

## 木瓜属药用植物 DNA 条形码鉴定研究

张艳艳<sup>1</sup>, 齐红<sup>2</sup>, 郭庆梅<sup>1\*</sup>, 孙稚颖<sup>1</sup>, 周凤琴<sup>1</sup>, 李圣波<sup>3</sup>

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355
2. 济南市食品药品检验检测中心, 山东 济南 250001
3. 山东亚特生态技术有限公司, 山东 临沂 266071

**摘要:** 目的 对木瓜属药用植物进行 ITS2、psbA-trnH 序列分析, 为其分子鉴定提供依据。方法 对 5 种木瓜属药用植物的 19 个样本 ITS2 序列进行 PCR 扩增和测序, 用 MEGA6.0 计算其种间、种内的 Kimura 2-parameter (K2P) 距离, 及各序列变异位点并构建系统发育树, 并预测 ITS2 二级结构。结果 ITS2 序列间存在明显差异, psbA-trnH 序列间也存在稳定差异; 构建的系统发育树显示木瓜属的不同基原样本各聚为一支, 能很好将 5 种植物区分, 显示出单系性; 比较木瓜属 5 种植物的 ITS2 二级结构存在明显差异。结论 ITS 和 psbA-trnH 序列可以有效准确鉴别 5 种木瓜属植物。

**关键词:** 木瓜属; DNA 条形码; ITS; psbA-trnH; 遗传距离

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)03-0474-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.021

## Study on DNA barcoding of medicinal plants in *Chaenomeles* Lindl.

ZHANG Yan-yan<sup>1</sup>, QI Hong<sup>2</sup>, GUO Qing-mei<sup>1</sup>, SUN Zhi-ying<sup>1</sup>, ZHOU Feng-qin<sup>1</sup>, LI Sheng-bo<sup>3</sup>

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China
2. Jinan Food and Drug Control/Testing Center, Jinan 250001, China
3. Shandong Yate Eco-tech Co. Ltd., Linyi 266071, China

**Abstract: Objective** To provide evidence for the molecular identification of medicinal plants in *Chaenomeles* Lindl. **Methods** Nineteen ITS2 and psbA-trnH sequence samples of five species in *Chaenomeles* Lindl. were PCR amplified and sequenced. The intra-specific and inter-specific K-2P distances were calculated, and cluster analysis was performed using Neighbor-joining (NJ) method by MEGA 6.0. **Results** The original plant of *Chaenomeles* Lindl. could be identified by the sequence differences of the ITS2 and psbA-trnH sequences. Different samples of *Chaenomeles* Lindl. were gathered together and could be distinguished by NJ tree. There were significant differences among the ITS2 secondary structures in five species of *Chaenomeles* Lindl. **Conclusion** ITS2 and psbA-trnH are efficient barcodes for the authentication of plants of *Chaenomeles* Lindl.

**Key words:** *Chaenomeles* Lindl.; DNA barcoding; ITS; psbA-trnH; genetic distance

木瓜属 *Chaenomeles* Lindl. 植物属于蔷薇科, 全世界共有 5 种, 包括木瓜 *Chaenomeles sinensis* Koehne、皱皮木瓜 *C. speciosa* (Sweet) Nakai、毛叶木瓜 *C. cathayensis* (Hemsl.) Schneid.、西藏木瓜 *C. thibetica* Yü 及日本木瓜 *C. japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach。木瓜为一味传统中药, 《中国药典》2010 年版规定: 木瓜为蔷薇科植物贴梗海棠(皱皮木瓜) *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai. 的干燥近成熟果实。我国是木瓜属植物起源中心和分布中心, 变异类型和品种资源十分丰富。木瓜属植物形态变异较大, 种间过渡性状多, 在亲缘关系和遗传多样性的研究中存在诸多分歧, 因此需要寻求一种快速且

准确的方法进行鉴别。

DNA 条形码鉴定技术是通过比较一段通用 DNA 片段, 对物种进行快速、准确的识别和鉴定<sup>[1]</sup>。目前研究者们已经提出了 10 多条植物候选 DNA 条形码序列<sup>[2]</sup>, 其中核糖体 DNA (nrDNA) 中的 ITS2 区具有进化速率快、高度重复、长度适中等优点, 成为药用植物 DNA 条形码研究中最重要候选序列之一<sup>[3]</sup>。Chen 等<sup>[4]</sup>分析比较了 7 个候选 DNA 条形码, 建议将 ITS2 作为药用植物标准 DNA 条形码, psbA-trnH 作为 ITS2 的辅助序列对药用植物进行鉴定。对于木瓜属物种在分类学中难以区分的类群, 采用

收稿日期: 2015-05-08

基金项目: 国家科技支撑计划 (2011BAI 06 B06); 山东省科技发展计划项目 (2011GSF 11904)

作者简介: 张艳艳, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制与资源研究。E-mail: yan13579.com@qq.com

\*通信作者 郭庆梅, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药质量控制与资源研究。E-mail: qmguo@sina.com

DNA 条形码可从基因水平上提供一种分类依据。本研究选用核基因 ITS2 片段和叶绿体基因 psbA-trnH 片段对木瓜属植物进行 DNA 分子鉴定,为解决分类学争议提供分子依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

**1.1.1 材料** 2014 年 4 月在山东亚特生物有限公司木瓜种植基地采集,采摘各植株的幼嫩叶片,硅胶干燥保存。原植物经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为毛叶木瓜 *C. cathayensis* (Hemsel) Schneid.、皱皮木瓜 *C. speciosa* (Sweet) Nakai、日本木瓜 *C. japonica* (Thunb.) Lindl ex Spach、西藏木瓜 *C. thibetica* Y 和光皮木瓜 *C. sinensis* (Thouin) Koehne, 数字影像信息及凭证标本保存于山东中医药大学。实验样品材料见表 1。

表 1 样品信息  
Table 1 Samples information

编号	材料	登录号
XZ01	西藏木瓜	YC0131MT01
XZ02	西藏木瓜	Y0131CMT02
RB01	日本木瓜	YC0132MT01
RB02	日本木瓜	YC0132MT02
RB03	日本木瓜	YC0132MT03
ZP01	皱皮木瓜	YC0133MT01
ZP02	皱皮木瓜	YC0133MT02
ZP03	皱皮木瓜	YC0133MT03
ZP04	皱皮木瓜	YC0133MT04
ZP05	皱皮木瓜	YC0133MT05
ZP06	皱皮木瓜	YC0133MT06
ZP07	皱皮木瓜	YC0133MT07
ZP08	皱皮木瓜	YC0133MT08
ZP09	皱皮木瓜	YC0133MT09
GP01	光皮木瓜	YC0134MT01
GP02	光皮木瓜	YC0134MT02
MY01	毛叶木瓜	YC0135MT01
MY02	毛叶木瓜	YC0135MT02
MY03	毛叶木瓜	YC0135MT03

**1.1.2 试剂** 植物基因组 DNA 提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物技术有限公司; 2 × Master Mix (Taq DNA Polymerase) (recombinant); D2000 plus DNA Ladder (100~5 000) (Solarbio); 氯仿、β-巯基乙醇、无水乙醇 (山东禹王实业有限公司); 引物由上海生工有限公司合成。

**1.1.3 仪器** Takara PCR 扩增仪 (GJD35-TP600); DYY-8C 型电泳仪和电泳槽 (北京六一仪器厂); 微波炉 (美的); ESJ 系列电子分析天平; 数显恒温水浴锅 HH-4 (国华电器有限公司); 离心机 (德国 Eppendorf); KEDA 成像仪及操作系统 (美国柯达公司); 紫外分析仪 UV-2000 (上海天能科技有限公司); DNA 测序仪 3730XL (Applied Biosystems 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 实验材料均为硅胶干燥叶片,取样约 20 mg,液氮充分研磨,利用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

**1.2.2 PCR 扩增及测序** 利用 ITS2、psbA-trnH 2 个序列的通用引物分别对所提取的 DNA 中靶序列进行 PCR 扩增。反向 PCR 反应体积为 20 μL,体系内含: 2 × Taq master mix 12.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL、引物各 1 μL (2.5 μmol/L)、DNA 模板 1 μL (30 ng)。扩增程序为 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 56 °C, 30 s, 72 °C, 45 s, 40 个循环; 72 °C, 10 min。PCR 扩增产物电泳检测后,切胶纯化,使用 ABI 3730XL 测序仪双向测序。ITS、psbA-trnH 2 个序列的引物序列见表 2。

表 2 DNA 条形码引物  
Table 2 DNA barcode primers information

序列	引物名称	引物序列 (5'→3')
ITS2	2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT
ITS2	3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
psbA-trnH	F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
psbA-trnH	R	CGCGCATGGTGGATTCAATCC

**1.2.3 数据处理** 测序峰图利用 CodonCode Aligner V 2.06 (CodonCode Co., 美国) 校对拼接,去除引物区,ITS2 序列使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法除去两端的 5.8S 和 28S 区段获得 ITS2 间隔区序列<sup>[5]</sup>。psbA-trnH 序列切除两端引物获得完整序列。然后,将所有序列用软件 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 6.0 分析比对并计算 Kimura-2-parameter (K2P) 距离,用 NJ 邻接法 (neighbor-2-joining method) 构建系统发育树。利用相似性搜索法 (BLAST1)、最近距离法 (Nearest distance) 等方法进行鉴定分析。利用 bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。利用 Schultz 等<sup>[6]</sup>建立的 ITS2 数据库及其网站 (<http://its2.bioapps.ibiozentrum.uni-wuerzburg.de>) 预测 ITS2 二级结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 相似性搜索法鉴定结果

进入 NCBI 对实验样品的 ITS2、psbA-trnH 序列使用 BLAST 方法进行鉴定和序列验证<sup>[7]</sup>, 结果显示实验样品与木瓜属查询序列的相似度达 96% 以上, 此鉴定结果说明实验药材样本来源于蔷薇科木瓜属。

### 2.2 ITS2 序列种内种间比较分析

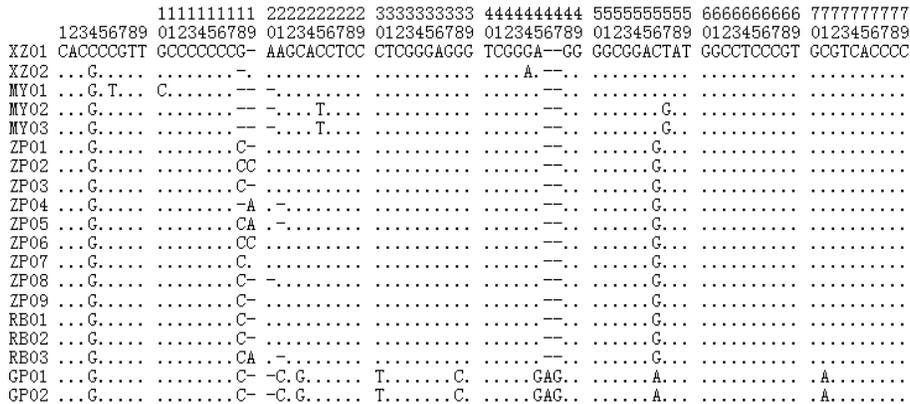
木瓜属 5 种不同种质植物 (皱皮木瓜、光皮木瓜、西藏木瓜、日本木瓜、毛叶木瓜) 序列比对后长度为 225 bp, G+C 量在 69.6% (表 3)。对比实验中木瓜属 19 个样本的种间 ITS2 序列 (图 1) 发现共有 40 处位点变异, 其中光皮木瓜的总变异率最低 (0.88%), 毛叶木瓜的总变异率最高 (4.94%)。根据 K2P 参数遗传距离模型计算得到种间最大遗

传距离为 0.124, 在光皮木瓜与皱皮木瓜之间。不同种间最小遗传距离 0.005, 在皱皮木瓜与日本木瓜之间, 说明这 2 种亲缘关系较近。种内遗传距离分布于 0~0.015。由此可知 ITS2 序列可以用于木瓜属植物的分子鉴定, 但部分种间差异则不能通过 ITS2 序列的位点碱基差异区分开。

表 3 ITS2 序列信息

Table 3 Main information of ITS2 sequences

物种	全长/bp	G+C/%	缺失率/% (转换/颠换)/%	总变异率/%
西藏木瓜	221	69.0	1.77	0.90
日本木瓜	221	69.1	1.77	0.45
皱皮木瓜	222	69.6	1.33	2.25
光皮木瓜	223	70.0	0.88	0.88
毛叶木瓜	219	69.4	2.66	2.28



“-”表示该位点碱基缺失, 下同

“-” means the site base deletion, same as below

图 1 木瓜属植物的 ITS2 变异位点图

Fig. 1 Variable sites of ITS2 sequence of plants in *Chaenomeles* Lindl.

### 2.3 psbA-trnH 序列种内种间比较分析

对比过程中发现各物种的 psbA-trnH 的长度不一, 序列长度变异从 260~313 bp 波动, G+C 量 25.1%~28.5%, 见表 4。对序列进行分析, 结果日本木瓜和皱皮木瓜总变异率最低 (0.64%), 毛叶木瓜的总变异率最高 (17.20%)。序列比对结果显示 (图 2), 把空位当作缺失发现, 西藏木瓜和毛叶木瓜 2 个种在 162 bp 有一大段缺失 53 个碱基, 与皱皮木瓜相比, 日本木瓜、毛叶木瓜分别缺失 1 个碱基, 光皮木瓜缺失 4 个碱基, 种间的位点变异较少。木瓜属 psbA-trnH 序列 K2P 遗传距离分布于 0~0.036, 其中光皮木瓜与皱皮木瓜的 K2P 遗传距离最大, 毛叶木瓜和西藏木瓜种间遗传距离为 0, 亲缘关系很近, 与 ITS2 结果一

致。psbA-trnH 种间平均 K2P 遗传距离 0.007, 种内最大遗传距离为 0.007。

### 2.4 ITS2 序列二级结构

从木瓜属 5 个种的二级结构比较可以看出不同基原植物间 ITS2 二级结构非常相似, 均由一个中心环及 4 个螺旋 (Helix) 区构成 (图 3), 比较木瓜属二级结构发现, 其中 IV 区较为保守, 主要差异在螺旋 I、II、III 区, 其中光皮木瓜无论是从茎环 (Loop) 的数目、大小、角度和长度等方面, 都与其他 4 种有很大区别。毛叶木瓜在螺旋 II 区较其他种缺少一个茎环, 日本木瓜在螺旋 I 区多一个茎环, 不同物种间茎环大小、位置有或多或少的区别, 见图中方框所示。因此, 通过 ITS2 二级结构, 可以将木瓜属 5 个近缘种直观地鉴别出来。

表 4 psbA-trnH 序列信息  
Table 4 Main information of psbA-trnH sequences

物种	全长/bp	G+C/%	缺失率/%	(转换/颠换) /%	总变异率/%
西藏木瓜	260	28.5	16.90	0.00	16.90
日本木瓜	312	25.3	0.32	0.32	0.64
皱皮木瓜	313	25.8	0.00	0.64	0.64
光皮木瓜	309	25.1	1.28	0.64	1.92
毛叶木瓜	259	28.2	17.20	0.00	17.20

```

2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222
0000000000 1111111111 2222222222 3333333333 4444444444 5555555555 6666666666 7777777777
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
XZ01 -----TCAAT TTAGGTTGTA TTTTATCTTA CAAGTAATGA TAAATGGCGG AAAAATTATT AATTTGTAAT
XZ02 -----
MY01 -----
MY02 -----
MY03 -----
ZP01 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
ZP02 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
ZP03 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
ZP04 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
ZP05 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
ZP06 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
ZP07 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
ZP08 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
ZP09 AATAAAACAA AGTTT. ....G. ....
RB01 AA-AGAATAA AGTTT. ....G. ....
RB02 AA-AGAATAA AGTTT. ....G. ....
RB03 AA-AGAATAA AGTTT. ....G. ....
GP01 AAAAGAATAA AGTTT. ....G. ....
GP02 AAAAGAATAA AGTTT. ....G. ....
    
```

图 2 木瓜属植物的 psbA-trnH 变异位点图

Fig. 2 Variable sites of psbA-trnH sequence of plants in *Chaenomeles* Lindl.

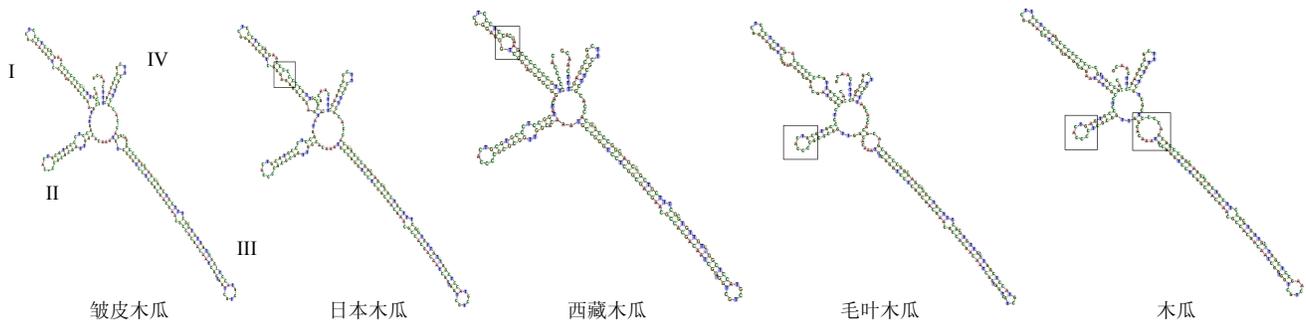


图 3 ITS2 二级结构比较

Fig. 3 Comparison on secondary structure of ITS2

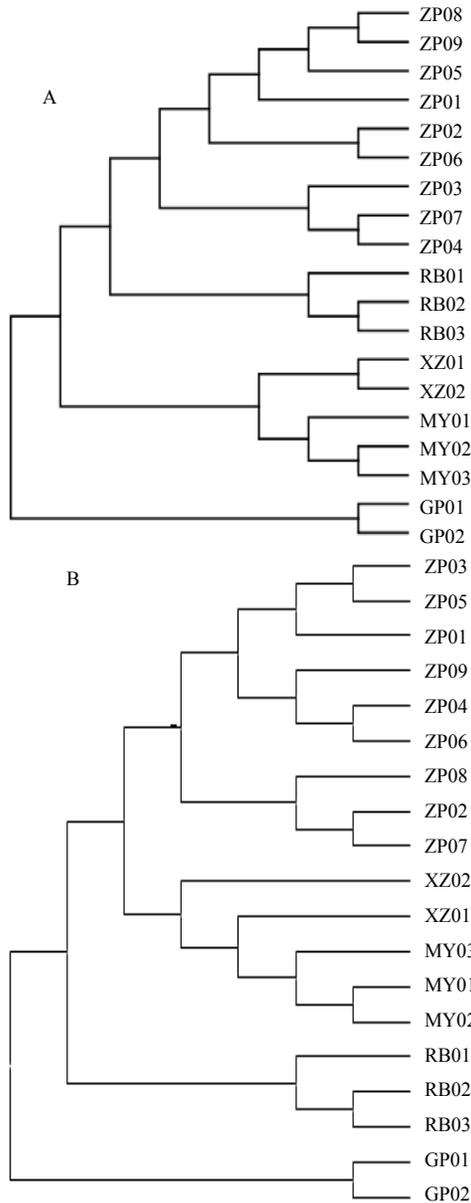
### 2.5 聚类分析

木瓜属植物分布广泛，种间性状交叉普遍，种间关系不清晰，导致木瓜属植物在分类处理上存在较大争议，而基于 DNA 条形码序列构建木瓜属系统发育树，不仅能通过树形图分支结果判断物种，还能在一定程度上还原其系统进化关系。

从 ITS2 序列聚类分析结果来看 (图 4-A)，木瓜属 5 个种内的不同样本分别聚为一支，其中，样本中皱皮木瓜聚为一支，后与日本木瓜分支聚为

一支，呈现较近的亲缘关系。西藏木瓜与毛叶木瓜分支聚为一支持率较高的分支，亲缘关系较高。而光皮木瓜形成支持率为 100% 单独分支，表现出单系性，与其他同属能够很明显区分开。依据 ITS2 序列构建的分子系统树可将木瓜属 5 个种很好地区分开。

psbA-trnH 序列的 NJ 树 (图 4-B) 中，光皮木瓜与其他种间呈现明显的单系性；日本木瓜、毛叶木瓜、皱皮木瓜种质品种内优选聚类；西藏木瓜与



Bootstrap 1 000 次重复, 仅显示支持率  $\geq 50\%$  的分支  
 Bootstrap 1 000 repeated, the support rate  $\geq 50\%$  were shown above branches

图 4 基于 ITS2 (A) 和 psbA-trnH (B) 序列构建 NJ 树  
 Fig. 4 NJ tree based on ITS2 (A) and psbA-trnH (B) sequences

毛叶木瓜种质共聚为一个类群, 表明 2 个物种间亲缘关系密切。日本木瓜种质与皱皮木瓜种质亲缘关系较远。皱皮木瓜种质聚为一个类群, 但与 ITS2 序列相比较, 种内样品在树状图中位置不稳定。

### 3 讨论

木瓜属植物变异类型多、变异幅度大, 种间杂交容易, 传统的形态分类鉴别法并不能完全区分各种质资源。近年来随着分子生物学的不断发展, 已有研究通过 RAPD、AFLP 及 SRAP 等方

法对木瓜种质的遗传多样性进行了分析<sup>[8-14]</sup>, 但在种间、种内显示出的多态性程度并不完全一致, 且各种分子标记技术之间缺乏一定的相互印证。基于遗传物质 DNA 的条形码鉴定技术, 具有稳定、可靠、不受外界影响的特点, 是一种新的分子生物鉴定技术。

本实验应用 DNA 条形码技术测定了木瓜属的 ITS2 和 psbA-trnH 序列, 从分子水平证明了 5 个种间的亲缘关系。研究表明, ITS2 序列在木瓜不同种质个体间存在丰富的变异, psbA-trnH 序列的种内种间变异位点较少。ITS2 序列种内种间的 K2P 遗传距离接近, 说明遗传相似度高, 亲缘关系较近。psbA-trnH 序列 K2P 遗传距离显示光皮木瓜与皱皮木瓜之间遗传距离最远, 而毛叶木瓜和西藏木瓜种间遗传距离较小, 亲缘关系紧密, 与 ITS2 结果一致。木瓜属 5 个种的 ITS2 二级结构存在明显不同, 说明 ITS2 二级结构有助于更直观地鉴定物种。

本研究中 ITS2 序列信息聚类结果与 psbA-trnH 基本一致, 5 个不同种质分别聚为一支, 可以很好地区分开, 其中 4 个种的亲缘关系较近, 仅有光皮木瓜表现出显著的单系性; 2 个聚类图中西藏木瓜与毛叶木瓜均聚为一支, 显示密切的亲缘关系, 本研究支持王明明等<sup>[15]</sup>对木瓜属品种亲缘关系的 SRAP 分析的研究结果。同时, 王明明等<sup>[16]</sup>的数量分类学研究表明日本木瓜种系较为独立, 与 psbA-trnH 聚类结果基本一致。ITS2 序列各分支的支持率较高, 在物种水平的鉴定成功率高, 但 psbA-trnH 序列各分支的支持率不高, 主要原因在于种内种间变异位点较少, 各品种区分度不高。以上结论说明采用以 ITS2 序列为主, psbA-trnH 序列为辅的鉴定方法能够从分子角度区分木瓜属的种间遗传性, 对于探讨木瓜属不同物种间的分类学关系以及药材资源的合理开发利用亦具有重要的参考价值。

本研究结果验证了 ITS2、psbA-trnH 序列在木瓜属的鉴别能力, 对于实现木瓜分子水平的快速准确鉴定具有重要意义, 可为研究木瓜种质资源的起源和进化提供参考。本研究中 DNA 条形码候选序列 ITS2 与 psbA-trnH 片段表现了较好的物种鉴定能力, 从分子水平揭示木瓜属各种间的亲缘关系, 适用于木瓜属植物物种鉴定。

志谢: 山东省农业科学研究院生物信息中心王兴军教授的课题组提供本研究分子实验平台。

## 参考文献

- [1] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [2] Ning S P, Yan H F, Gang H, *et al.* Current advances of DNA barcoding study in plants [J]. *Biodiv Sci*, 2008, 16: 417-425.
- [3] 陈士林, 姚 辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.
- [4] 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: e8613.
- [5] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50-57.
- [6] Schultz J, Muller T, Achtziger M, *et al.* The internal transcribed spacer2 database—a web server for (not only) low level phylogenetic analyses [J]. *Nucl Acids Res*, 2006, 34: W704-W707.
- [7] 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.
- [8] 陈 红, 张 雷, 吕晓贞, 等. 适于木瓜属植物 AFLP 分析用 DNA 提取方法研究 [J]. 北方园艺, 2008(12): 161-163.
- [9] 尹长虹, 马 燕, 臧德奎. 木瓜属植物 AFLP 分析体系的建立与应用 [J]. 北方园艺, 2010(13): 116-119.
- [10] 张亚利. 形态学性状及 AFLP 标记在木瓜海棠新种质鉴别和分类中的应用 [J]. 江苏农科学, 2010(4): 145-147.
- [11] 陈 红. 木瓜属种质资源的 RAPD、AFLP 亲缘关系鉴定及遗传多样性分析 [D]. 济南: 山东农业大学, 2008.
- [12] 臧德奎, 陈 红, 郑 林, 等. 木瓜属优良品种亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 林业科学, 2009(8): 39-43.
- [13] 夏永秀, 曾秀丽, 廖明安, 等. SRAP 在西藏木瓜属种质资源研究中的应用 [J]. 果树学报, 2010, 27(6): 1014-1018.
- [14] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [15] 王明明, 陈化榜, 王建华, 等. 木瓜属品种亲缘关系的 SRAP 分析 [J]. 中国农业科学, 2010(3): 542-551.
- [16] 王明明, 王建华, 宋振巧, 等. 木瓜属品种资源的数量分类研究 [J]. 园艺学报, 2009(5): 701-710.