

基于杜鹃属植物的 DNA 条形码序列筛选*

□石林春 梁宗锁** (西北农林科技大学生命科学学院 陕西 710021)

韩建萍 宋经元 姚 辉 朱英杰 陈士林**

(中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)

摘 要:我国的杜鹃属有毒植物约在 60 种以上,如羊躑躅等药用植物具有强毒付作用,而目前杜鹃属的分类十分复杂。DNA barcoding 技术是一种新的物种鉴定技术,COI 序列已成功应用于动物的鉴定,但是目前国际上还没有找到一个通用序列能鉴定所有植物物种。本文对杜鹃属 257 个物种 ITS、ITS2、matK、PsbA-trnH 序列比较,运用 Wilcoxon 秩和检验比较不同序列的变异性,然后用 Taxon DNA 软件评估这四个序列的 barcoding gap。筛选适合于杜鹃属的 DNA 条形码序列。分析结果表明:matK 和 psbA-trnH 并不适合于杜鹃属的 DNA barcoding 鉴定。ITS2 和 ITS 序列都可以有效的对杜鹃属植物进行 DNA barcoding 鉴定,但 ITS 在物种中的扩增效率较低,因此推荐将 ITS2 序列作为一个潜在的杜鹃属植物 DNA barcoding 鉴定候选序列。

关键词: DNA barcoding ITS2 ITS matK psbA-trnH 杜鹃属

杜鹃属 (*Rhododendron*) 是杜鹃花科 (*Ericaceae*) 下最大的属,有近千种^[1],杜鹃花属植物作为药用植物有着悠久的历史。杜鹃花属植物一些种类中含有可供入药的木藜芦烷类、槲皮素、金丝桃甙等化合物。我国是杜鹃花属最集中的产地,约 530 种^[2],集中分布于西南山区。我国的杜鹃属有毒植物约在 60 种以上,多数为我国所特有,而且大都毒性剧烈,常引起人、畜的中毒。主要有毒种有羊躑躅、大白花杜鹃和牛皮茶等,人误食中毒的症状主要为恶心、呕吐、血压下降和呼吸抑制,一般因呼吸衰竭而死。杜鹃花属植物活性成分有良好的抗菌消炎作用,如秀丽杜鹃,矮枇杷的抗菌作用强于可相当于黄连,闹羊花对

风湿顽痹,伤折疼痛具有镇痛作用^[3]。

杜鹃属虽然早在 1753 年被瑞典植物学家建立,但到目前为止杜鹃属的分类问题依然十分复杂^[4]。自 Sleumer^[5]提出将杜鹃属分为 8 亚属,亚属下分组、亚组的全面分类系统后,不少学者对其进行过修订,主要有 Cullen^[6]的 5 亚属、Chamberlain^[7-8]的 8 亚属、Philipson 等^[9]的 8 亚属、杨汉碧等(1999)的 9 亚属等分类系统,但至今尚未形成统一的权威分类系统。各亚属下组、亚组和种的分类难度也相当大。同名异物、同物异名现象严重。例如:陇蜀杜鹃 (*Rhododendron przewalskii* Maxim)、金背杜鹃 (*R. clementinae* Forrest subsp. *aureodorsale* Fang)、青海杜鹃 (*R. qinghaiense* ching ex W. Y. Wang) 这 3 种的中文名在《中国植物志》中混用严重。此外,根据标本原始记录发现,

收稿日期: 2008-12-1

修回日期: 2009-02-10

* 国家科技部国际合作基金(2007DFA30990): 中药材 DNA 条形码鉴定研究负责人: 陈士林。

** 联系人: 梁宗锁, 研究员, 博导, 主要研究方向: GAP 栽培及生态学研究; 陈士林, 本刊学术副主编, 主要研究方向: 中药资源可持续利用及 DNA 条形码, E-mail: slchen@implad.ac.cn。

某些种有多个地方名,例如:头花杜鹃(*R. capitatum Maxim*)在天祝称达乌里杜鹃,临潭称密林杜鹃,永登称羽裂杜鹃^[10]。这对该属植物的开发利用带来不便。因此,在研究开发利用时要澄清混乱,准确鉴别植物的种类及生药的基源。关于杜娟属花粉的分类已有文献报道^[11-12]。但形态学鉴定受环境等因素影响较大,影响了鉴定的准确性。

DNA barcoding 是由加拿大圭尔夫大学教授、安大略生物多样性研究所所长 Paul Hebert 于 2003 年提出的^[13-14],即利用一段短的、标准的 DNA 片段(400~800bp)对物种进行快速、准确的鉴定,对新物种的发现和珍稀濒危物种的保护具有重要的意义,成为近几年国际生物多样性研究的一个热点。目前通过 CO I 对动物物种进行鉴定已经取得了很大的成功,对于植物的 DNA barcoding 鉴定研究来说,至今没有找到一个通用的 DNA barcoding 序列^[15-16],推荐较多的序列有 psbA-trnH^[15,17,22]、ITS^[15]、matK^[16]等序列。

本文通过对该属 257 个物种 ITS、ITS2、matK、Ps-bA-trnH 序列比较,尝试筛选出一条适用于该属植物的 DNA barcoding 鉴定序列,为杜娟属植物的 DNA barcoding 鉴定提供依据。

一、材料与方法

1. 材料

从 Genbank 上获得所有杜娟属 257 个的条形码序列,登录号为(AB105220.1-AB105238.1, AB300708.1-300711.1, AF072477-452236.1.....)(表略)。其中 ITS、ITS2 序列 140 个,psbA-trnH 基因间隔区 63 个,matK 序列 131 个。

2. DNA 序列

用 Condon Aligner 切取所用序列。其中 ITS 序列切除 18S 和 26S 片段,仅包含 ITS1、5.8S 和 ITS2 片段;ITS2 切除 5.8S 和 ITS1 片段,仅包含 ITS2

区段;matK 用 390F:CGATCTATTTCATTCAATATTTTC 和 1326R:TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT 引物^[18]切除获得。

3. 序列分析

通过 Mega4.0 软件计算序列的 K-2-P 距离;通过 Meyer 和 Paulay^[19]的方法分析比较序列的种内和种间变异;比较通过 Wilcoxon 检验分析不同序列之间的变异性;通过比较序列种内和种间变异的分布评估 barcoding gap^[19]两个参数来评估物种不同序列的种间差异①“all interspecific distances”物种种间变异的平均值②“The minmum interspecific distance”物种种间最小变异的平均值。用三个参数来评估物种不同序列的种内差异^[19]①“mean all intraspecific distances”物种种内变异的平均值②“mean theta”不同物种种内平均变异的平均值,以消除不同物种采样数目不同造成的误差③“avarage coalescent deapth”物种种内最大变异的平均值。

二、结果与分析

1. 序列种内和种间差异

从表 1 中可以看出 ITS2 序列的种间变异最大,ITS 序列次之,ITS2 序列种内变异最大;ITS 和 ITS2 序列种间最小变异均大于其种内最大变异。因此 ITS2 和 ITS 序列都比较适合杜娟属植物 DNA barcoding 鉴定。

2. 不同序列变异性的比较和 Barcoding Gap 的评估

从 wilcoxon 秩和检验来看(见表 2),ITS2 序列的变异性大于 ITS,matK,psbA-trnH 序列的变异性;ITS 序列的变异性大于 psbA-trnH 和 matK 序列的变异

表 1 四个序列在杜娟属种内种间变异

平均	ITS2	ITS	psbA-trnH	matK
All intraspecific distances	0.0015±0.0029	0.0009±0.0013	-	0.0010±0.0014
Theta	0.0025±0.0042	0.0013±0.0016	-	0.0009±0.0014
Coalescent depth	0.0031±0.0046	0.0017±0.0018	-	0.0010±0.0015
all interspecific distances	0.0492±0.0217	0.0369±0.0147	0.0248±0.0183	0.0098±0.0068
The minimum interspecific distance	0.0033±0.0069	0.0030±0.0056	0.0054±0.0099	0.0018±0.0035

性。从不同序列种间变异和种内变异的分布图(图1)来看,ITS2和ITS序列都有明显的 barcoding gap,种内变异和种间变异重合较少;matK序列的种间变异偏小,正态分布图整体向种内变异方向倾斜。

三、讨论

本文对从 Genbank 上下载杜娟属植物的 ITS, ITS2, matk 和 psbA 四组候选条形码序列进行了分析。matK 序列和 psbA 序列都不适合作为杜娟属 DNA barcoding 鉴定序列。ITS2 序列种间变异要大于 ITS 序列。这主要是因为,ITS 序列的变异主要集中在 ITS1 区段(平均长度为 250bp 左右)和 ITS2 区段(平均长度 250bp 左右),中间有大约 160bp 的 5.8S 高度保守区,因而降低了其种间变异,从公布的 ITS 通用引物来看,其在各个科属的通用性较差^[15,18]。尤其是对于经加工炮制干燥的药材,部分 DNA 已降解,无法获得 PCR 产物,而 ITS2 区段较短,适用于已降解的药材^[20-21]。因此推荐考虑将 ITS2 序列作为一个潜在的杜娟属植物 DNA barcoding 鉴定序列。

参考文献

- 1 杨汉碧,方瑞征,金存礼.中国植物志第五十七卷:第1分册.1999,北京:科学出版社.
- 2 陈俊愉.中国花卉品种分类学.北京:中国林业出版社,2001.
- 3 陈刚,金慧子,李雪峰,等.杜娟属植物的化学成分及药理研究进展.药学实践杂志,2008,26(4):255-257

表2 不同序列变异的 wilcox 秩和检验

	W +	W -	Relative Ranks, n, P value	Result
ITS2	PsbA - trnH	W +=145.36, W -=66.13, N=23, p<=4.87E-25		ITS2>PsbA - trnH
ITS2	ITS	W +=13813.52, W -= 5276.83, N=225, p<=0.00		ITS2>ITS
ITS2	matk	W += 494.79, W -=2351.50, N=44, p<=2.42E-152		ITS2>matK
ITS	PsbA - trnH	W +=103.99, W -=108.03, N=23, p<=6.66E-8		ITS>PsbA - trnH
ITS	matk	W +=497.37, W -=82.79, N=44, p<=3.27E-148		ITS>matK
PsbA - trnH	matk	W +=3.5, W -=0.0, N=4, p<= 0.0277		PsbA - trnH>matK

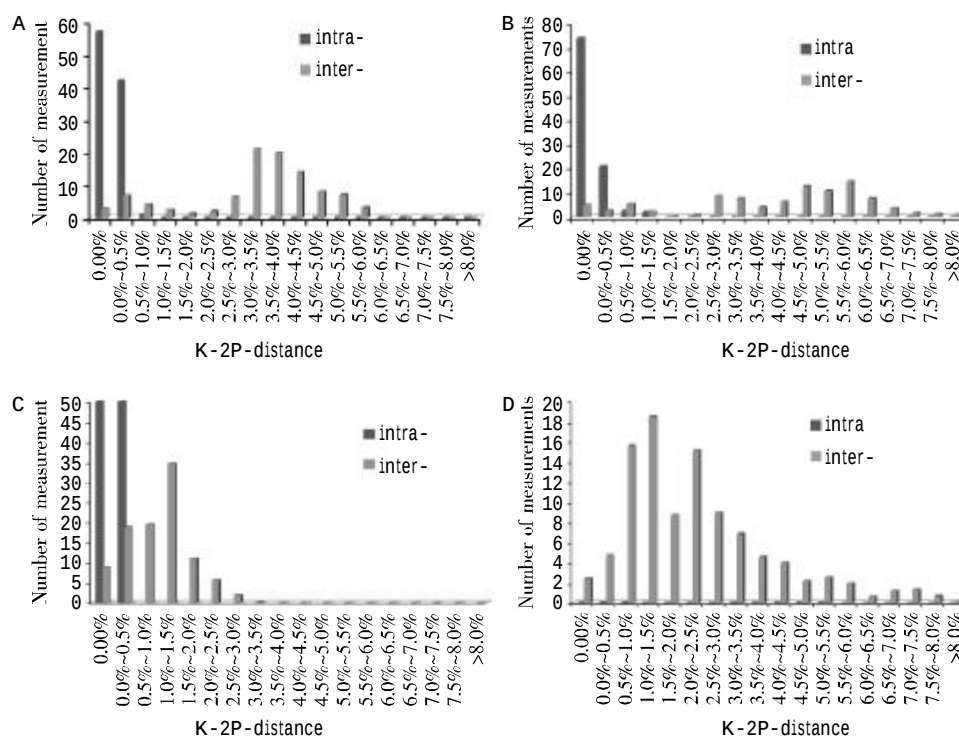


图1 杜娟属四个序列的种内变异和种间变异分布图

- 4 段国锋,肖千文.杜娟属植物基因组 DNA RAPD-PCR 反应体系的优化.山西农业大学学报,2008,28(2):136-138.
- 5 Sleumer H. Einsystemdergattung Rhododendron L. Bot Jahrb Syst, 1949.74: 511-553.
- 6 Cullen J. A revision of Rhododendron L. Subgenus Rhododendron Section Rhododendron and Pogonanthum. Notes Royal Botanic Garden Edinburgh, 1980, 39(1):1-208.
- 7 Chamberlain DF, Hyam R, Argent G, et al. The genus Rhododendron its classification and synonymy. Edinburgh: Royal Botanic Garden Edinburgh, 1996.
- 8 Chamberlain DF, Rae SJ. A revision of Rhododendron IV: Subgenus

- Tsutsusi. *Edinburgh J Bot*, 1990, 47:89~200.
- 9 Philipson M N, Philipson W R. A preliminary synopsis of the genus *Rhododendron* III. *Notes Royal Botanic Garden Edinburgh*, 1982, 40 (1): 225~227.
 - 10 武喜红. 甘肃省杜鹃属药用植物资源调查. *卫生职业教育*, 2008, 26 (7):149~150.
 - 11 周兰英, 王永清, 张丽. 26 种杜鹃属植物花粉形态及分类学研究. *林业科学*, 2008, 44(2):16~19.
 - 12 毛加宁. 杜鹃花属 4 种植物花粉形态特点研究. *西南农业大学学报*, 2000, 22(6):525~529.
 - 13 Paul D. N. Hebert, Alina Cywinska, Shelley L. Ball et al. de Waard. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 2003a, 270:313~321.
 - 14 Paul D. N. Hebert, Sujeevan Ratnasingham and Jeremy R. de Waard. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 2003b, 270:S96~S99.
 - 15 W. John Kress, Kenneth J. Wurdac, Elizabeth A. Zimmer, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS*. 2005, 102 (23):8369~8374.
 - 16 Renaud Lahaye, Michelle van der Bank, Diego Bogarin, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *PNAS*. 2008, 105 (8):2923~2928.
 - 17 W. John Kress, David L. Erickson. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLOS ONE*. 2007, 6(508):1~10.
 - 18 Lahaye, R.; Van der Bank, M.; Bogarin, D.; et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105, (8), 2923~2928.
 - 19 Christopher P. Meyer, Gustav Paulay. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *Plos Biology*. 2005, 3 (12):2229~2238.
 - 20 Shu -Jiau Chiou, Jui -Hung Yen, Cheng -Li Fang etc. Authentication of Medicinal Herbs using PCR -Amplified ITS2 with Specific Primers. *Planta Med*, 2007, 73:1421~1426.
 - 21 韩建萍, 石林春, 陈士林, 等. ITS2 序列鉴定筋骨草及其近缘种. *世界科学技术-中医药现代化*, 2008, 10(6):86~89.
 - 22 Hui Yao, Jing -Yuan Song, Xin -Ye Ma, et al. Identification of *Dendrobium* Species by a Candidate DNA Barcode Sequence: the Chloroplast *psbA-trnH* Intergenic Region. *Plant Medica*, (in press).

Screening Potential DNA Barcode Regions in *Rhododendron*

Shi Linchun, Liang Zongsuo

(Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shan'xi 712100)

Han Jianping, Song Jingyuan, Yao Hui, Zhu Yingjie, Chen Shilin

(Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, 100193 P.R. China)

In China, there are more than sixty types of toxic plants *Rhododendron*, including *Rhododendron molle* (Blum) G. Don, a traditional medicine. So far no techniques or methods have been found to effectively identify all the *Rhododendron* plants. DNA barcoding is a technique to identify species using DNA sequences from a small fragment of the genome. DNA barcoding, such as COI sequence, has been used to identify animal species. Unfortunately, there has been no universally accepted barcode system applicable to plants. This study compared four potential barcodes (ITS, ITS2, *matK*, and *psbA-trnH*) of 257 species of *Rhododendron*. Wilcoxon signed rank tests were used to analyze the variability of sequences, and Taxon DNA was used to estimate the barcoding gap, so as to screen out the right barcodes for identifying the species of *Rhododendron*. Screening results showed that neither *matK* nor *psbA-trnH* could be used to identify *Rhododendron* on its own. On the contrary, both ITS and ITS2 were proved effective for the function. Due to the low success rate of PCR for ITS, ITS2 sequence can be taken as a potential barcode for identifying the species of *Rhododendron*.

Keywords: DNA barcoding; ITS2; ITS; *matK*; *psbA-trnH*; *Rhododendron*

(责任编辑:王 瑀, 责任译审:邹春申)