

· 基础研究 ·

钩吻属植物及其易混品五指毛桃的
DNA 条形码比较分析[△]王虹¹, 苏畅¹, 张文娴¹, 刘雪婷¹, 吕浩锋¹, 王铁杰¹, 魏锋², 马双成², 王淑红^{1*}

1. 深圳市药品检验研究院, 广东 深圳 518057;

2. 中国食品药品检定研究院 中药民族检定所, 北京 100050

[摘要] 目的: 对钩吻属植物钩吻和北美钩吻进行2种DNA条形码的碱基序列分析, 结合药食同源品种五指毛桃构建系统进化树, 为五指毛桃药材的真伪鉴定提供参考。方法: 对钩吻、北美钩吻和五指毛桃样品进行内部转录间隔区2(ITS2)序列和*psbA-trnH*序列的扩增测序, 比对分析2种DNA条形码扩增产物碱基组成、GC含量、差异位点的差异; 通过构建Kimura 2-parameter(K2P)双参数模型计算和分析种内、种间遗传距离; 基于邻接法构建系统进化树, 分析ITS2序列和*psbA-trnH*序列的鉴定效率。结果: ITS2区和*psbA-trnH*区序列均可作为钩吻属植物与五指毛桃鉴定的DNA条形码序列。其中*psbA-trnH*区在钩吻属种间的碱基序列长度、种间变异位点数量均具有显著差异, 系统进化树的聚类结果稳定性更强, 比ITS2更适用于该属植物样本的鉴别。结论: *psbA-trnH*序列可作为钩吻和北美钩吻鉴定首选DNA条形码, ITS2序列可作为五指毛桃与钩吻属植物鉴定的首选DNA条形码。

[关键词] 钩吻; 北美钩吻; 五指毛桃; DNA条形码; 内转录间隔区; *psbA-trnH*

[中图分类号] R281.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)12-1967-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200315002

**Comparative Analysis of *Gelsemium* and Its Confused Traditional
Chinese Medicine *Ficus hirta* Base on DNA Barcodes**WANG Hong¹, SU Chang¹, ZHANG Wen-xian¹, LIU Xue-ting¹, LYU Hao-feng¹, WANG Tie-jie¹,
WEI Feng², MA Shuang-cheng², WANG Shu-hong^{1*}

1. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China;

2. Institute for Control of Chinese Traditional Medicine and Ethnic Medicine,
National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

[Abstract] **Objective:** To analyze molecular characteristics of *Gelsemium elegans* and *G. sempervirens* based on two types of DNA barcoding sequences, and to develop authentic method for *Ficus hirta* from these two highly venomous species using phylogenetic cluster analysis. **Methods:** The second internal transcribed spacer (ITS2) and *psbA-trnH* sequences were amplified and sequenced. Base composition, GC content and differential sites of different DNA barcodes were compared, and the Kimura 2-parameter (K2P) model was used to calculate the intraspecific and interspecific distances. Finally, two neighbor-joining phylogenetic trees were constructed based on different DNA barcodes. **Results:** ITS2 and *psbA-trnH* sequences could be used as DNA barcoding sequences for the identification of the *Gelsemium* species and *F. hirta*. *PsbA-trnH* sequences presented more significant differences in the length of PCR product sequence and the number of interspecific variation sites between the two *Gelsemium* species, as well as the highly repeatable results in phylogenetic clustering tree. However, ITS2 was still the reliable and prior barcode for the identification of materia medica samples of these species. **Conclusion:** *psbA-trnH* sequence could be the prior DNA barcode for the botanical identification of *G. elegans* and *G. sempervirens*. And ITS2 sequence could be the prior identical DNA barcode for *F. hirta* and the confused *Gelsemium* species.

[△] [基金项目] 深圳市科技计划项目(CXZZ20150529151451703)

* [通信作者] 王淑红, 主任中药师, 研究方向: 中药质量控制及安全性、有效性评价; Tel: (0755)26031743, E-mail: 1779257380@qq.com

[**Keywords**] *Gelsemium elegans* (Gardn. et Champ.) Benth.; *G. sempervirens* (L.) J. St. -Hil.; *Ficus hirta* Vahl.; DNA barcode; ITS2; *psbA-trnH*

钩吻是两广地区的地方习用药材^[1-2],为马钱科植物钩吻 *Gelsemium elegans* (Gardn. et Champ.) Benth. 的干燥根和茎,具有消肿拔毒、祛风止痛的功效。因其为毒性药材,故又名断肠草,在民间多以外敷,用于消肿止痛^[3]。北美钩吻 *G. sempervirens* (L.) J. St. -Hil. 原产于北美,通过园艺引入中国,同为毒性植物^[4]。由于北美钩吻与钩吻为马钱科钩吻属仅有的2个近缘物种,且两者为户外常见的品种,容易被采挖带来误食风险。五指毛桃为桑科植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl. 的干燥根,味甜,性平,具有益气健脾、祛痰化湿,是华南地区习用药食同源的中药材^[5]。近年来,将钩吻的根误认为是五指毛桃而导致的中毒案件时有发生^[6-7],但目前尚无用于区分五指毛桃与钩吻属植物的分子鉴别

方法。本研究采用DNA条形码鉴定技术,选取内转录间隔区2(ITS2)与 *psbA-trnH* 2种序列对钩吻、北美钩吻及易混品种五指毛桃进行测序和分子鉴定,为钩吻属植物的鉴别及确保五指毛桃的药食两用安全性提供参考。

1 材料

1.1 药材

本研究收集的钩吻、北美钩吻和五指毛桃药材样本均经中国食品药品检定研究院张继主任药师鉴定,样品信息见表1。另从GenBank数据库下载钩吻ITS2序列3条、*psbA-trnH*序列4条,北美钩吻ITS2序列1条、*psbA-trnH*序列1条,五指毛桃ITS2序列3条、*psbA-trnH*序列1条,序列信息见表2。

表1 钩吻、北美钩吻和五指毛桃样品信息

物种	样品编号	收集地	序列	GenBank 登录号
钩吻	Ge01	深圳	ITS2	MT272980
			<i>psbA-trnH</i>	MT335879
北美钩吻	Gs01	深圳	ITS2	MT272979
			<i>psbA-trnH</i>	MT335880
五指毛桃	Fh01	深圳	ITS2	MT273012
			ITS2	MT273013
			ITS2	MT273014
	Fh04	深圳市中国科学院仙湖植物园	<i>psbA-trnH</i>	MT330100
			ITS2	MT273015
			<i>psbA-trnH</i>	MT330101

表2 钩吻、北美钩吻和五指毛桃 GenBank 来源序列信息

物种	序列	GenBank 登陆号
钩吻	ITS2	MH813233、MH844623、HG004870
	<i>psbA-trnH</i>	MH837847、MH837848、MH837951、HG005116
北美钩吻	ITS2	DQ358881
	<i>psbA-trnH</i>	MG963263
五指毛桃	ITS2	JQ7733898、KX055739、KX055738
	<i>psbA-trnH</i>	MN364706

1.2 试剂

植物基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司); 2 × Taq PCR Master Mix(北京艾德莱生物

科技有限公司); 引物合成与测序由上海美吉生物医药科技有限公司负责。

1.3 仪器

VERITI 聚合酶链式反应(PCR)仪(ABI公司); Nanodrop 2000 型核酸蛋白分析仪(Thermo公司); PowerPac Basic 型电泳系统(Bio-Rad公司); GBOX F3 型凝胶成像系统(Syngene公司)。

2 方法

2.1 总DNA提取

将植物叶片或药材用无水乙醇擦拭表面消毒,室温放置直至乙醇充分散尽后,用液氮研磨至细粉。

称取细粉 100 mg, 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 于 -20°C 保存备用。

2.2 PCR 扩增与测序

采用 ITS2 和 *psbA-trnH* 条形码通用引物^[8] 进行模板 DNA 质量的考察和 DNA 条形码鉴别, 引物序列见表 3。PCR 反应体积 25 μL , 包含 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μL , 引物(2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 1.0 μL , 总 DNA 2.0 μL , 用灭菌超纯水补足反应体积。ITS2 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s(循环 40 次); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。*psbA-trnH* 条形码的扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$, 1.5 min(循环 30 次); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物经上海美吉医药科技有限公司测序。

表 3 引物序列

名称	序列(5'→3')
ITS2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT
ITS3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
<i>psbA</i> F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
<i>trnH</i> R	CGCGCATGGTGGATTACACAATCC

2.3 分子生物学数据分析

采用 Codon Code Aligner 软件对测序峰图和序列进行校对、拼接并去除正反向引物序列。ITS2 序列需登陆 ITS2 Database 网站 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) 去除各样品序列两端 5.8 S 和 28 S 区。采用 BankIt 工具在 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit/>) 中提交 ITS2 与 *psbA-trnH* 序列。采用 BioEdit 软件进行 ITS2 和 *psbA-trnH* 基因的多序列比对, 查看并分

析碱基变异位点。采用 MEGA 5.1 软件的 Kimura 2-parameter(K2P) 双参数模型计算进行种间、种内遗传距离分析, 并基于邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树。

3 结果

3.1 *psbA-trnH* 序列特征

碱基序列分析结果表明, 钩吻的 *psbA-trnH* 序列长度为 540~546 bp, GC 占比为 26%~27%, 具有 4 种单倍型; 北美钩吻的 *psbA-trnH* 序列与钩吻存在明显差异, 长度仅为 286 bp, GC 占比为 32%~33%, 具有 2 种单倍型; 五指毛桃基原植物粗叶榕样本得到的 *psbA-trnH* 序列长度为 440 bp, GC 占比为 24%, 只有 1 种单倍型(见表 4)。K2P 参考模型计算的种内和种间的遗传距离结果表明, 钩吻、北美钩吻和五指毛桃的 *psbA-trnH* 序列平均遗传距离分别为 0.005 606、0.003 506 和 0, 种内变异较小; 但五指毛桃的 *psbA-trnH* 序列碱基序列与钩吻和北美钩吻具显著差异, 同时钩吻和北美钩吻的最大种内遗传距离小于最小种间遗传距离(见表 4)。但五指毛桃根类药材样本(Fh01、Fh02)未成功扩增出 *psbA-trnH* 序列, 这可能是因为该物种的根部不含有叶绿体, 因此无法得到叶绿体 *psbA-trnH* 基因序列。因此 *psbA-trnH* 序列可作为钩吻和北美钩吻鉴定首选 DNA 条形码。

3.2 ITS2 序列特征

碱基序列分析结果表明, 钩吻的 ITS2 序列长度为 228~230 bp, GC 占比为 72%~73%, 具有 3 种单倍型, 种内变异位点较少; 北美钩吻 ITS2 序列长度为 228~229 bp, GC 占比为 69%~70%, 具有 2 种

表 4 钩吻、北美钩吻 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列分析

序列	物种	GenBank 登录号	单倍型	长度/bp	GC 占比/%	种内变异位点数	最大种内遗传距离	种间变异位点数	最小种间遗传距离
ITS2	钩吻	MH813233、MT272980	A1	230	73	3	0.004 405	26	0.066 07
		MH844623	A2	230	72				
		HG004870	A3	228	72				
	北美钩吻	DQ358881	B1	228	69	7	0.018 200		
		MT272979	B2	229	70				
<i>psbA-trnH</i>	钩吻	MH837847、MT335879	D1	541	26	13	0.007 473	334	0.224 10
		MH837848	D2	540	26				
		MH837951	D3	546	27				
		HG005116	D4	541	26				
	北美钩吻	MC963263	E1	286	32	1	0.003 506		
		MT335880	E2	286	33				

单倍型; K2P 参考模型计算的种内和种间遗传距离结果表明, 钩吻、北美钩吻和五指毛桃的 ITS2 序列的种内的平均遗传距离分别为 0.002 937、0.018 200 和 0.008 016, 种内变异较小; 但五指毛桃的 ITS2 碱基序列与钩吻和北美钩吻具有显著差异, 同时钩吻和北美钩吻的最大种内遗传距离小于最小种间遗传距离(见表 4), 表明 ITS2 序列既可作为钩吻与北美钩吻的 DNA 鉴别条形码, 也可以作为区分五指毛桃与钩吻属植物的 DNA 鉴别条形码。

3.3 系统进化树的构建与聚类分析

基于 ITS2 序列和 *psbA-trnH* 序列采用邻接法分别建立系统进化树, 并以此进行钩吻、北美钩吻和五指毛桃的聚类分析。结果显示, 钩吻和北美钩吻在 2 个系统进化树中均聚集成为第一分支, 五指毛桃聚为另一分支, 此外钩吻和北美钩吻又分别聚为两级分支, 这说明采用 2 种 DNA 条形码序列建立的进化树均能将钩吻属植物与五指毛桃进行有效区分(见图 1~2)。

但在 ITS2 系统进化树中, 钩吻存在不明显的分支亚群, 且支持率较低(支持率为 60%、93%); 而钩吻在 *psbA-trnH* 系统进化树中无分支亚群, 且支持率为 100%。这可能是在不同 DNA 条形码序列中, 钩吻属植物的种内变异和种间差异的结果不同导致。从聚类分析结果的稳定性方面分析, *psbA-trnH* 序列更优于 ITS2 序列。

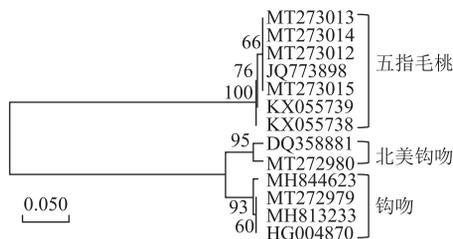


图 1 基于 ITS2 序列构建钩吻、北美钩吻与五指毛桃 NJ 树

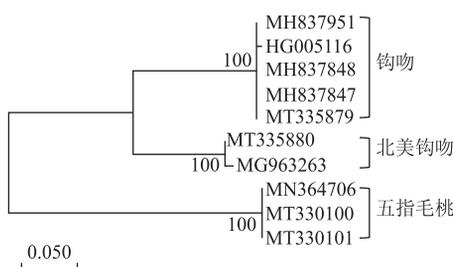


图 2 基于 *psbA-trnH* 序列构建钩吻、北美钩吻与五指毛桃 NJ 树

4 讨论

DNA 条形码技术具有快速、准确等特点, 在物种鉴定领域迅猛发展。对于样本量少、性状相近的中药品种, DNA 条形码技术具有极大优势, 目前已成为中药传统鉴定方法的重要补充^[9-10]。陈士林课题组以大量的药用植物及其相关物种作为研究对象, 对 7 个候选 DNA 条形码进行筛选和深入分析, 最终确定以 ITS2 为主的药用植物鉴定的条形码原则^[11], 目前已收载于《中华人民共和国药典》2015 年版四部“中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则”及一些著作中^[8,12], 对中药 DNA 条形码的标准化做出了卓越的贡献。ITS2 区在蔷薇科、芸香科、菊科等大部分药材品种中具有较高的鉴定成功率, 这是由于 ITS2 区在这些物种间具有较快的进化速率, 因此产生较多的种间差异位点^[13-16]。本研究结果表明, ITS2 区和 *psbA-trnH* 区序列均可作为钩吻属植物鉴定的 DNA 条形码, 但 *psbA-trnH* 区在钩吻属植物中碱基序列长度、种间变异位点数量均具有显著差异, 同时系统进化树聚类结果稳定性更强, 因此 *psbA-trnH* 序列比 ITS2 序列更适合作为钩吻属植物鉴别的 DNA 条形码。*psbA-trnH* 基因是叶绿体 *psbA* 和 *trnH* 基因之间的一段非编码区, 进化速度较快, 虽然目前作为中药基原鉴定的备选 DNA 条形码, 但也有研究表明, 其对于石斛属植物也具有良好的鉴别能力^[17], 同时对于忍冬属植物和连翘属植物的鉴别甚至优于 ITS2 条形码, 甚至还可对连翘药材的产地进行鉴别, 表明对于某些中药品种可将 *psbA-trnH* 作为主要鉴别条形码。

钩吻和北美钩吻是具有多个种内变异位点的近缘植物, 若采用序列相似度或序列变异位点作为鉴别指标, 若物种进化出新的变异位点, 可能会造成检验人员的困扰。采用 DNA 条形码系统进化树进行评价, 聚类结果更直观, 因此更适合质量标准的结果表述, 可作为中药 DNA 条形码方法的另一种结果表述形式。本研究还发现, 钩吻与北美钩吻的 *psbA-trnH* 序列长度存在显著差异, 因此无需进行 PCR 产物的测序, 可直接采用琼脂糖凝胶电泳的方法根据 DNA 条带分子量进行快速鉴定。

钩吻属植物因其花朵繁盛、花香清幽, 是户外常见的花卉园艺植物^[18-21]。但钩吻属植物含有吲哚类生物碱, 也是毒性植物。其中钩吻在我国属于区域性使用的药材, 但因其应用范围较小, 且多以外

用,因此尚未在药用领域发现质量问题。但钩吻作为剧毒的中药材,因其花与金银花相似、根与五指毛桃相似,故常因误认采挖食用而导致中毒事件,造成了严重后果。钩吻属另一物种北美钩吻也为剧毒植物,因此具有较高的安全风险^[22]。本研究采用 ITS2 和 *psbA-trnH* 条形码建立了钩吻、北美钩吻、五指毛桃的鉴别方法,为药食同源的有毒易混品的鉴别提供了新思路,为保障食用和用药安全提供了有效手段。

参考文献

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准[M]. 广州:广东科技出版,2004:147-148.
- [2] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准:第1卷[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2008:184-185.
- [3] 石冬梅,苏燕评,刘浩,等. 闽产钩吻质量标准研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(3):312-317.
- [4] 系统与进化植物学国家重点实验室中国科学院植物研究所. 植物智——中国植物物种信息系统[EB/OL]. (2019-11-23) [2020-02-28]. <http://www.iplant.cn/info/Gelsemium?t=z>.
- [5] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准[M]. 广州:广东科技出版,2004:35-36.
- [6] 张雪宝,阮峰,焦亮,等. 一起钩吻碱甲引起的食物中毒暴发调查[J]. 河南预防医学杂志,2019,30(10):794-796.
- [7] 陈建东,洪佳冬,梁东兴,等. 一起家庭聚集性食物中毒事件原因分析[J]. 华南预防医学,2018,44(2):163-165.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:383-385.
- [9] 张彩云,黄珊珊,颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展[J]. 中草药,2017,48(11):2306-2312.
- [10] 辛天怡,雷美艳,宋经元. 中药材 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中国现代中药,2015,17(2):170-176.
- [11] 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.
- [12] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京:科学出版社,2015:3-513.
- [13] 庞晓慧. 植物 DNA 条形码序列筛选与鉴定研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2010.
- [14] 罗焜,陈士林,陈科力,等. 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.
- [15] GAO T, YAO H, SONG J, et al. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family[J]. BMC Evol Biol, 2010, 10(1):1-7.
- [16] CHEN X, LIAO B, SONG J, et al. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding[J]. Gene, 2013, 530(1):39-43.
- [17] YAO H, SONG J Y, MA X Y, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: The chloroplast *psbA-trnH* intergenic region[J]. Planta Med, 2009, 75(6):667-669.
- [18] 王予婧. 广西药用植物及其造景探索[D]. 广州:华南理工大学,2010.
- [19] 寿海洋. 木质藤本植物在上海园林中的应用现状及建议[J]. 中国园林, 2017, 33(1):78-82.
- [20] 王文通. 盆栽新品黄茉莉栽培技术研究[J]. 北方园艺, 2010, 21(1):105-107.
- [21] 施开鸿,邱敏,邱晔,等. 野生胡蔓藤驯化栽培[J]. 特种经济动植物, 2010, 13(11):35-36.
- [22] 周俊辉,谭伟添,黄婉先. 美国茉莉的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(9):893-894.

(收稿日期:2020-03-15 编辑:田苗)