 长度在 15 000 bp 左右, 与预期片段大小相符。挑选出条带较完整清晰的 DNA 样品, 进行 ITS1、ITS2 序列的 PCR 扩增, ITS1 和 ITS2 序列扩增后的片段长度分别为 400 bp 和 350 bp 左右, 部分样品的 PCR 产物电泳图见图 2。整理 PCR 扩增成功的 DNA 样品交由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序。

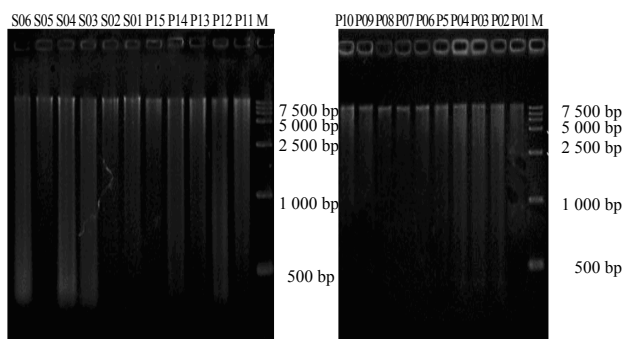


图 1 样品 DNA 提取产物电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of DNA extracted from some samples

2.2 ITS 序列信息

对测序所得序列进行修剪, ITS2 序列去除两端 5.8 S 和 26 S 区段, ITS1 序列去除两端 18 S 和 5.8 S 区段, 获得 ITS1、ITS2 间隔区序列。其中 ITS1 序列的片段长度在 205~229 bp, ITS2 序列的片段长度在 237~244 bp。选取本实验材料中的 8 个不同种贝母 (P14、P15、S01、S02、S03、S04、S05、S06) 加上 12 条网上下下载的贝母序列, 计算保守位点、信息位点、突变位点及转换/颠换值, 通过 Blast1 搜索法计算序列的鉴定效率, 计算结果见表 4, 通过 MEGA 的 Sequence Data Explorer 功能比对序列信息见图 3。

2.3 遗传距离分析

通过 MEGA 软件分别计算 ITS1、ITS2 序列种内 (浙贝母) 及种间 (贝母属不同物种) 的遗传距离, 基于 Kimura 2-parameter (K2-P) 距离模型, 建立种内及种间遗传距离矩阵^[19]。通过 Overall mean distance 算法, 计算出 ITS1 序列的种内及种间平均

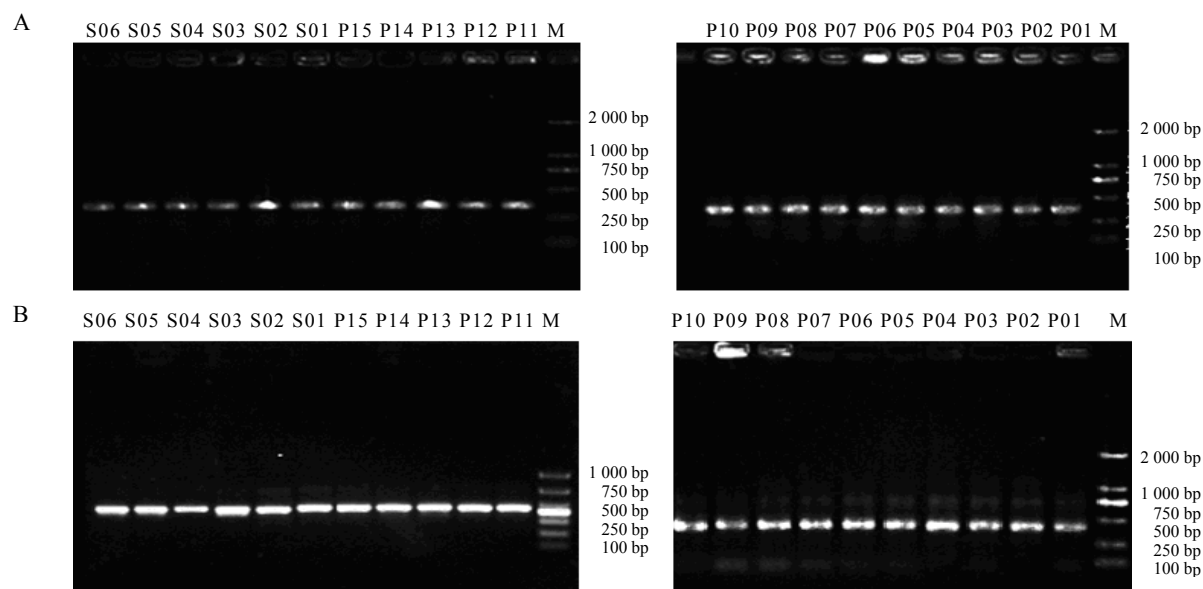


图2 样品中 ITS1 (A) 和 ITS2 (B) 序列的 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of PCR products from samples ITS1 (A) and ITS2 (B)

表4 ITS1 和 ITS2 序列基本信息

Table 4 Main information of ITS1 and ITS2 sequences

序列	全长 / bp	G+C 量 / %	保守位点	变异位点	信息位点	转换/颠换	鉴定效率 / %
ITS1	205~229	67.22	154	75	27	5.373	72.2
ITS2	236~244	69.25	192	51	20	3.802	100

遗传距离分别为 0.001 8 和 0.066 1, 而 ITS2 序列的种内及种间平均遗传距离分别为 0.000 5 和 0.046 8。

再利用 Matlab 软件结合遗传距离矩阵的数据, 计算 ITS1、ITS2 序列在种内及种间的遗传距离分布, 生成遗传距离分布柱状图, 该柱状图代表了条形码序列两两对比的遗传距离在各距离范围内所占的比值, 体现了该 DNA 条形码序列在不同物种中遗传距离的分散度和在同一物种中的稳定度。

从 ITS1、ITS2 序列遗传距离分布图可见 (图 4), ITS1 序列的种内与种间变异分布重叠度较高, 其种内各样品遗传距离在 0~0.02 的序列占比高达 18.75%, 种间则为 21.57%, 表明 ITS1 序列在种内的稳定性不高, 重叠度较高, 影响鉴定效果。使得种间遗传距离在 0.10~0.18 内均有分布。ITS2 的遗传距离高峰集中在 0.04~0.08, 种内种间遗传距离分布重叠度较低。ITS2 序列种内高度保守, 变异序列仅占 6.25%。ITS1 序列过大的遗传距离可能使其聚类分析结果远离同属物种而接近近缘属物种, 而 ITS2 序列更为保守稳定, 更适合作为条形码序列。

2.4 系统发育树建立

选取本实验材料中的 8 个不同种贝母 (P14、P15、S01、S02、S03、S04、S05、S06) 与种内发生变异的浙贝母序列 (P03、P07、P10), 加上 12 条网下载下载的贝母序列, 运用 MEGA 4.0 软件, 基于 K2-P 距离模型进行 ITS1、ITS2 序列的 NJ 树构建, 并进行 Bootstrap consensus tree 显著性筛选^[20]。结果见图 5。

对比 ITS1 序列与 ITS2 序列所构建的 NJ 树, 发现 ITS1 序列在浙贝母中的遗传稳定性较差, 样品 P03、P07、P10 均有一定程度变异, 其亲缘关系接近于 P15, 且 ITS1 系统发育树中, 浙贝母类群被划分为川贝母类群的一个分支, 而川贝母类群中的 S03 和甘肃贝母 (GQ205115.1)、S01 和大金贝母 (GQ205114.1) 等均由于序列无差异而难以被区分。ITS2 序列构建的聚类直观图, 在区分北方贝母类群、川贝母类群、浙贝母类群的效果明显, 区分度和准确度高, 不同贝母类群的变异速度较均匀。但是无论是 ITS1 序列还是 ITS2 序列, 都难以区分主产于新疆地区的阿尔泰贝母、伊贝母等和主产于东

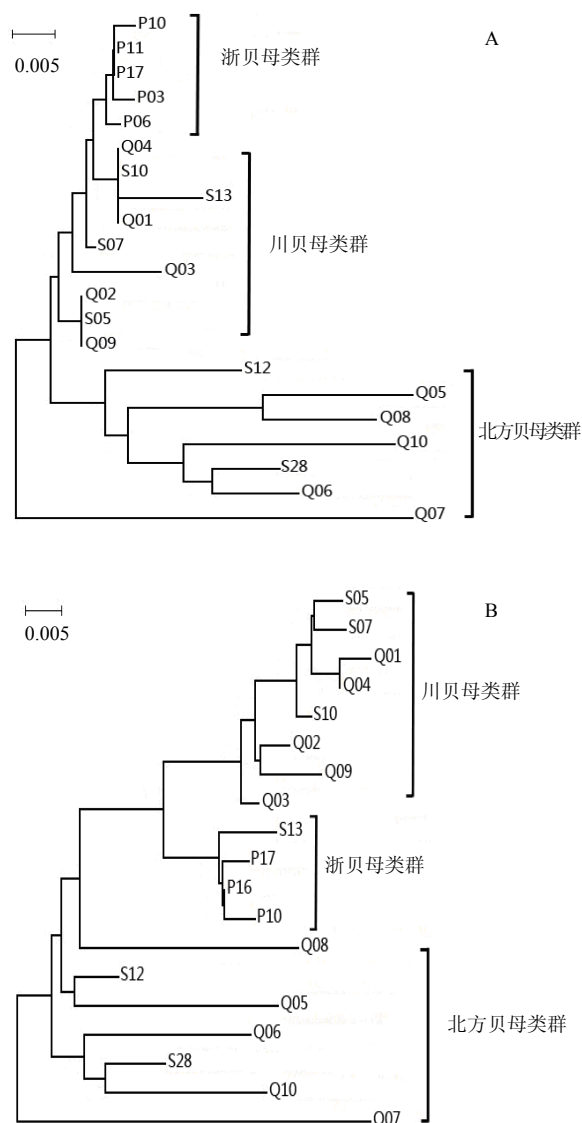


图5 基于ITS1 (A) 和 ITS2 (B) 序列构建的NJ树

Fig. 5 NJ tree based on ITS1 (A) and ITS2 (B) sequences

3.2 ITS1 与 ITS2 的鉴定效果对比

本实验中,单一片段的鉴定能力中以ITS2的鉴定效率最高,为100%;ITS1序列在区分属内近缘物种的能力较差,模糊鉴定率高达27.8%。在早期的研究中已发现,ITS2序列在物种水平上的遗传稳定性高、种间差异稳定、对近缘物种的区分度高,在物种鉴定上的综合能力高于ITS1序列,在柑橘属^[20]、木兰属^[23]、鸟足兰属^[23]等均达到鉴定成功率在90%以上;在蔷薇科^[24]、豆科^[26]、菊科^[27]等较为庞大的科系中,鉴定效率有所下降,如菊科的鉴定效率仅为76%。即使如此,也远高于其他条形码候选序列的鉴定效果。

3.3 系统发育树的构建与物种聚类情况分析

结合不同贝母在地理分布、形态特征上的差异,

并通过系统发育树对贝母属不同物种的聚类能力进行对比,认为ITS2构建的NJ树、ITS1与ITS2组合序列构建的NJ树对参与实验物种的聚类情况分析准确度最高,能在一定程度上准确判断不同地理位置、形态特征的贝母种的遗传距离,区分浙贝母类群、川贝母类群、北方高纬度地区贝母类群3个中国贝母主要类群。但是对于新疆地区贝母和东北地区的贝母无明显区分能力。

本实验的聚类结果与4种浙贝母与其他品种贝母的RAPD分析结果^[28]相一致,伊贝母区别于南方贝母类群,而南方贝母类群分成了川贝母系与浙贝母系。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 汪丽燕, 韩传环. 皖贝、川贝和浙贝止咳化痰的药理作用比较 [J]. 安徽医学, 1993, 14(3): 57-58.
- [3] 李 萍. 鄂贝定碱的镇咳作用研究 [J]. 中草药, 1993, 24(9): 475-477.
- [4] 谢艳华, 孙纪元, 王四旺, 等. 二贝母胶囊抑瘤作用 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(16): 1463-1465.
- [5] 胡凯文, 郑洪霞. 浙贝母碱逆转白血病细胞多药耐药性的研究 [J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(12): 650.
- [6] 丁丽娟. 川贝母及其常见伪品鉴别 [J]. 成都中医药大学学报, 2009, 32(2): 83-84.
- [7] Wang L Q, Dai X Z, Li X F. Genetic Diversity of Velvetleaf Germplasm by RAPD and ISSR Markers [J]. *J Plant Gen Resour*, 2009(1): 126-132.
- [8] Powell W, Morgante M, Andre C. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. *Mol Breeding*, 1996, 2(3): 225-238.
- [9] 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.
- [10] 石召华, 陈士林, 姚 辉, 等. 娑罗子基原物种的DNA条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2013, 44(18): 2593-2599.
- [11] Casiraghi M, Labra M, Ferri E, et al. DNA barcoding: a six-question tour [J]. *Brief Biginform*, 2010, 11(4): 440-453.
- [12] 孙稚颖, 陈士林, 姚 辉, 等. 基于ITS2序列的羌活及其混伪品的DNA条形码鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 568-571.
- [13] Alex Smith M, Wood M, Janzen D H. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (*Diptera*, *Tachinidae*) are not all generalists [J]. *Cur Issue*, 2007, 104(12): 4967-4972.

- [14] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1-12.
- [15] Pettengill J B, Neel M C. An evaluation of candidate plant DNA barcodes and [J]. *Am J Bot*, 2010, 97(8): 1391-1406.
- [16] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al*. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification [J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 165-170.
- [17] Chiou S J, Yen J H, Fang C L, *et al*. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers [J]. *Planta Med*, 2007, 73(13): 1421-1426.
- [18] Hollingsworth P M, Graham S W, Little D P. Choosing and Using a Plant DNA Barcode [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19254.
- [19] 陈士林. 中药 DNA 条形码: 分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [20] 于杰. 柑橘及其近缘属植物 DNA 条形码研制及其物种的鉴定研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [21] Lahaye R, Bank M V D, Bogarin D. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *PNAS*, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [22] 唐进, 汪发纛. 中国植物志 (第14卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [23] 罗焜, 陈士林, 陈科力. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(4): 342-358.
- [24] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al*. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae [J]. *Planta Med*, 2010, 76: 1784-1786.
- [25] 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.
- [26] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al*. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 324-331.
- [27] 陆含, 朱世华, 周书记. 浙贝母 4 品种及 5 种贝母遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 宁波大学学报: 理工版, 2009, 22(1): 44-47.