

• 药材与资源 •

基于 DNA 条形码的龙葵系统发育及变异位点分析

高 飞^{1,2}, 李彤彤¹, 汤玲平¹, 王向军^{1,2}, 林莉燕¹, 钱永常^{1,2*}

1. 浙江农林大学中药学院, 浙江 临安 311300

2. 浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300

摘要: 目的 对来自主要龙葵产区龙葵种质资源的转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 和 trnH-psbA 基因间隔区序列进行系统发育学分析, 为龙葵资源的合理利用和道地性评价提供理论基础。方法 用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的方法扩增龙葵 ITS 区和 trnH-psbA 的 DNA 序列, 并与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库进行比对获取 ITS1+ITS2 和 trnH-psbA 的 DNA 序列。用邻接法 (Neighbor joining, NJ) 和最大简约法 (maximum parsimony, MP) 构建系统发育树, 用 Kimura two-parameter (K2-P) 模型分析遗传距离, 用 Clustal X 和 DNAMAN 软件进行多重比对。结果 17 个龙葵样品的 ITS1 序列长度均为 230 bp, ITS2 序列长度均为 206 bp, trnH-psbA 序列长度为 446 bp 或 447 bp, 3 个序列分别存在 7 个、2 个和 3 个变异位点。系统发育的方法将中国龙葵种质资源聚为 3 个类群, 这些类群与其所处的纬度存在一定的相关性。遗传距离的分析结果显示来自广东梅州的样品与来自北京和河北等地的样品存在最大的遗传距离。结论 系统发育和变异位点的分析为中国龙葵资源的利用和进化研究, 以及龙葵资源的道地性评价提供了理论基础, 变异位点的分析还可应用于相关种质资源的鉴定。

关键词: 龙葵; ITS; trnH-psbA; 系统发育; 道地性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)01-0114-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.018

Phylogenetic and mutation point analysis of DNA barcoding sequences in *Solanum nigrum*GAO Fei^{1,2}, LI Tong-tong¹, TANG Ling-ping¹, WANG Xiang-jun^{1,2}, LIN Li-yan¹, QIAN Yong-chang^{1,2}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China

2. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China

Abstract: Objective In this study, phylogenetic analysis was used to compare the ITSs and trnH-psbA sequences of 17 *Solanum nigrum* samples, providing the theoretic foundation to utilize their resources and evaluate their genuineness. **Methods** PCR method was used to amplify the region of ITS and trnH-psbA, and the sequences of ITS1 + ITS2 and trnH-psbA were obtained after the amplified fragment sequences were blasted in NCBI database. The Neighbor joining (NJ) and maximum parsimony (MP) method were used to construct phylogenetic trees and Kimura two-parameter (K2-P) model was used to calculate the genetic distance of different samples. Clustal X and DNAMAN softwares were applied for multi-alignment of ITS1, ITS2, and trnH-psbA sequences from different samples. **Results** The lengths of ITS1 and ITS2 sequences from 17 samples were 230 and 206 bp, respectively, and trnH-psbA sequences were 446 or 447 bp. ITS1, ITS2, and trnH-psbA had seven, two, and three mutation points, respectively. These 17 samples were clustered to three latitude-dependent groups based on both ITS1 + ITS2 and trnH-psbA sequences. **Conclusion** Phylogenetic and mutation point analysis will provide the theoretic foundation to utilize the resources of Chinese *S. nigrum*, investigate their evolution, and evaluate their genuineness. The results of mutation point will also be used in the identification of related *S. nigrum* resources.

Key words: *Solanum nigrum* L.; ITS; trnH-psbA; phylogenetics; genuineness

龙葵 *Solanum nigrum* L. 属茄科 (Solanaceae) 菜、苦葵等, 为中国传统中药, 全国各省区均有一定的分布。龙葵以全草入药, 性寒、味苦、微甘, 茄属 *Solanum* L., 一年至多年生草本植物, 又名苦

收稿日期: 2015-08-16

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LQ14H280007); 浙江农林大学科研发展基金 (2012FR017)

作者简介: 高 飞 (1981—), 男, 主要从事天然产物中抗肿瘤活性因子的筛选工作。E-mail: gfei1981@live.com

*通信作者 钱永常 (1962—), 男, 主要从事神经细胞生物学、肿瘤细胞生物学及天然药物的研究。E-mail: qian3906@zafu.edu.cn

有小毒，具有清热解毒、活血消肿等功效。此外，龙葵在我国长期作为一种抗肿瘤中药在肿瘤疾病治疗中使用，许多抗肿瘤中药复方中均含有龙葵成分。药理学研究发现龙葵的水提物、醇提物等不同组分的提取物具有很强的体外抗肿瘤细胞活性^[1-3]，其水提物还具有活体肿瘤的抑制活性^[4]。龙葵中具有抗肿瘤活性的成分主要包括龙葵碱、澳洲茄碱和澳洲茄边碱等。此外，龙葵多糖、糖蛋白等成分也被证明具有一定的药理活性^[5-9]。还有一些研究涉及到多酚、糖蛋白等成分抗肿瘤细胞的机制，如对 AP-1 信号通路和细胞周期的影响^[5,10]。但是，尽管龙葵已经是一种广泛应用的传统中药，因其在我国分布广泛，而又缺乏不同地区种质资源和道地性产区的评价研究，使得龙葵资源的规范化应用及功能因子筛选存在一定的问题，如澳洲茄碱在不同产地的龙葵之间的量差异很大^[11]，因此迫切需要对我国龙葵资源现状进行分析、评价。本研究拟以目前在植物资源评价领域广泛应用的 DNA 条形码技术为工具，并选取在中药材种质资源评价中应用最为广泛的 ITS 和 trnH-psbA 2 个 DNA 条形码序列^[12]，对中国主要龙葵产区的龙葵资源进行系统发育分析，以期归纳出不同的龙葵种质类群，为龙葵资源的利用和道地性评价提供较好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

17 个龙葵样品采集自黑龙江至海南的主要龙葵产区，均为野外采集新鲜龙葵嫩叶，并用变色硅胶封存，保存于 -80 °C 冰箱中。所有的龙葵 *S. nigrum* L. 样品均经浙江农林大学林业与生物技术学院阎道良副教授鉴定。龙葵样品的采集地及其海拔、纬度等信息见表 1。

1.2 试剂及仪器

ABI 2700 型 PCR 仪，购自美国 ABI 公司；ELIX3 型制水机，购自美国 Millipore 公司；琼脂糖凝胶电泳系统购自北京六一仪器厂；生物凝胶成像系统，购自美国 Bio-rad 公司。

引物由生工生物工程（上海）有限公司合成；TaKaRa TaqTM DNA 聚合酶，购自日本 TaKaRa 公司；pMD-19 克隆载体购自日本 TaKaRa 公司；DH5 α 感受态细胞购自北京索莱尔博奥生物科技有限公司；CTAB、酵母提取物、胰蛋白胨等 DNA 提取和大肠杆菌培养所需试剂购自生工生物工程（上海）有限公司；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等常规分析纯试剂购自浙江常青化工有限公司。

表 1 采集到的龙葵样本及其信息

Table 1 Collected *S. nigrum* samples and their informations

编号	样品	采集地	纬度	海拔/m
1	HLJ-HEB	黑龙江哈尔滨	N 45°26'	110.42
2	BJ-HD	北京市海淀区	N 40°15'	32.12
3	HeB-BD	河北保定	N 39°31'	20.05
4	HeB-XT	河北邢台	N 37°11'	19.55
5	HeN-ZK	河南周口	N 36°28'	27.33
6	HeN-PDS	河南平顶山	N 33°35'	45.20
7	HuN-SY	湖南邵阳	N 27°14'	24.81
8	ZJ-HZ	浙江杭州	N 30°27'	33.74
9	ZJ-JH	浙江金华	N 29°06'	40.09
10	ZJ-WZ	浙江温州	N 27°20'	24.48
11	JX-YT	江西鹰潭	N 28°15'	37.82
12	JX-GZ	江西赣州	N 25°07'	41.06
13	FJ-XM	福建厦门	N 24°27'	19.52
14	GX-YL	广西壮族自治区玉林	N 22°44'	88.36
15	GD-GZ	广东广州	N 23°11'	34.51
16	GD-MZ	广东梅州	N 23°23'	27.38
17	HaN-DZ	海南儋州	N 19°11'	25.39

1.3 总 DNA 提取及 PCR 扩增

用改良的 CTAB 法分别提取 17 个龙葵样品的基因组 DNA，并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取到的基因组 DNA 的质量。用 PCR 的方法扩增基因组 DNA 中相应的 DNA 条形码片段，其中 ITS 序列扩增 28 S rDNA 部分序列至 18 S rDNA 部分序列的片段，其中包含 ITS1 和 ITS2 的全长序列，而 trnH-psbA 序列扩增 trnH 基因部分片段至 psbA 基因部分片段的序列，包含 trnH-psbA 间区的全长序列。扩增所用的引物序列如下：SnITS-F: 5'-TCGTAAC-AAGGTTTCCGTAGGTGA-3'; SnITS-R: 5'-GCGG-TCGGAGCGCCTAA-3'; SntrnH-psbA-F: 5'-ACTG-CCTTGATCCACTTGGC-3'; SntrnH-psbA-R: 5'-A-TA ACTTCCCTCTAGACCTAGCTGC-3'。

其中 SnITS-F、SnITS-R 的参考序列：KC540794；SntrnH-psbA-F、SntrnH-psbA-R 的参考序列：KT223790。

按照 TaKaRa TaqTM DNA 聚合酶的说明书配制反应体系。ITS 序列的 PCR 扩增反应条件为 95 °C、3 min; 95 °C、20 s, 62.5 °C、20 s, 72 °C、1 min, 35 个循环; 72 °C、3 min。trnH-psbA 序列的 PCR 扩增反应条件为 95 °C、3 min; 95 °C、20 s, 57 °C、

20 s, 72 °C、45 s, 35 个循环; 72 °C、3 min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用生物电泳凝胶成像系统采集图片。

1.4 目的 DNA 片段的测序

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物中的目的 DNA 片段, 用 Axygen 凝胶回收试剂盒纯化相应的 DNA 片段。纯化后的片段与 pMD-19 载体构建重组质粒, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 然后铺板于 LB 固体培养基平板, 于 37 °C 培养 10 h。单克隆菌斑形成后挑取菌斑并 37 °C 恒温摇床 210 r/min 培养 5 h, 用“1.3”项中的 PCR 方法检测菌液中的 DNA 插入片段。将有插入片段的菌液送生工生物工程(上海)有限公司进行插入片段测序, 为保证测序的准确度, 每样品送 3 份样品并双向测序。

1.5 DNA 序列的分析

将测序得到的序列与美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中的龙葵近缘种的相关序列进行比对, 分别整理出其中的 ITS1、ITS2 和 trnH-psbA 的序列。采用菲岛茄 *Solanum cumingii* Dunal 的 ITS1+ITS2 序列为 ITS1+ITS2 系统发育树的外群, 采用番茄 *Solanum lycopersicum* L. 的 trnH-psbA 序列为 trnH-psbA 系统发育树的外群。用 MEGA(version 4.1) 软件中的邻接法(NJ)和最大简约法(MP)构建龙葵物种的系统发育树。采用 MEGA(version 4.1) 软件中的 Kimura two-parameter 模型分析不同样品龙葵 ITS1、ITS2 和 trnH-psbA 序列的遗传距离。用 Clustal X 和 DNA man 软件对不同样品龙葵 ITS1、ITS2 和 trnH-psbA 序列进行多重比对。

2 结果与分析

2.1 龙葵 ITS 和 trnH-psbA 序列扩增及序列分析

为全面而准确地比对龙葵物种的 ITS 和 trnH-psbA 序列, 本实验分别扩增了 17 个龙葵样品的 ITS 和 trnH-psbA 区段 DNA 序列。ITS 区段包括部分 28 S rDNA 序列+ITS1 全长+5 S rDNA 全长+ITS2 全长+部分 28 S rDNA 序列, 而 trnH-psbA 区段包括部分 trnH 基因+trnH-psbA 间区全长+部分 psbA 基因。由图 1 可见, 17 个样品中的 ITS 和 trnH-psbA 序列扩增均得到特异性的单一条带, 且条带大小与各自 DNA 序列的预计相对分子质量大小一致。提取其中的 ITS1、ITS2 和 trnH-psbA 序列后进行序列分析, 发现 17 个龙葵样品的 ITS1 序列均为 230 bp, ITS2 序列均为 206 bp。对于 trnH-psbA 序列, 来自黑龙江哈尔滨和北京海淀等的 6 个样品

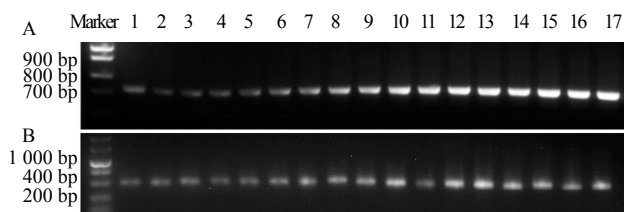


图 1 17 个龙葵样本的 ITS (A) 及 trnH-psbA (B) 扩增条带
Fig. 1 ITS (A) and trnH-psbA (B) amplified fragment of 17 samples of *S. nigrum*

为 447 bp, 而来自湖南邵阳、浙江金华等的 11 个样品为 446 bp。这些样品的 ITS 序列在 G+C 量等方面较为接近, 见表 2。

2.2 龙葵 ITS 和 trnH-psbA 序列的系统发育分析

以菲岛茄的 ITS1+ITS2 序列(序列号 EU176116)和番茄的 trnH-psbA 序列(序列号 GU562406)为外群, 用邻接法分别基于龙葵 ITS1+ITS2 和 trnH-psbA 序列构建系统发育树(图 2), 从而对龙葵种质资源进行聚类。结果显示, 用两个序列均可将龙葵资源分为 3 个主要的类群, 分别为来自黑龙江哈尔滨、河北保定、河北邢台、北京海淀、河南平顶山和河南周口的样品组成的类群; 浙江温州、浙江金华、浙江杭州、江西赣州、湖南邵阳、福建厦门、江西鹰潭、广西玉林的样品组成的类群; 广东梅州、广东广州、海南儋州的样品组成的类群。但是相对 trnH-psbA 序列, ITS1+ITS2 序列构建的系统发育树对不同种质的龙葵样品分离程度更好。

2.3 龙葵 ITS 和 trnH-psbA 序列的遗传距离

对 17 个龙葵样本之间的遗传距离进行分析(表 3 和 4), 发现无论是 ITS1+ITS2 还是 trnH-psbA 序列, 这些样本之间的遗传距离均较小, 尤其对于 trnH-psbA 序列。对于 ITS1+ITS2 序列, 湖南邵阳、福建厦门、广西玉林、江西鹰潭和江西赣州 5 个样品之间的遗传距离是 0。同样还有来自北京和河北邢台、保定的 3 个样品, 之间的遗传距离也为 0。而广东梅州样本与北京、河北和黑龙江的 4 个样本的遗传距离均为 0.016, 为最大遗传距离。trnH-psbA 序列也具有类似的规律。

2.4 ITS 和 trnH-psbA 序列的变异位点及规律分析

对不同样本的 ITS1 和 ITS2 序列进行分析, 发现其变异位点均具有明显的规律性(图 3)。其中 ITS1 区段存在 7 个变异位点, 均发生在广东广州、广东梅州和海南儋州采集样品与其他 14 个样品之间, 其中包括 5 个简约信息位点和 2 个单一变异位点。而 5 个

表 2 17 个龙葵样品的 ITS 和 trnH-psbA 序列长度和碱基频率分布

Table 2 Length and base pair frequency in ITS and trnH-psbA sequences from 17 samples of *S. nigrum*

编号	ITS1		ITS2		trnH-psbA	
	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%
1	230	66.52	206	66.50	447	27.29
2	230	66.52	206	66.50	447	27.29
3	230	66.52	206	66.50	447	27.29
4	230	66.52	206	66.50	447	27.29
5	230	66.52	206	66.50	447	27.29
6	230	66.52	206	66.50	447	27.29
7	230	66.52	206	67.48	446	27.35
8	230	66.52	206	67.48	446	27.35
9	230	66.52	206	67.48	446	27.35
10	230	66.52	206	67.48	446	27.35
11	230	66.52	206	67.48	446	27.35
12	230	66.52	206	67.48	446	27.35
13	230	66.52	206	67.48	446	27.35
14	230	66.52	206	67.48	446	27.35
15	230	66.09	206	67.48	446	27.35
16	230	66.09	206	67.48	446	27.35
17	230	65.65	206	67.48	446	27.35

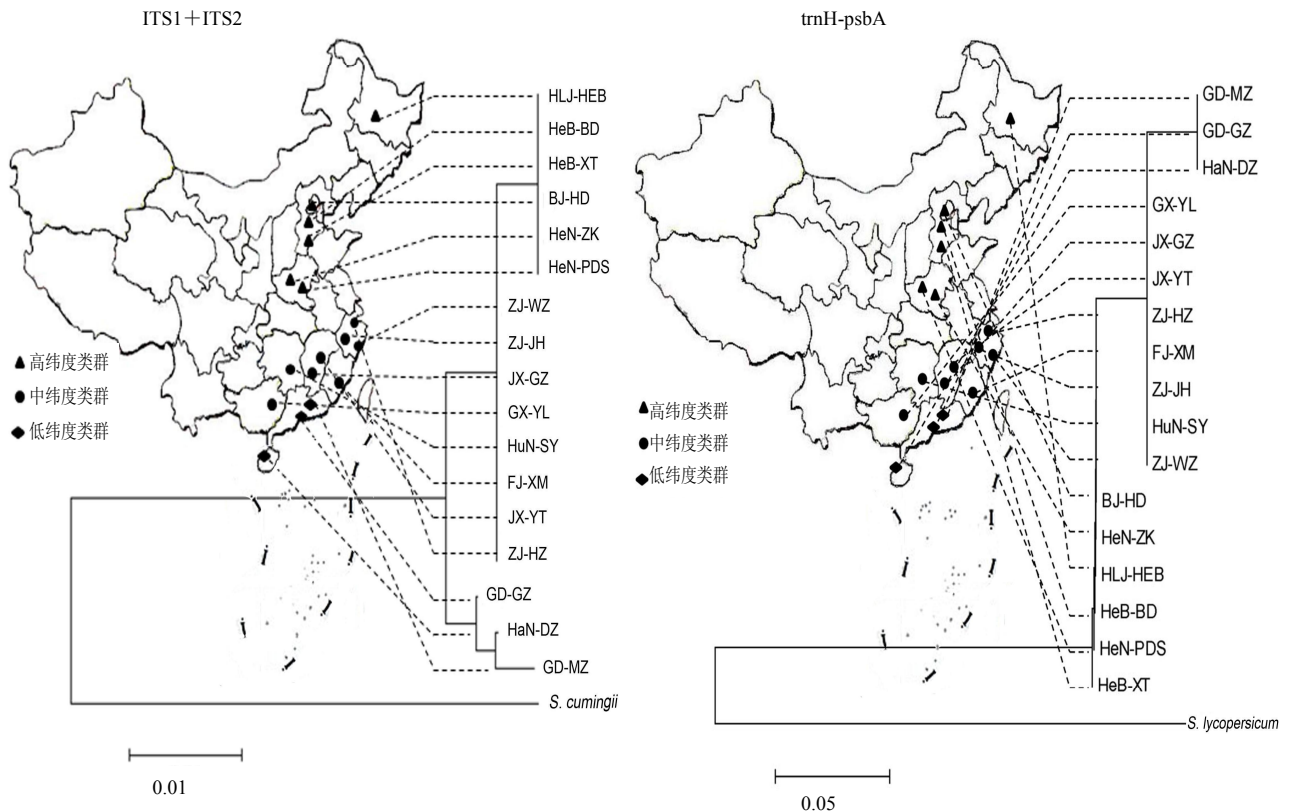


图 2 基于 ITS1+ITS2 和 trnH-psbA 序列的龙葵种质资源系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees of seed resources for Chinese *S. nigrum* based on ITS and trnH-psbA sequences

表 3 17 个龙葵样本的 ITS (ITS1+ITS2) 序列的 K2-P 模型遗传距离

Table 3 K2-P model genetic distances of ITS sequences among 17 samples of *S. nigrum*

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	0.000																
2	0.000	0.000															
3	0.000	0.000	0.000														
4	0.000	0.000	0.000	0.000													
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
7	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000										
8	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000									
9	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000								
10	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000							
11	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
12	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
13	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
14	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
15	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000		
16	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.005	0.000	
17	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.002	0.004	0.000

表 4 17 个龙葵样本的 trnH-psbA 序列的 K2-P 模型遗传距离

Table 4 K2-P model genetic distances of trnH sequences among 17 samples of *S. nigrum*

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	0.000																
2	0.000	0.000															
3	0.000	0.000	0.000														
4	0.000	0.000	0.000	0.000													
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
7	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000										
8	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000									
9	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000								
10	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000							
11	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
12	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
13	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
14	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
15	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000		
16	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	
17	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000

简约信息位点中包含 4 个位点为碱基“C”与“T”的互换。变异频次最高的为广东梅州的样品，发生了全部 7 个位点的碱基变异。ITS2 区段存在 2 个变异位点，均为简约信息位点。ITS2 区段的变异主要产生在浙江杭州、浙江温州等 9 个样品与其他样品之间，2 个变异的位点分别是发生了“C”-“A”和“C”-“T”之

间的碱基互换。trnH-psbA 序列产生了 3 个变异位点，其中第 1 个是发生在海南儋州等 3 个样品与其他 14 个样品之间的“A”-“T”碱基互换；第 2 和第 3 个均发生在海南儋州、广东梅州等 11 个样品与北京海淀、河南周口等 6 个样品之间，分别为“G”-“T”之间的碱基互换和碱基“G”的缺失。

ITS-1		
JX-GZ	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
HeN-PDS	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
JX-YT	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
FJ-XM	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
GX-YL	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
HeN-ZK	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
BJ-HD	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
ZJ-WZ	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
HuN-SY	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
ZJ-JH	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
ZJ-HZ	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
HeB-XT	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
HeB-BD	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
HLJ-HEB	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
GD-GZ	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
MZ	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
HaN-DZ	GCAGCGCGGCGGGTCTTCGGGGCCCTCCGCGCGGTTCCCTCTGTCGCCCGCTCGTTCGGGGGACTAACGAACCCCGCGCG	164
Consensus	gc gcgcgcg ggtgcttcgggg ccctccgcgcg gttccc ctggtcccggctcgttcgggggactaacgaaccccgcgcg aaagcgccaaggaatacttaaa	
ITS-2		
GD-GZ	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
MZ	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
JX-YT	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
ZJ-WZ	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
HuN-SY	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
ZJ-JH	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
GD-GZ	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
HaN-DZ	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
ZJ-HZ	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
HLJ-HEB	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
HeB-BD	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
HeB-XT	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
BJ-HD	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
HeN-ZK	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
FJ-XM	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
GX-YL	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
HeN-PDS	ATCGCGTCGCCCGCCGACGCCGCAAGGGCGTCTGGGGCGGATACTGGCTCCCGTGGCCCTCGAGCTCGGGTGGCTAAATGCGAGTCCACGTGCA	99
Consensus	atcgcgtcgccccccgacgcccgcaagggcgctctggggcgatactggctcccgtggccctcgagctcgggtggcctaaatgcgagtcacagtcga	
trnH-psbA		
HaN-DZ	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
GD-GZ	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
FJ-XM	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
ZJ-HZ	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
HuN-SY	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
ZJ-WZ	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
ZJ-JH	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
GX-YL	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
JX-YT	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
BJ-HD	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
HeN-ZK	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
HLJ-HEB	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
HeB-BD	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
HeN-PDS	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
HeB-XT	TTTGTGAATGAAATAAAAAAGATTAATAACATTAGCAACAAGAGGAACAAGTTAATTTCTACAATTTTCAATAAATAGAAAATCAAAATCGAATACT	250
Consensus	tttgtgaatgaaataaaaaagat taataaacattagcaacaagaggaacaagtta atttctacaattttcaataaataagaaaatcaaaatcgaatact	
HaN-DZ	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
GD-GZ	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
FJ-XM	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
ZJ-HZ	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
HuN-SY	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
ZJ-WZ	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
ZJ-JH	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
GX-YL	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
JX-YT	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
BJ-HD	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
HeN-ZK	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
HLJ-HEB	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
HeB-BD	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
HeN-PDS	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
HeB-XT	CAATCATGAATAAATGCAGGCAAAATACCCCTCCTCTCTTTTCTATAATGTAACAAAAAAGTCTATGTCAGTAAAACTAGGAAATTAATAAAA	348
Consensus	caatcatgaataaataagcaggcaaaataccctcctctcttttctataatgtaacaaaaaagctctatgtcagtaaaaactaggaaatataataaa	

图3 17个龙葵样本的ITS和trnH-psbA序列多重比对结果

Fig. 3 Multi-alignment of ITS and trnH-psbA sequences from 17 samples of *S. nigrum*

3 讨论

道地药材对中药资源的利用具有不可忽视的重要意义，但是由于历史的原因和科技发展水平等的影响，时至今日，对中药道地性的认识还基本停留

在产地、性状、生态和功能等方面，而缺乏对其本质及规律性的认识。随着分子生物学技术在传统中药领域的应用，越来越多的学者尝试用一些新的方法评价道地药材^[13-15]。另一方面，DNA条形码技术

在包括中药材在内的植物种质资源评价领域已经取得相当普及的应用^[16-17],那么,这一准确、客观、便捷的植物种质资源鉴定技术能否作为一种基础或辅助手段应用于道地性药材评价领域?这是本研究思考的一个重要问题。

传统抗肿瘤中药龙葵在中国分布广泛,但是缺乏道地产区的认证,造成龙葵种质资源良莠不齐。因而对龙葵种质资源进行评价将对这一传统中药的更合理利用提供指导性的价值。本实验将 DNA 条形码技术应用于龙葵种质资源的聚类研究,扩增 ITS1+ITS2 和 trnH-psbA 2 个植物种质资源鉴定中最常采用的 DNA 条形码序列,用系统发育方法分析来自主要龙葵产区的 17 个样本。聚类分析的结果显示,龙葵资源可以基本上分为 3 个类群,一个是来自较高纬度的东北、华北等地区(黑龙江、河北、河南、北京)的资源;第 2 个是来自中间纬度的华东和中部地区(浙江、湖南、江西)的资源,甚至还包括广西、福建等地区的资源;第三个是来自较低纬度地区(广东、海南)的资源,因此推测龙葵资源的系统发育对纬度有一定的依赖性。这一结果和之前报道的不同纬度来源的龙葵中澳洲茄碱的量显著不同的结论相印证^[11]。本研究的结果为进一步评价龙葵种质资源提供了理论基础,有利于龙葵资源的更合理利用。

本研究对不同种质龙葵资源 DNA 条形码的聚类分析和遗传距离的分析来看,同一类群内部不同来源的样本之间遗传差异很小,甚至样本之间没有遗传差异,说明同一类群的龙葵样本种质较为一致。本研究分别用 ITS1+ITS2 和 trnH-psbA 2 个 DNA 条形码对中国龙葵资源进行聚类分析,结果显示聚类结果相似,说明这种方法具有较高的可靠性。而对 2 个 DNA 条形码的结果进行分析,发现 ITS1+ITS2 对龙葵资源的分离度更高,可能是由于相比 trnH-psbA,龙葵的 ITS 序列拥有更快的进化速率,因此可以更准确的反映龙葵的进化状态。结果说明 ITS1+ITS2 更适合用来进行龙葵资源鉴定。

本研究发现,不同地区龙葵资源的 ITS 序列的变异位点具有明显的规律性。以 ITS2 为例,17 个龙葵样品的变异均发生在 2 个位点,且发生在广东、浙江、湖南、江西等中低纬度类群与河北、北京、黑龙江等高纬度类群之间。而对于 ITS1,则有更多的碱基位点在不同的样品间发生了变异,变异类型

以“C”-“T”转换为主。不同于 ITS2,ITS1 序列突变发生的类群主要产生在广东和海南等低纬度类群与其他类群之间。由此可见,不同地区的龙葵物种,其 ITS1 和 ITS2 序列的碱基位点发生了不同程度的变异,这些变异与龙葵分布的纬度有一定的关系。此外,ITS1 和 ITS2 的序列在不同样品间的变异程度并不相同,ITS1 序列存在更多的变异位点,而 ITS2 的变异发生在更多的样品之间。这一现象与其他一些植物物种的 2 个 ITS 序列的变异频次并不相同,造成这样 2 个序列不同步变异的机制有待于更进一步研究。

参考文献

- [1] Tai C J, Wang C K, Tai C J, *et al.* Aqueous extract of solanum nigrum leaves induces autophagy and enhances cytotoxicity of cisplatin, doxorubicin, docetaxel, and 5-Fluorouracil in human colorectal carcinoma cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 514719.
- [2] Tai C J, Wang C K, Chang Y J, *et al.* Aqueous extract of solanum nigrum leaf activates autophagic cell death and enhances docetaxel-induced cytotoxicity in human endometrial carcinoma cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 859185.
- [3] Son Y O, Kim J, Lim J C, *et al.* Ripe fruit of Solanum nigrum L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(10): 1421-1428.
- [4] 丁霞,高思国,李冠业. 龙葵不同提取部位体外抗肿瘤作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(5): 1244-1246.
- [5] Heo K S, Lee S J, Ko J H, *et al.* Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF-kappaB and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2004, 18(6): 755-763.
- [6] Lee S J, Oh P S, Ko J H, *et al.* A 150-kDa glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. has cytotoxic and apoptotic effects by inhibiting the effects of protein kinase C alpha, nuclear factor-kappa B and inducible nitric oxide in HCT-116 cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 54(6): 562-572.
- [7] Heo K S, Lim K T. Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. modulates the apoptotic-related signals in 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-stimulated MCF-7 cells [J]. *J Med Food*, 2005, 8(1): 69-77.
- [8] Li J, Li Q W, Peng Y, *et al.* Protective effects of fraction

- 1a of polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne on thymus in tumor-bearing mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129(3): 350-356.
- [9] Li J, Li Q W, Feng T, *et al.* Antitumor activity of crude polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne on U14 cervical carcinoma bearing mice [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(9): 832-840.
- [10] Wang H C, Chung P J, Wu C H, *et al.* *Solanum nigrum* L. polyphenolic extract inhibits hepatocarcinoma cell growth by inducing G2/M phase arrest and apoptosis [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(1): 178-185.
- [11] 袁海建, 贾晓斌, 陈彦, 等. 不同产地龙葵药材中澳洲茄碱量的分析研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(5): 772-774.
- [12] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(2): 141-148.
- [13] 曹晖, 杨梦苏, 肖培根. 中药材道地性基因判别技术的进展 [J]. *药学学报*, 2005, 40(7): 577-584.
- [14] 杨生超, 赵昶灵, 文国松. 植物药材道地性的分子机制研究与应用 [J]. *中草药*, 2007, 38(11): 1738-1741.
- [15] 丁平, 刘瑾, 邱金英, 等. 基于核糖体 rDNA ITS 序列变异探讨巴戟天道地性 [J]. *药学学报*, 2012, 47(4): 535-540.
- [16] 吴志刚, 范传颖, 包晓青, 等. 山药种质资源核糖体 rDNA-ITS 区序列分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1136-1142.
- [17] 夏至, 冯翠元, 高致明, 等. 黄芩及其同属近缘种的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(1): 107-112.