

药用植物三尖杉及其同属易混物种的DNA条形码鉴定研究*

黄宇航¹, 曾卓尔², 成航¹, 邓港¹, 骆帅宾¹, 麦倩婷¹, 高翰¹, 刘霞^{1**}

(1. 武汉理工大学化学化工与生命科学学院 武汉 430070;

2. 武汉市外国语学校高中部 武汉 430022)

摘要:目的:探索建立适用于鉴定药用植物三尖杉及其同属易混物种的DNA条形码鉴定体系,以保障其用药安全。方法:提取三尖杉属3个物种(三尖杉、粗榧和篦子三尖杉)共22份样本的基因组DNA、扩增ITS2和*psbA-trnH*序列并测序,通过CodonCode Aligner V4.2对测序峰图进行校对拼接。应用MEGA 5.1计算种内和种间Kimura 2-Parameter(K2P)遗传距离,构建邻接(Neighbor-Joining, NJ)系统聚类树。结果:基于ITS2序列分析,三尖杉的种内最大遗传距离小于种间最小遗传距离;基于*psbA-trnH*序列分析,三尖杉的种内和种间遗传距离有重合。结论:应用ITS2序列,可以实现对三尖杉及其易混物种的鉴别,为三尖杉药材的安全使用提供鉴定依据。

关键词:三尖杉 同属易混物种 DNA条形码 ITS2序列 *psbA-trnH*序列 鉴别

doi:10.11842/wst.2018.02.017 中图分类号:R282 文献标识码:A

三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* Hook. f. 是一种药用植物,我国民间将其带嫩枝的叶作为消积、润肺和驱虫药^[1]。三尖杉广泛分布于秦岭以南的部分省区,垂直分布从东(约200 m)到西(2 500 m)逐渐升高。一般常与阔叶树、针叶树混杂,呈零星分布^[2,3]。三尖杉中含有生物碱和黄酮两大类化学成分^[4],其中三尖杉酯类生物碱具有抗癌活性^[5]。20世纪70年代初, Powell等发现三尖杉中的三尖杉酯碱类化合物具有抑制小鼠白血病细胞生长的作用,从而引起人们对其生物碱类成分的广泛研究和重视^[6-9]。目前,我国已将三尖杉酯碱(harringtonine, HT)和高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HHT)开发成抗癌药物,对急性非淋巴细胞性白血病和慢性粒细胞性白血病有较好疗效^[10,11]。由于其抗癌功效良好,三尖杉已被过度商业采伐,目前处于渐危状态并且种群数量正在下降^[12,13]。

由于三尖杉的药用部位主要为叶,与其他同属近缘物种形态极其相似^[14],使得利用形态特征对三尖杉进行快速、有效鉴别稍显困难^[15]。同时,郎学东等^[16,17]提出对于三尖杉属植物的系统分类尚存争议,这使得利用已有文献对三尖杉进行形态学鉴定变得更为复杂。经过走访市场发现,其最常见的同属易混物种为粗榧 *Cephalotaxus sinensis* (Rehd. et Wils.) Li 和篦子三尖杉 *Cephalotaxus oliveri* Mast.。市场上流通的混淆物种会威胁三尖杉的用药安全。目前,针对三尖杉属植物的鉴别方法除有形态学鉴别外,还有显微鉴别^[18]和薄层色谱分析^[19]等。上述方法均存在不同程度的局限性。所以需要探索一种针对三尖杉及其易混物种高效、快捷的新型鉴定方法。

DNA条形码技术是一种利用基因中相对较短的特异性序列来进行物种分类学鉴定的分子生物学技术^[20]。该技术与传统鉴定技术相比,在物种鉴别时具

收稿日期:2017-12-22

修回日期:2018-02-01

* 武汉理工大学自主创新研究基金学生自主申报项目(2017-H5-B1-04):三尖杉属药用植物DNA条形码属内鉴定研究,负责人:黄宇航;武汉理工大学大学生创新创业训练项目(20171049720003):网脉橐吾的DNA条形码鉴定研究及其质量评价,负责人:成航。

** 通讯作者:刘霞,博士,副教授,主要研究方向:中药资源鉴定。

表1 采集样品信息表

物种名	拉丁名	样本编号	采集地
三尖杉	<i>Cephalotaxus fortunei</i> Hook. f.	SJ-001 - SJ-006	神农架,湖北
粗榧	<i>C. sinensis</i> (Rehd. et Wils.) Li	CF-001 - CF-002	凤庆,云南
		CF-003 - CF-008	恩施,湖北
蕈子三尖杉	<i>C. oliveri</i> Mast.	BZ-001 - BZ-006	神农架,湖北
		BZ-007 - BZ-008	恩施,湖北

表2 *psbA-trnH* 下载序列信息表

物种名	拉丁名	GenBank ID
三尖杉	<i>Cephalotaxus fortunei</i> Hook. f.	JN044240 - JN033243
粗榧	<i>C. sinensis</i> (Rehd. et Wils.) Li	JN044264、JN044267 - JN044269
蕈子三尖杉	<i>C. oliveri</i> Mast.	JN044258、JN044259

有高稳定性、高准确性的特点^[21],对于保障中药材用药安全准确具有重要意义^[27]。目前,该技术已经在植物系统学分类等领域得到广泛应用,并已成功应用于蔓荆子、车前子、羌活等多种中药材的鉴别中^[22-26],但目前尚未发现运用DNA条形码技术鉴定三尖杉的相关报道。本研究基于DNA条形码技术,探索ITS2和*psbA-trnH*序列作为三尖杉及其属内易混物种条形码序列的可行性,以规范三尖杉药材的选用,保障其用药安全。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验通过野外考察等方式收集三尖杉属3个物种(三尖杉、粗榧和蕈子三尖杉)共22份植物样本,其中三尖杉6份、粗榧8份、蕈子三尖杉8份,分别来自湖北、云南等地。所有样品均经武汉理工大学楼一层教授鉴定,凭证标本保存在武汉理工大学中药资源与分子鉴定实验室。详细样品信息见表1。本研究另从GenBank数据库下载上述3物种*psbA-trnH*序列共10条,Genbank登录号见表2。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取

参照中药材DNA条形码分子鉴定指导原则^[28,29],取经硅胶干燥的样品叶片约20 mg,经75%乙醇擦拭

后,用高通量组织研磨仪(Sceintz-48,宁波新芝)以30次/min研磨2 min。利用核分离液(2% PVP,20 mmol·L⁻¹ EDTA,100 mmol·L⁻¹ PH 8.0 Tris-HCl和0.7 mol·L⁻¹ NaCl)800 μL抽提2次后,利用基因组DNA提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., China)提取DNA。

1.2.2 PCR扩增及测序

ITS2和*psbA-trnH*序列PCR扩增引物及反应条件参见《中药DNA条形码分子鉴定》^[29],PCR扩增产物经1%琼脂糖电泳检测并对有清晰目的条带的样品进行纯化后,使用ABI 3730XL测序仪(Applied Biosystems Co., USA)进行双向测序。

1.2.3 数据处理

利用CodonCode AlignerV4.2(CodonCode Co., USA)对测序峰图文件进行序列拼接和剪切,去除低质量部分。将所得序列采用基于隐马尔科夫模型HM-Mer注释的方法,在ITS2 database网站进行注释,剪去所得序列的5.8S端和28S端,获得ITS2序列^[30-32]。通过与Genbank序列进行Blast比对,并利用参考序列进行注释,获得*psbA-trnH*序列。使用MEGA 5.1(Molecular Evolutionary Genetics Analysis Co., USA)软件进行序列比对分析^[33]。分别基于两种序列,利用K2P(Kimura 2-Parameter)模型计算各物种遗传距离并分析,构建Neighbor-Joining(NJ)系统聚类树,并采用bootstrap重复1 000次对各分支的支持率进行检验^[33]。

2 结果

2.1 三尖杉及其同属易混物种的种内变异分析

2.1.1 基于ITS2序列的种内变异分析

三尖杉、粗榧和蕈子三尖杉的ITS2序列特征见表3。三尖杉共6条序列,长度均为233 bp,以SJ-001为主导单倍型。在132 bp处存在A-C变异;152 bp处存在C-T变异;161 bp处存在T-C变异;175 bp处存在C-G变异。平均GC含量为69.30%。粗榧共8条序列,长度为223-237 bp,存在分别以CF-001、CF-003为主导单倍型的2种单倍型。在108 bp处存在G-A变异;在117 bp处存在A-G变异。平均GC含量为66.75%。蕈子三尖杉共8条序列,长度为223-233 bp,存在分别以

表3 三尖杉及其同属易混物种ITS2序列特征表

物种名	序列总数	原序列长度	对比后序列长度	保守位点数(百分率/%)	变异位点数(百分率/%)	简约信息位点数(百分率/%)
三尖杉	6	233 bp	233 bp	229/98.28	4/1.72	4/1.71
粗榧	8	223 - 237 bp	349 bp	347/99.43	2/0.57	1/0.28
蕈子三尖杉	8	223 - 233 bp	268 bp	267/99.63	1/0.37	0

表4 三尖杉及其同属易混物种 *psbA-trnH* 序列特征表

物种名	序列总数	原序列长度	对比后序列长度	保守位点数(百分率/%)	变异位点数(百分率/%)	简约信息位点数(百分率/%)
三尖杉	10	313 – 390 bp	390 bp	390/100	0	0
粗榧	12	390 – 490 bp	507 bp	407/80.28	99/19.53	97/19.13
篦子三尖杉	9	268 – 364 bp	364 bp	364/100	0	0

BZ-001、BZ-007为主导单倍型的2种单倍型。在235 bp处存在A-C变异。平均GC含量为69.50%。

2.1.2 基于 *psbA-trnH* 序列的种内变异分析

三尖杉、粗榧和篦子三尖杉的 *psbA-trnH* 序列特征见表4。三尖杉共10条序列,长度为313–390 bp,以SJ-001为主导单倍型。不存在种内变异位点。平均GC含量为39.90%。粗榧共12条序列,长度为390–490 bp,存在分别以CF-003、CF-005为主导单倍型的2种单倍型。存在99个种内变异位点。平均GC含量为41.10%。篦子三尖杉除BZ-007扩增失败,共获得9条序列,长度为268–364 bp,以BZ-001为主导单倍型。不存在种内变异位点。平均GC含量为40.00%。

2.2 三尖杉及其同属易混物种的种内及种间遗传距离计算

2.2.1 基于 ITS2 序列的遗传距离计算

基于ITS2序列,利用K2P模型计算所得的遗传距离见表5。三尖杉的最大种内遗传距离(0.0087)小于与粗榧的最小种间遗传距离(0.7424)、小于与篦子三尖杉的最小种间遗传距离(0.7424),表明可利用ITS2序列将三尖杉与这两个易混物种区分。

2.2.2 基于 *psbA-trnH* 序列的遗传距离计算

基于 *psbA-trnH* 序列,利用K2P模型计算所得的遗传距离见表6。由于三尖杉和粗榧的最小种间距离为0,与三尖杉种内遗传距离相等,表明利用 *psbA-trnH* 序列无法区分三尖杉和粗榧两物种。

2.3 NJ系统聚类树构建

2.3.1 基于 ITS2 序列的 NJ 树

应用相似性搜索法,构建了基于ITS2序列的NJ系统聚类树,见图1。图中三尖杉、粗榧和篦子三尖杉各自聚为一支,表现出良好的单系性。表明利用ITS2序列作为DNA条形码,可以对三尖杉与其易混物种进行有效鉴定。

2.3.2 基于 *psbA-trnH* 序列的 NJ 树

基于 *psbA-trnH* 序列所构建的NJ系统聚类树见图2。图中三尖杉虽与篦子三尖杉分开,但与粗榧聚为一支。表明利用 *psbA-trnH* 序列作为DNA条形码,无法

表5 基于 ITS2 序列的三尖杉及其同属易混物种遗传距离信息表

物种名	种内遗传距离	种间遗传距离
三尖杉	0 – 0.008 7	0.742 4 – 0.824 4
粗榧	0 – 0.009 1	0.010 7 – 0.816 6
篦子三尖杉	0 – 0.004 3	0.013 6 – 0.824 4

表6 基于 *psbA-trnH* 序列的三尖杉及其同属易混物种遗传距离信息表

物种名	种内遗传距离	种间遗传距离
三尖杉	0	0 – 0.531 5
粗榧	0 – 0.009 1	0 – 0.531 5
篦子三尖杉	0	0.011 1 – 0.547 3

对三尖杉与其两个易混物种进行鉴定。

3 讨论

DNA条形码技术作为在生物分类和鉴定领域一项发展迅速的新技术,在保障药用植物用药安全和保护濒危物种等方面具有潜力。本研究基于三尖杉及其2个易混物种共53条序列(ITS2序列22条、*psbA-trnH*序列31条)进行比对分析,探索利用DNA条形码技术用于鉴定药用植物三尖杉的可行性。

通过ITS2序列分析发现,三尖杉、粗榧和篦子三尖杉的序列种内变异均较小,作为DNA条形码具有良好的稳定性。三尖杉ITS2序列种内最大K2P遗传距离小于与易混物种的种间最小K2P遗传距离;基于ITS2序列构建的NJ树表明三尖杉能与其易混物种明显区分。而三尖杉的 *psbA-trnH* 序列种内最大K2P遗传距离等于其与易混物种的种间最小K2P遗传距离;基于 *psbA-trnH* 序列构建的NJ树显示三尖杉无法单独聚为一支。因此,ITS2序列可以作为有效鉴定三尖杉及其易混物种的合适DNA条形码序列,而 *psbA-trnH* 序列不适合用于三尖杉及其易混物种的鉴定。确定ITS2序列作为鉴定三尖杉的DNA条形码,对于保障其用药安全和准确性都有一定的意义^[34],同时也为其他近缘药用植物的鉴定提供了思路和经验。

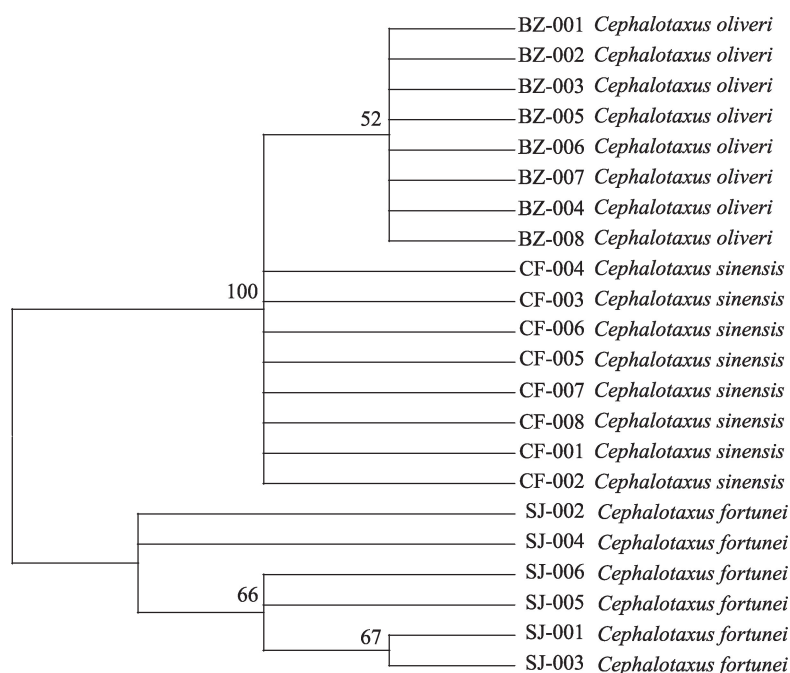


图1 基于ITS2序列的NJ系统聚类树

注: Bootstrap 1 000次重复, 支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。

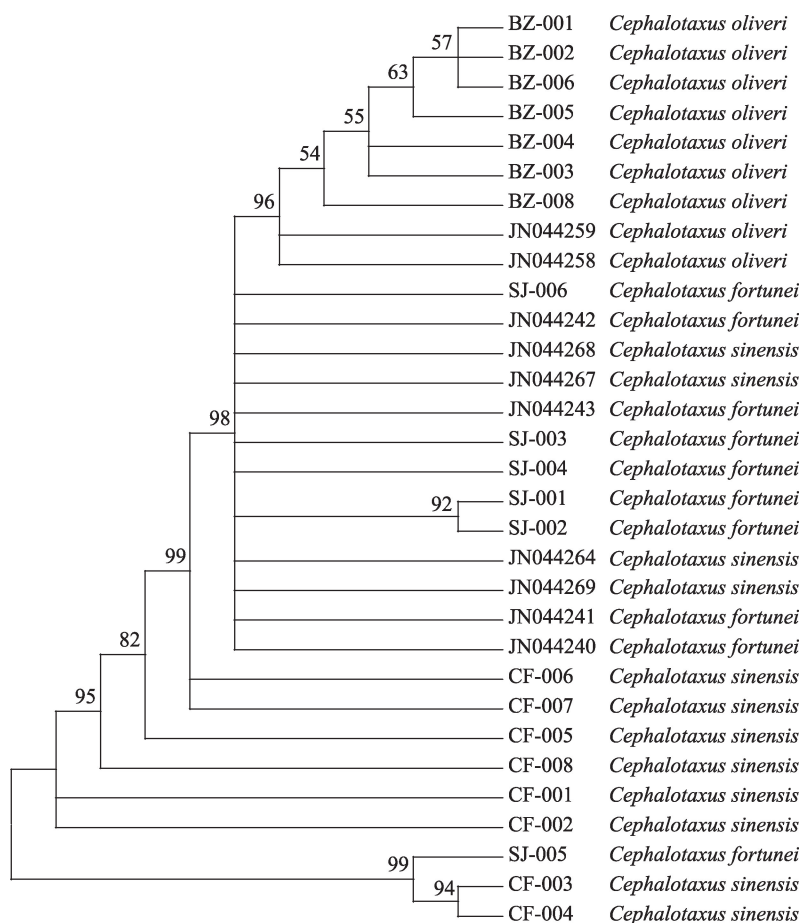


图2 基于 $psbA-trnH$ 序列所构建的NJ系统聚类树

注: Bootstrap 1 000次重复, 支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。

参考文献

- 白雪芳, 杜昱光. 抗肿瘤药物—三尖杉酯类碱的开发研究进展. 中国生化药物杂志, 1998, 19(1): 50–52.
- 中国科学院植物研究所. 中国植物志(第四卷). 北京: 科学出版社, 1999: 85–88.
- 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第一卷). 北京: 科学出版社, 1985: 330.
- 马广恩, 林隆泽, 赵志远, 等. 三尖杉属植物中生物碱的研究: I. 三尖杉中抗癌有效成分的分离和鉴定及新生物碱(+)-乙酰三尖杉碱. 化学学报, 1977, 35(3,4): 201–208.
- 浙江省三尖杉研究协作组. 三尖杉植物生物碱的临床研究. 浙江肿瘤通讯, 1976, (2): 14.
- Powell R G. Structures of Harringtonia, Alkaloids from Cephalotaxuarringtonia. *Phytochemistry*, 1972, 11(4): 1467–1472.
- Powell R G, Weisleder D, Smith C R Jr. Antitumor Alkaloids from Cephalotaxuarringtonia: Structure and Activity. *J Pharm Sci*, 1972, 61(8): 1227–1230.
- Ma G, Sun G Q, Elsohly M A, et al. Studies on the Alkaloids of Cephalotaxus. III. 4-Hydroxycephalotaxine, a New Alkaloid from Cephalotaxus fortunei. *J Nat Prod*, 2004, 45(5): 585–589.
- Bocar M, Jossang A, Bodo B. New alkaloids from Cephalotaxus fortunei. *J Nat Prod*, 2003, 66(1): 152–154.
- Smith C R, Mikojaiczals K L, Powell K G. Anticancer Agents Based on Natural product Models. *New York: Academic Press*, 1980.
- 梅文莉, 吴娇, 戴好富. 三尖杉属植物化学成分与药理活性研究进展. 中草药, 1992, 15(5): 14–16.
- 王有生, 王献博. 三尖杉属植物资源利用与保护. 中药材, 1992, 15(5): 14–16.
- Huang C T, Zhuang X Y, Li R X, et al. Damaged Status and Early Recovery of Tree Species in Wuzhishan of Nanling Mountains, South China after the Ice Storm in 2008. *Chin J Ecology*, 2012, 31(6): 1390–1396.
- 熊文愈, 等. 中国木本药用植物. 上海: 上海科技教育出版社, 1983: 46–52.
- 马英姿, 李志华. 生药三尖杉及其易混物种的性状与显微鉴别. 湖南中医药导报, 2000, 6(1): 40–41.
- 郎学东, 苏建荣, 陆树刚, 等. 三尖杉属属名和三尖杉名称的引证错误与订正. 西北植物学报, 2011, 31(12): 2572–2575.
- 郎学东. 三尖杉属系统分类学研究. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2013.
- 齐迎春, 易华林, 梁学艺. 三尖杉的形态组织鉴定. 中药材, 2001, 24(6): 407–409.
- 董慧茹, 郑云, 赵京城, 等. 薄层色谱法分离紫杉醇和三尖杉宁碱. 理化检验—化学分册, 2007, 43(6): 472–475.
- 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(5): 747–754.
- 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141–147.
- 张晓存, 徐迪, 孙伟, 等. 蔓荆子药材及其混伪品 DNA 条形码鉴定研究. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(11): 2366–2370.
- 樊佳佳, 宋明, 宋驰, 等. 中药材蟾皮及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究. 中国药理学杂志, 2015, 50(15): 1292–1296.
- 王俊, 刘霞, 孙伟, 等. 名贵中药材血竭的 DNA 条形码研究. 中国药理学杂志, 2015, 50(15): 1261–1265.
- 宋明, 张雅琴, 林韵涵, 等. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列对细小种子类药材车前子的鉴定比较. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2227–2232.
- 张改霞, 金钺, 贾静, 等. 药用植物羌活种子 DNA 条形码鉴定研究. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 390–395.
- 辛天怡, 李西文, 姚辉, 等. 中药材二维 DNA 条形码流通监管体系研究. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(7): 695–702.
- 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列. 北京: 科学出版社, 2015.
- 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 4–5.
- Eddy S R. Profile Hidden Markov Models. *Bioinformatics*, 1998, 14: 755–763.
- Koetschan C, Hackl T, Müller T, et al. ITS2 database IV: Interactive Taxon Sampling for Internal Transcribed Spacer 2 based Phylogenies. *Mol Phylogenet Evol*, 2012, 63: 585–588.
- Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8 S–28S rRNA Interaction and HMM-based ITS2 Annotation. *Gene*, 2009, 430: 50–57.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetic Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*, 2011(28): 2731–2739.
- Li X, Yang Y, Henry R J, et al. Plant DNA Barcoding: From Gene to Genome. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2014: 12104.

**Studies on DNA Barcoding Identification for *Cephalotaxus fortunei* and
Its Common Species in the Same Genus**

Huang Yuhang¹, Zeng Zhuo'er², Cheng Hang¹, Deng Gang¹, Luo Shuaibin¹,
Mai Qianting¹, Gao Han¹, Liu Xia¹

(1. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan
430070, China; 2. Senior High School, Wuhan Foreign Languages School, Wuhan 430022, China)

Abstract: This study was aimed to explore the establishment of DNA barcode identification system for the identification of *Cephalotaxus fortunei* and its common species in the same genus, which was significance to the safety of drug use. In this paper, 22 samples from 3 species (*C. fortunei*, *C. sinensis* and *C. oliveri*) in genus *Cephalotaxus* were studied, whose genomic DNA was extracted and amplified by PCR to obtain both ITS2 and *psbA-trnH* sequences. Then, CodonCode Aligner V4.2 was used to splice sequences, and MEGA 5.1 was used to calculate the intraspecific and interspecific Kimura 2-Parameter (K2P) genetic distances in order to build Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic trees. The results showed that based on ITS2 sequences, the maximum K2P intraspecific genetic distance of *C. fortunei* was lower than the minimum K2P interspecific genetic distance among it and its adulterants. While based on *psbA-trnH* sequences, the genetic distance between the intraspecific and interspecific of *C. fortunei* had a coincidence. It was concluded that ITS2 sequences can be used for identification of *C. fortunei* and its common species in the same genus, which will provide an identification basis for the safe use of *C. fortunei*.

Keywords: *Cephalotaxus fortunei*, common species in the same genus, DNA barcoding, ITS2 sequence, *psbA-trnH* sequence, identification

(责任编辑:张 静,责任译审:王 晶)