

• 药材与资源 •

钩藤属植物分子鉴定的 DNA 条形码筛选

蔡一鸣¹, 代江鹏¹, 郑雨欣¹, 任英毅¹, 陈浩明¹, 冯婷婷¹, 高晓霞², 朱爽^{1*}

1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广东 广州 510006

2. 广东药科大学药学院 广东 广州 510006

摘要: **目的** 应用分子生物学鉴定技术, 筛选出应用于鉴定钩藤属物种的最佳 DNA 条形码, 建立快速、准确、便捷的钩藤属植物鉴定方法。**方法** 从广东、广西等地收集了 8 个钩藤属物种的叶片、茎枝作为材料, 共计 44 份样品。提取样品总 DNA, 分别对条形码 ITS、matK、psbA-trnH、rbcL、trnL-trnF 序列进行扩增、测序、拼接、校对; 利用 MEGA 7.0 分析比对序列特征; 基于 TaxonDNA 计算种内、种间的遗传距离以分析 barcoding gap 及 Best Match、Best Close Match 评估 DNA 条形码的鉴别能力; 使用 MEGA7.0、Phylosuite 等软件构建单条形码及组合条形码的最大似然法 (maximum likelihood, ML)、最大简约法 (maximum parsimony, MP)、贝叶斯推断法 (bayesian inference, BI) 系统发育树。**结果** 条形码 ITS、matK、psbA-trnH、rbcL、trnL-trnF 序列均扩增成功且具有较高的测序成功率, 其中 psbA-trnH 具有最多的变异位点, ITS 次之, rbcL 最少; Best Match、Best Close Match 与 Barcoding gap 分析结果显示: 5 个单一条形码中, ITS 鉴定钩藤属物种效果突出且具有明显的 Barcoding gap, 而组合条形码 ITS+rbcL 序列表现更为优异。基于所有单一条形码构建的系统发育树, ITS 序列的物种鉴别成功率最高, 能够准确鉴定 8 个钩藤属物种; 基于组合条形码构建的系统发育树, ITS+rbcL 序列具有最高的平均节点支持率, 且该序列集包含的 11 个钩藤属物种均能单独聚为一支。**结论** 应用 ITS+rbcL 的序列组合能够实现钩藤属不同物种的准确鉴定。

关键词: 钩藤属; DNA 条形码; 物种鉴定; ITS; rbcL; TaxonDNA; 系统发育分析**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)06-1828-10**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.026Screening of DNA barcoding sequences for molecular identification of *Uncaria* genusCAI Yi-ming¹, DAI Jiang-peng¹, ZHENG Yu-xin¹, REN Ying-yi¹, CHEN Hao-ming¹, FENG Ting-ting¹, GAO Xiao-xia², ZHU Shuang¹

1. Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidates, School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective In order to establish a rapid, accurate, and convenient approach for identifying species in the *Uncaria* genus, DNA barcoding analysis and molecular biology techniques were performed to screen the best DNA barcode sequences for *Uncaria* species authentication. **Methods** Genomic DNA was extracted from a total of 44 leaf and stem specimens collected from different regions throughout China. The barcodes for ITS, matK, psbA-trnH, rbcL, and trnL-trnF were amplified, sequenced, assembled, and refined. The sequences were aligned and analyzed using MEGA 7.0. Intraspecific and interspecific genetic distances were calculated to analyze barcoding gaps using TaxonDNA software. The ability of the DNA barcodes to identify species was evaluated using the “Best Match” and “Best Close Match” functions in TaxonDNA. MEGA 7.0 and Phylosuite were used to design phylogenetic trees from single and combinations of barcodes based on Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML), and Bayesian Inference (BI) methods. **Results** The ITS, matK, psbA-trnH, rbcL, and trnL-trnF sequences were successfully amplified and had a high sequencing success rate. The psbA-trnH sequence had the highest number of variation sites, followed by ITS and rbcL, which had the lowest number of variation sites. Best Match, Best Close Match, and Barcoding gap analysis showed that ITS had the most

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102418)

作者简介: 蔡一鸣, 男, 本科, 研究方向为中药分析与鉴定。Tel: (020)39352021 E-mail: 2468270590@qq.com

*通信作者: 朱爽, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药分析与鉴定。Tel: (020)39352021 E-mail: 15683727@qq.com

prominent species discriminatory effect among the five single barcodes, while the combination of ITS + rbcL with even better discriminatory performance than any single barcodes. Based on the phylogenetic tree constructed using all of the single barcodes, ITS accurately identified eight *Uncaria* species and had the highest identification success rate when compared to the other barcodes. The combination of ITS + rbcL had the highest average bootstrap support rate based on the phylogenetic tree. All the 11 *Uncaria* species clustered separately into monophyletic clades. **Conclusion** The combination barcodes of ITS + rbcL achieve the accurate identification of *Uncaria* species when the DNA barcoding technology is applied to identify *Uncaria* species.

Key words: *Uncaria*; DNA barcoding; species identification; ITS; rbcL; TaxonDNA; phylogenetic analysis

钩藤是茜草科 (Rubiaceae) 钩藤属 *Uncaria* L. 的多年常绿木质藤本植物。目前, 全世界共发现钩藤属植物 34 种, 其中我国有 11 种及 1 变异种, 对钩藤的记载最早可追溯至汉末陶景弘的《名医别录》^[1], 其气微, 味淡, 性甘、凉, 归肝、心包经, 具有息风定惊、清热平肝等功效^[2]。《中国药典》2020 年版规定钩藤 *U. rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil.、毛钩藤 *U. hirsuta* Havil.、无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb. 和大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall. 的干燥带钩茎枝为中药材钩藤^[2]。

钩藤因其较高的药用价值而受到广泛关注。以往人们认为它的叶子、钩茎具有治疗哮喘、癌症、肝硬化、糖尿病、高血压、中风和风湿病的功效^[3]。过往研究发现钩藤具有多种化学成分, 其中主要成分生物碱类、三萜类和黄酮类具有抗高血压、镇痛和抗氧化等特性。而现代药理学研究表明, 钩藤属植物具有降压、镇静催眠、抗惊厥、抗癫痫、抗炎、抗癌、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、治疗偏头痛等多种作用^[4-9]。

列入《中国药典》的 5 种药用钩藤临床表现优异、用途广泛, 因此需求量亦是剧增。但钩藤属物种繁多, 且不同种的化学活性成分与生物活性存在显著差异, 而属内各物种植物形态相似, 难以分辨, 因此不良商家常将平滑钩藤 *U. laevigata* Wal. ex G. Don、攀茎钩藤 *U. scandens* (Smith) Hutchins 等未列入《中国药典》的钩藤植物充当药用钩藤进行销售贩卖^[10], 此举不仅锐减钩藤疗效, 还严重影响用药安全, 不利于钩藤药材市场的良性发展。以往钩藤属植物药材鉴定多基于传统形态学、显微结构观察, 也有研究引入分子标记方法鉴定钩藤属植物, 如限制片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFL)、随机扩增的多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 等^[11-12]。但以上列举的方法均具有一定的局限性, 当植物形态特征高度相似时, 难以用传统形态学、显微结构观察等方法进行区分。因此为保证钩藤用药安全和消费者生命健康, 亟需建立一种通用、快速、准确

的钩藤药材鉴别方法。

DNA 条形码是将生物体基因组内一段较短的、标准的 DNA 序列作为分子标记来对物种进行鉴定的技术。DNA 条形码技术能够克服形态学鉴定干扰因素多、鉴定准确率偏低等不足。DNA 条形码在药用植物鉴定的应用具有以下意义: (1) 从分子遗传学角度鉴定物种, 避免主观因素造成的错误鉴定。(2) 在分子水平上确保中药材资源的纯正性, 保障用药安全。(3) 为传统中药材市场的监督管理提供行而有效、快捷便利的鉴别方法^[13-14]。

DNA 条形码技术为钩藤属植物鉴定提供了崭新的思路。Tang 等^[15]基于 BLAST1 和最近距离法评估 5 种 DNA 条形码 (ITS、ITS2、matK、psbA-trnH、rbcL) 的钩藤鉴定能力, 得出在这 2 种方法下 ITS2、psbA-trnH 达到 87.0%~95.9% 鉴定成功率, 适合用于鉴别钩藤属物种的结论。Zhu 等^[16]使用 ITS、ITS2 序列, 采用 Taxon DNA、构建系统发育树、分析 ITS2 二级结构等方法鉴定钩藤属物种, 得到的结果表明基于 Taxon DNA 方法的 ITS、ITS2 序列达到 94.69%~96.97% 的鉴定成功率, 且 ITS 系统发育树较 ITS2 具有更多单系支; 通过观察 ITS2 二级结构可以区分恒春钩藤 *U. lanosa* Wall. f. *setiloba* (Benth.) Ridsd 和云南钩藤 *U. yunnanensis* K. C. Hsia。但以往研究大多基于单条形码, 针对组合条形码鉴定能力的探究甚微。因此本研究采集涵盖 8 个钩藤物种的 44 份样品, 结合从 GenBank 下载的钩藤序列构建钩藤属物种单一条形码 (ITS、matK、rbcL、psbA-trnH、trnL-trnF) 及组合条码数据集, 并利用基于距离 (TaxonDNA)、系统发育方法分析筛选出鉴定钩藤属植物的最佳 DNA 条形码。

1 材料

本研究从广东、广西、贵州、云南、湖南、重庆等地收集了涵盖 8 个钩藤物种的 44 份样品, 并交由广东药科大学曾常青教授鉴定分类。样品信息详见表 1。

2 方法

2.1 DNA 提取

DNA 由广东美格基因科技提供的植物总 DNA 提取试剂盒提取。使用 5 种条形码 (ITS、matK、

rbcL、psbA-trnH、trnL-trnF) 的通用引物对其进行 PCR 扩增。PCR 反应体系、扩增引物等详见表 2 和表 3。所有扩增产物交由北京睿博兴科生物技术有限公司纯化、双向测序。

表 1 样品信息

Table 1 Experimental sample information

样品	凭证号	样品类型	采集地	样品	凭证号	样品类型	采集地
侯钩藤 <i>U. rhynchophylloides</i>	GT-1	叶片	广东肇庆	华钩藤 <i>U. sinensis</i>	GT-6	枝干	广西梧州
	GT-16	枝干	广东肇庆		GT-7	枝干	贵州
	GT-35	叶片	广东肇庆		GT-34	叶片	贵州安顺
钩藤 <i>U. rhynchophylla</i>	GT-8	枝干	广东广州	北越钩藤 <i>U. homomalla</i>	GT-M	叶片	广东广州
	GT-17	叶片	广东清远		GT-I	叶片	云南昆明
	GT-18	叶片	广东韶关	毛钩藤 <i>U. hirsuta</i>	GT-2	叶片	广东广州
	GT-19	叶片	贵州贵阳		GT-12	叶片	广西梧州
	GT-20	叶片	广东梅州		GT-13	枝干	广东肇庆
	GT-21	叶片	广东清远	无柄果钩藤 <i>U. sessilifructus</i>	GT-10	叶片	广西南宁
	GT-22	叶片	广西梧州		GT-15	枝干	广西南宁
	GT-24	叶片	广西梧州		GT-23	叶片	广西南宁
	GT-25	叶片	广东广州		GT-30	叶片	广西南宁
	GT-26	叶片	广东梅州		GT-B	叶片	广西南宁
	GT-27	叶片	贵州天柱		GT-K4	叶片	云南昆明
	GT-28	叶片	贵州麻江	大叶钩藤 <i>U. macrophylla</i>	GT-KB	叶片	云南昆明
	GT-31	叶片	贵州开阳		GT-3	叶片	广东肇庆
	GT-32	叶片	广西南宁		GT-11	叶片	广西南宁
	GT-H	叶片	重庆金佛		GT-14	枝干	广东肇庆
	GT-Hunan	叶片	湖南怀化		GT-29	叶片	广东广州
	GT-GZY	叶片	广东广州		GT-33	叶片	广西南宁
华钩藤 <i>U. sinensis</i>	GT-MZh	叶片	广东梅州	平滑钩藤 <i>U. laevigata</i>	GT-A	叶片	云南昆明
	GT-4	叶片	重庆金佛		GT-K6	叶片	云南昆明

表 2 PCR 扩增体系

Table 2 PCR amplification procedures

条形码	PCR 扩增反应参数	PCR 扩增反应体系
ITS	95 °C、3 min; 95 °C、1 min, 56 °C、50 s, 72 °C、55 s, 30 循环; 72 °C、10 min	0.2 μL HiFi DNA 聚合酶 (5 U·μL ⁻¹)
atK	95 °C、4 min; 92 °C、30 s, 55 °C、30 s,	0.4 μL 正向引物(10 μmol·L ⁻¹)
psbA-trnH	72 °C、1 min, 35 循环; 72 °C、10 min	0.4 μL 反向引物 (10 μmol·L ⁻¹)
rbcL	72 °C、1 min, 35 循环; 72 °C、10 min	1.6 μL dNTPs (2.5 mmol·L ⁻¹) 2.0 μL 10×Buffer I
trnL-trnF	94 °C、5 min; 94 °C、45 s, 50 °C、45 s, 72 °C、90 s, 30 循环; 72 °C、5 min	2.0 μL DNA 模板 15.4 μL ddH ₂ O

表 3 PCR 扩增引物

Table 3 PCR amplification primers

条形码	引物名称	引物序列 (5'-3')	文献
ITS	ITS5(F)	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	17
	ITS4(R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	18
matK	matK_F	CGTACAGTACTTTTGTTTACGAG	18
	matK_R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC	
psbA-trnH	psbA_F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	19
	trnH_R	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	20
rbcL	rbcLa_F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	21
	rbcLa_R	GTAAAATCAAGTCCACCCYCG	
trnL-trnF	e (F)	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	22
	f (R)	ATTTGAAGTGGTGACACGAG	

2.2 数据分析

测序后得到的原始序列经 DNASTAR 7.1 软件拼接、校对, 拼接所得的序列再通过与 GenBank 已有的钩藤序列进行比对, 以确保所得序列的正确性。测序所得序列协同 GenBank 下载的钩藤序列按所属条形码归类并导入 MEGA7.0 进行多序列比对, 计算序列长度、变异和信息位点等。本研究从 GenBank 所获取的序列列于表 4。基于凭证号

(voucher number) 组合钩藤属各单条形码, 拼接形成双组合、3 组合条形码。而后对完成拼接的组合条形码进行初步筛选, 筛选的标准包括条形码所覆盖的物种数和条形码数。筛选的意义在于避免实验结果因样本容量过小而出现偏差, 保证实验的客观性及结果的可信度。单条形码或组合条形码中仅含有一条序列的物种将被剔除, 因其缺乏同类参照, 在分析过程中必然会归到错误的种类。

表 4 从 GenBank 获取的钩藤条形码序列
Table 4 *Uncaria* barcodes sequences downloaded from GenBank

条形码	物种拉丁名	登录号
ITS	<i>U. hirsuta</i>	KM057049-51、GU937110、HW521823、HW521850-52
	<i>U. homomalla</i>	KF881250-6、KM057053、HW521822、HW521849
	<i>U. laevigata</i>	KF881266、KF881269-70、HW521826、HW521862-3
	<i>U. lancifolia</i>	KF881262-4、KM057052、HW521824、HW521853-5
	<i>U. macrophylla</i>	KF881257-61、KM057045-7、HW521827、HW521864-8
	<i>U. rhynchophylla</i>	KF881265、KM057043、AJ346900、HW521818、HW521829-38
	<i>U. scandens</i>	KF881274、KF881276-80、HW521821、HW521845-8
	<i>U. sessilifructus</i>	KF881249、KM057048、HW521825、HW521856-61
	<i>U. sinensis</i>	KF881271-73、FJ980386、HW521819、HW521839-42
	<i>U. yunnanensis</i>	KF881281-4、HW521828、HW521869
matK	<i>U. hirsuta</i>	KM057059-60
	<i>U. homomalla</i>	KM057062
	<i>U. laevigata</i>	KX911093
	<i>U. macrophylla</i>	KM057055-7
	<i>U. rhynchophylla</i>	KM057054、KP093879-80
	<i>U. sessilifructus</i>	KM057058
	<i>U. tomentosa</i>	KJ594075-7
psbA-trnH	<i>U. hirsuta</i>	KM057038-40
	<i>U. homomalla</i>	KF881163-9、KM057042
	<i>U. laevigata</i>	KF881179-82
	<i>U. macrophylla</i>	KF881170-5、KM057033-5、GQ435234-5
	<i>U. rhynchophylla</i>	KM057031-2、KX346922、KX346980
	<i>U. scandens</i>	KF881185-9、KF881160-2、KM057036-7
	<i>U. sinensis</i>	KF881183-4、GQ435236
	<i>U. yunnanensis</i>	KF881191、KF881193-4
rbcL	<i>U. appendiculata</i>	JF738676、JF738785、JF739007
	<i>U. elliptica</i>	MG816978、MG816980
	<i>U. hirsuta</i>	KM057026-8
	<i>U. homomalla</i>	KF881129-33、KM057030、KC737739
	<i>U. laevigata</i>	KF881142、KF881144、KX910917、KF181471
	<i>U. lancifolia</i>	KF881140-1、KC737740、KF181540
	<i>U. lanosa</i>	KC737741、KU853145
	<i>U. macrophylla</i>	KF881134-9、KM057021-3、GQ436558-9
	<i>U. rhynchophylla</i>	KM057019-20、KP094819-20
	<i>U. scandens</i>	KF881149-55、KC737742
	<i>U. sessilifructus</i>	KF881122-8、KM057024
	<i>U. sinensis</i>	KF881146-8、GQ436560
	<i>U. tomentosa</i>	GQ852363、KJ594549-52
	<i>U. yunnanensis</i>	KF881156-9
	<i>U. homomalla</i>	KC737835
	<i>U. lanosa</i>	KC737837、KU853207
trnL-trnF	<i>U. rhynchophylla</i>	AB178636、KT218954、AJ346959
	<i>U. tomentosa</i>	GQ852564、AF152690

2.3 基于 TaxonDNA 的距离计算和物种鉴定

钩藤属物种的种间、种内距离由软件 TaxonDNA 基于 Kimura-2-Parameter (K2P) 双参

数算法模型计算。使用 TaxonDNA 的 “extreme pairwise” 函数计算每个物种所有序列的最小种间距离和最大种内距离, 再将不同序列的距离信息

绘成散点图；若序列最大种内距离与最小种间距离有较大差值，则认为其具有较为显著的 Barcoding gap。

本研究采用 TaxonDNA 软件的“Best Match (BM)”“Best Closed Match (BCM)”功能计算钩藤属各条形码的鉴别成功率，并以此作为 DNA 条形码鉴别能力的指标之一。BM 通过查询目标序列与所有同种序列具有的最小距离，以此为基准分配目标序列；BCM 则在 BM 算法的基础上设置了 5% 的阈值（即所有种内距离的 95%）^[23]，超过这个阈值的查询序列被分配为“without any match”，即“no match”。

2.4 系统发育分析

本研究采用最大似然法（maximum likelihood, ML）、最大简约法（maximum parsimony, MP）、贝叶斯推断法（bayesian inference, BI）构建序列数据集系统发育树。使用 MEGA7.0 软件构建 ML 系统发育树，算法模型由 MEGA7.0 的“Find best DNA/Protein model”功能演算决定，设置 1000 次步长检验并删除空位（Gap）或缺失数据（Missing data）。同样使用 MEGA 构建 MP 系统发育树，采用 Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) 算法，设置 1000

次步长检验并删除空位（gap）或缺失数据（missing data）。

基于贝叶斯原理结合 Phylosuite 软件构建 Mrbayes 系统发育树，选择 Workflow“Selete best-fit model then build BI tree”；Modelfinder 序列类型选择“DNA”，Mrbayes 所用 MCMC 参数：代数（generations）= 5 000 000、取样频率（sampling freq）= 100、链数（number of chains）= 4、Burnin Fraction = 0.25。运算结果保存为 *.tre 格式。

3 结果与分析

3.1 扩增、测序结果与 DNA 条形码序列特征

本实验对所有样品的条形码 ITS、matK、psbA-trnH、rbcL、trnL-trnF 序列进行 PCR 扩增与测序，得到相应的扩增、测序成功率和序列特征信息列于表 5。经实验从 44 份样品中获取了 213 条序列。将实验得到的序列与 GenBank 下载的 248 条序列整合为序列总数为 461 的数据集，数据集涵盖钩藤属 19 个种。其中 matK 序列比对长度最长，为 841 bp。psbA-trnH 序列的变异位点数量最多，ITS 序列变异位点数仅次于 psbA-trnH。rbcL 序列涵盖最多钩藤种，但变异位点、简约信息位点均少于其他 4 个条形码。

表 5 序列特征

Table 5 Sequence characteristic

项目	ITS	matK	psbA-trnH	rbcL	trnL-trnF
扩增成功率/%	100.00	100	100	100	100
测序成功率/%	97.73	86.36	100	100	100
物种数	15	10	11	19	14
比对长度/bp	687	842	356	553	403
变异位点数	90	47	141	15	30
简约信息位点数	63	38	90	11	20
种内距离	0~2.48	0~1.33	0~7.92	0~0.79	0~0.81
种间距离	0~5.38	0~3.18	2.32~9.25	0~1.63	0~4.32

3.2 基于 TaxonDNA 的条码 Barcoding gap 分析和物种鉴定能力评估

理想的 DNA 条形码种内距离应明显小于种间距离，两者之间存在着显著的差距，即为“Barcoding gap”^[24]。本研究运用 TaxonDNA 的“extreme pairwise”函数得到的物种距离数据，以物种最大种内距离为 X 轴，以最小种间距离为 Y 轴绘制散点图，如图 1 所示。散点图上另绘一条 1:1 斜线，落在斜线之上的数据呈现出 Barcoding gap。各条形码中每

条序列对应的最大种内距离数值小于其最小种间距离的数据个数与总序列数的比值代表该条形码的 Barcoding gap 的显著程度，比值越大则该条形码 Barcoding gap 越显著。单条形码中 ITS (67.3%) 的 Barcoding gap 最为显著，随后依次是 trnL-trnF (37.3%) > matK (23.6%) > psbA-trnH (17.6%) > rbcL (6.03%)。组合条形码 ITS+rbcL (74.6%) > ITS+psbA-trnH (69.9%) > ITS+psbA-trnH+rbcL (63.4%) > matK+rbcL (44.2%) > psbA-trnH+rbcL

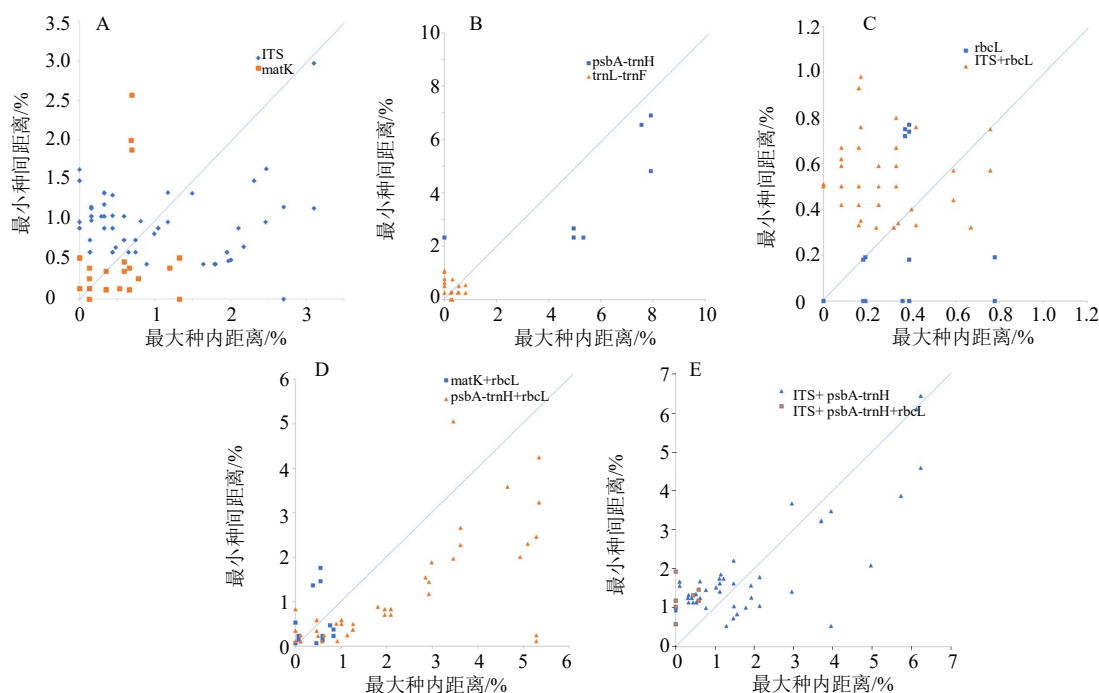


图 1 Barcoding gap 分布

Fig. 1 Distribution of barcoding gaps

(38.3%)。

采用 TaxonDNA 软件的 BM、BCM 功能计算钩藤属各条形码的鉴别成功率。结果显示, BM 中单条形码 ITS 的鉴别成功率最高(97.19%), psbA-trnH (94.44%)、matK (89.09%) 次之, rbcL (21.55%) 表现最差, 鉴别成功率仅 21.55%; 在 BCM 中 ITS、matK 等 DNA 条码鉴别成功率与在 BM 中得到的结果基本一致。但 psbA-trnH 的鉴别率跌至 77.7%, 其原因是 psbA-trnH 在 BCM 分析中, 部分序列超过阈值 5% 被归为 “no match”; BM、BCM 算法中组合条形码的 ITS+rbcL (98.73%)、ITS+psbA-trnH (97.26%)、matK+rbcL (96.15%) 均具有优异的鉴别率。其中 ITS+rbcL 表现最佳且覆盖钩藤属种最多(11 种), 鉴别成功率高达 98.73%。见图 2。

3.3 分子系统发育分析

利用软件 MEGA7.0、Phylosuite 构建 ITS、matK、psbA-trnH、rbcL、trnL-trnF 5 个 DNA 条形码及其组合条形码的 ML、MP、BI 3 类系统发育树。系统发育分析鉴别结果详见表 6。ITS 序列在 5 个单条形码中的表现最为优异, 将基于核基因的 ITS 序列构建 MP、BI 的分析结果整合到 ML 树上, 最终结果以 ML 法构建的系统发育树展示, 见图 3; ML 树以 T92+G 模型构建发育树; MP 树中 CI

(consistency index) 和 RI (retention index) 分别为 0.780 和 0.980; ML、MP、BI 3 类系统发育分析的平均节点支持率分别为 79.94%、59.8%、0.932。在 ITS 构建的系统发育树 *U. sinensis*、*U. hirsuta*、*U. sessilifructus*、*U. macrophylla* 4 种药用钩藤均单独聚为一支。基于 ITS 序列建立的系统发育树能够在 11 个钩藤属物种中准确区分 8 个物种, 但未能准确地鉴定药典中的 5 种药用钩藤。基于核基因的 ITS 与基于叶绿体基因的 rbcL 的组合条形码 ITS+rbcL 在 3 类系统发育分析方法下 (ML、MP、BI) 5 种药用钩藤均单独聚为一支, 且 ITS+rbcL 序列所覆盖的 11 种钩藤属种均单独聚为一支。同样构建 MP、BI 系统发育树并将分析结果整合到 ML 树上, 最终结果以 ML 法构建的系统发育树展示, 见图 4。ML 树以 T92+G 模型构建系统发育树; MP 树中 CI 和 RI 分别为 0.892 和 0.988; ML、MP、BI 3 类系统发育分析的平均节点支持率分别为 86.0%、78.1%、0.98。*U. rhynchophylla* 与 *U. sinensis* 聚为一支 (自展支持率 > 90%), *U. scandens*、*U. homomalla*、*U. hirsuta* 各自聚为一支后再与 *U. rhynchophylla* 和 *U. sinensis* 聚为一大支 (自展支持率 > 90%)。*U. sessilifructus* 与 *U. laevigata* 聚为一支, 再和 *U. macrophylla*、*U. yunnanensis* 聚为一大支。



图 2 各 DNA 条码物种鉴定率

Fig. 2 Species identification rates of cotnsidered barcoding

表 6 系统发育分析鉴别结果

Table 6 Results of identification based on phylogenetic analysis

条码	比对长度/bp	覆盖物种数 ¹	鉴别成功率 ² /%	鉴别药用钩藤物种数
ITS	687	11	72.73	4
matK	842	9	22.22	1
psbA-trnH	356	10	10.00	1
rbcL	553	15	6.67	0
trnL-trnF	403	9	55.56	2
ITS+rbcL	1257	11	100.00	5
ITS+psbA-trnH	1044	10	90.00	5
matK+rbcL	1399	8	50.00	2
psbA-trnH+rbcL	898	10	50.00	3
ITS+psbA-trnH+rbcL	1596	10	90.00	5

1-删除仅有一条序列的物种后得到的物种覆盖数 2-系统发育树中单独聚为一支的物种数与覆盖物种数的比值

1-Number of species was gotten by deleting the species that only have one single sequence 2-success rate is the ratio of the number of species clustered into a single branch in a phylogenetic tree to the number of species

组合条码筛选过程中发现其他组合条形码如 ITS+psbA-trnH 所构建的系统发育树中 5 类药用钩藤虽能单独聚为一支,且在 ITS+psbA-trnH 所覆盖的 10 个钩藤属物种中能够准确区分 9 种,但整体上 ITS+rbcL 在鉴定准确性、覆盖物种数有着更为优异的表现。

4 讨论

本实验选用 5 个条形码(ITS、matK、psbA-trnH、

rbcL、trnL-trnF) 进行鉴定钩藤属物种最佳 DNA 条形码的筛选研究,在全国范围内采集的 44 份样品中,5 个条形码均 PCR 扩增成功且具有较高的测序成功率。应用 Barcoding gap 分析、Best Match 和 Best Close Match 物种鉴定、系统发育分析等分析方法综合评估各条形码的鉴别能力,以此筛选出鉴定钩藤属物种最佳的 DNA 条形码。在本研究的评价体系中,理想的 DNA 条形码应具有显著的 Barcoding

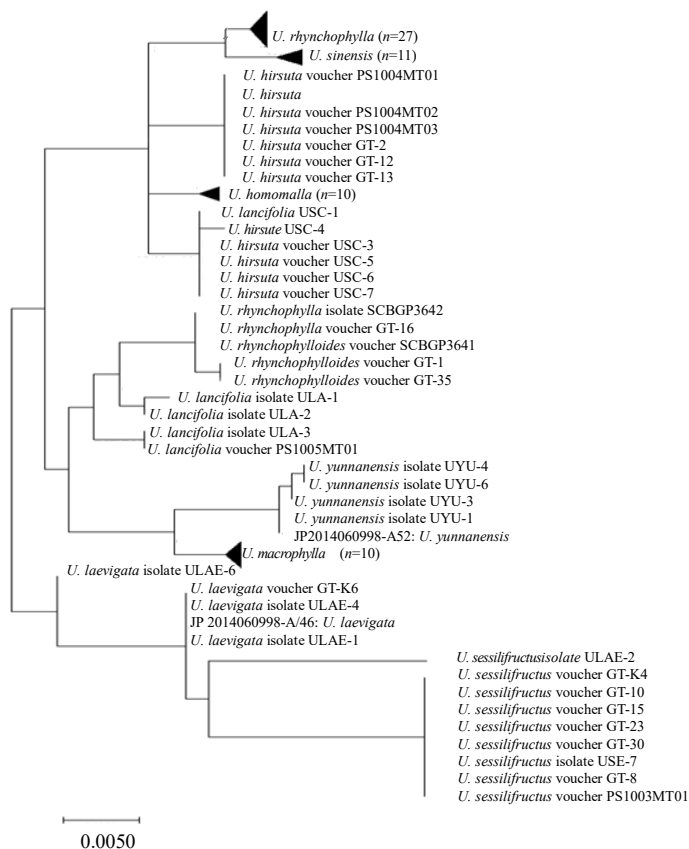


图 3 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from ITS sequences of *Uncaria*

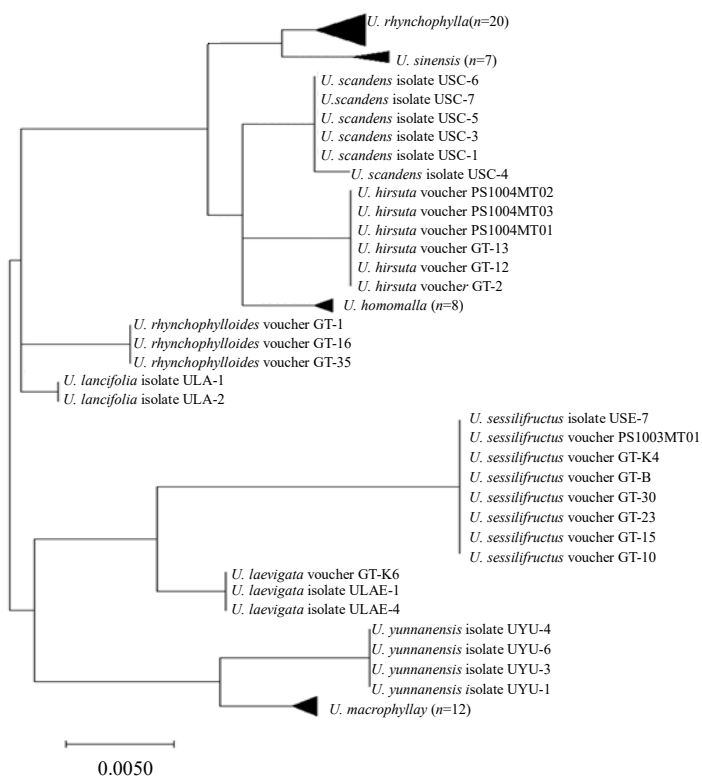


图 4 基于 ITS+rbcL 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree inferred from ITS + rbcL sequences of *Uncaria*

gap 且 BM、BCM 中获得较高的鉴定成功率,同时该条形码所构建系统发育树能够将其所包含的钩藤属各个种区分开且单独聚为一支。DNA 条形码在属内种间需要有明显的遗传变异和分化^[13],同时种内变异足够小。若序列过于保守,未能产生足够的变异,则不利于物种鉴定。因此要求 DNA 条形码具有一定的进化速度。DNA 条形码可分为核糖体基因片段(ITS)和叶绿体基因片段(如 psbA-trnH、matK、rbcL 等)。核糖体基因片段 ITS 展现了较高的扩增、测序成功率,且较之其他片段拥有较多的变异位点,具有足够的遗传变异。姚能等^[25]建立了基于 ITS2 序列的多基原药材钩藤 DNA 条形码鉴定技术方法,能够成功用于钩藤药材及其混伪品的鉴定。ITS 序列由 ITS1、5.8 S 基因、ITS2 区序列构成,因而 ITS 较之 ITS2 序列具有更多的变异位点。本研究发现 ITS 序列具有显著的 Barcoding gap 且在 BM、BCM 中取得单条形码中最高的鉴定率(97.73%),但 3 类系统发育分析表明包括 ITS 在内的任何单条形码均无法准确地鉴定 5 种药用钩藤。

核糖体基因片段 ITS 具有较好的稳定性和准确性。但同样存在局限性,如植物细胞内不同核糖体的进化水平可能存在差异,扩增产物可能被细菌、真菌等微生物的核糖体污染等。而叶绿体在结构、序列上相对保守^[26],进化水平较为一致且扩增产物不受微生物影响。psbA-trnH 序列是叶绿体基因 psbA 与 trnH 之间的一段非编码区,具有较快的进化速度。Tang 等^[15]通过 BLAST1 方法与最近距离法得出 psbA-trnH 序列鉴定钩藤属物种成功率高达 95.9%,推荐 psbA-trnH 序列用于鉴定钩藤属物种。而本研究的结果表明 psbA-trnH 具有最多的变异位点,但其钩藤属物种鉴定成功率并不高,且基于 psbA-trnH 所构建的系统发育树仅成功区分 1 种药用钩藤植物。有研究表明部分物种的 psbA-trnH 序列具有 polyA/T 结构,该结构致使序列较难进行双向测序,也因此限制了 psbA-trnH 序列的应用^[27]。

matK 基因是叶绿体赖氨酸 tRNA 基因高度保守的 2 个外显子之间的内含子序列^[13],进化速率略弱于 ITS,通用性较差,不易扩增、测序。本实验中 matK 测序成功率最低,所构建的系统发育树也仅能区分 1 种药用钩藤。

rbcL 序列位于植物叶绿体基因组的大单拷贝区,具有通用性高、易扩增等特点,但低变异程度限制了其在低分类水平物种鉴定中的应用,适合与

其他序列片段组合形成组合条形码^[27-28]。2009 年国际生命条形码联盟提议将组合条形码 matK+rbcL 作为植物界的通用条形码^[27],本研究结果显示组合条形码 matK+rbcL 虽在 BM、BCM 下有着较高的鉴别成功率,但通过树法所构建的系统发育树只能成功区分 4 种钩藤物种,其中仅包含 2 种药用钩藤。因而 matK+rbcL 并不是最佳的钩藤属物种鉴定组合条形码。在进一步探究组合条形码的鉴定潜能时,笔者发现结合了核糖体基因 ITS 与叶绿体基因 rbcL 得到的组合条形码 ITS+rbcL 在 BM、BCM 中均具有高于 ITS 序列的物种鉴别率(98.73%),同时具有更为显著的 Barcoding gap;在 3 类系统发育分析方法中均能准确区分 5 种药用钩藤植物,而且其所涵盖的 11 种钩藤属物种均单独聚为一支。ITS+rbcL 在与其他组合条形码相比较时,无论是物种鉴定成功率亦或是系统发育分析聚类都有更为突出的指征。综上所述,笔者推荐使用 ITS+rbcL 的组合条形码作为鉴定钩藤属物种首选序列,该组合条形码能提供更多遗传信息以准确鉴定钩藤属物种,为钩藤属药材的种类鉴定和种间分类地位提供分子生物学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

- [1] 梁·陶弘景集. 尚志钩辑校. 名医别录 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 23.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 23.
- [3] Zhang Z L, Song M F, Guan Y H, et al. DNA barcoding in medicinal plants: Testing the potential of a proposed barcoding marker for identification of *Uncaria* species from China [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 60: 8-14.
- [4] 黄宝媛. 钩藤生物碱逆转肿瘤多药耐药活性及机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [5] 李博, 李庆, 宋素异, 等. 钩藤总生物碱对腹腔粘连大鼠内皮功能、炎症介质和粘连组织相关因子表达的影响 [J]. *世界临床药物*, 2017, 38(12): 815-821.
- [6] 孙娜, 黄晏, 周文霞, 等. 钩藤源生物碱对 LPS 所致认知功能损伤的作用初探 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(6): 463-464.
- [7] 彭春燕. 基于 ADME 和 Lipidomics 探讨巴利森苷 A-异钩藤碱组中药对偏头痛模型大鼠的作用 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [8] 严愉妙. 广东钩藤属植物的活性成分含量测定及其药理作用的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [9] 江芳, 郭娜, 童文琴, 等. 钩藤属植物研究进展 [J]. *海峡药学*, 2017, 29(4): 5-13.
- [10] 杨楠楠, 黄小敏, 盖亚男, 等. 6 种不同基源钩藤药材

- 的显微鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 52-58.
- [11] 朱爽, 陈剑平, 刘嘉敏, 等. 两种大叶钩藤 ITS 序列的 RFLP 分析 [J]. 海峡药学, 2012, 24(1): 42-44.
- [12] 徐鹏, 吴耀生, 黄瑞松, 等. 3 种广西钩藤属药用植物的 RAPD 多态性分析 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 703-705.
- [13] 蔡金龙, 谢世清, 张广辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(3): 452-464.
- [14] Han J P, Pang X H, Liao B S, *et al.* An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18723.
- [15] Tang Y L, Wu Y S, Huang R S, *et al.* Molecular identification of *Uncaria* (Gouteng) through DNA barcoding [J]. *Chin Med*, 2016, 11: 3.
- [16] Zhu S, Li Q W, Chen S C, *et al.* Phylogenetic analysis of *Uncaria* species based on internal transcribed spacer (ITS) region and ITS2 secondary structure [J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 548-558.
- [17] Uler G. PCR protocols—A guide to methods and applications [J]. *Trends Biochem Sci*, 1990, 15(10): 405-406.
- [18] 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.
- [19] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *Am J Bot*, 1997, 84(8): 1120-1136.
- [20] Tate J A, Simpson B B. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species [J]. *Syst Bot*, 2003, 28(4): 723-737.
- [21] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e508.
- [22] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, *et al.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(5): 1105-1109.
- [23] Meier R, Shiyang K, Vaidya G, *et al.* DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success [J]. *Syst Biol*, 2006, 55(5): 715-728.
- [24] 熊瑶, 金晨, 王晓云, 等. 鸡血藤及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(12): 3274-3283.
- [25] 姚能, 胡超逸, 魏一丁, 等. 基于 ITS2 序列鉴别中药材钩藤及其同属近缘混伪品 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 361-364.
- [26] Group C P W, Hollingsworth P M, Forrest L L, *et al.* A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings Nat Acad Sci*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [27] 赵志浩, 王杰, 李振山, 等. 灰枣和酸枣叶绿体 *trnL-trnF* 基因序列分析 [J]. 河南科学, 2013, 31(11): 1883-1886.
- [28] 李奇威. 基于 DNA 条形码的三种药用植物分子系统学研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.

[责任编辑 时圣明]