

滇重楼的 *psbA-trnH* 条形码分子鉴定研究刘涛¹, 赵英良², 杨莹², 王玲¹, 李玛¹, 王欣林², 周博², 杨生超^{1*}¹云南农业大学; ²云南中烟工业有限责任公司, 昆明 650201

摘要:为探讨滇重楼药材鉴定新方法,本研究通过对重楼样品提取基因组 DNA, PCR 扩增叶绿体 *psbA-trnH* 序列并进行双向测序, 所得序列经 CodonCode Aligner 拼接后, 采用 MEGA5.0 软件进行序列比对, 计算种内和种间遗传距离 (K2P), 构建邻接数 (neighbor-joining tree) 进行结果分析。研究表明, 叶绿体 *psbA-trnH* 片段在滇重楼种内变异较小, 平均 K2P 遗传距离为 0.007, 而滇重楼与其它重楼种间平均 K2P 遗传距离为 0.025, 滇重楼种间最大 K2P 遗传距离明显小于滇重楼与重楼属其它种内的最小 K2P 遗传距离。中药材 DNA 条形码鉴定系统比对和 NJ 树鉴定结果均表明 *psbA-trnH* 序列可区分滇重楼及其同属物种, 且具有较好的稳定性和准确性, 为保障临床安全用药提供了新的技术手段。

关键词:滇重楼; DNA 条形码; *psbA-trnH*; 分子鉴定

中图分类号: S184

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.002

Molecular Identification of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* using *psbA-trnH* DNA Barcoding

LIU Tao¹, ZHAO Ying-liang², YANG Ying², WANG Ling¹, LI Ma¹, WANG Xin-lin², ZHOU Bo², YANG Sheng-chao^{1*}

¹Yunnan Agriculture University; ²China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd, Kunming 650201, China

Abstract: To explore a new method of identifying *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, the genomic DNA from *P. polyphylla* was extracted and the chloroplast *psbA-trnH* sequence was amplified by PCR. After spliced by CodonCode Aligner, the intraspecific and interspecific genetic distance (K2P) and neighbor-joining (NJ) tree were built by MEGA5.0 software. The result showed that the chloroplast *psbA-trnH* fragments found in intraspecific variation was small and the average K2P genetic distance was 0.007, while interspecific was 0.025. The maximum interspecific genetic distance of *P. polyphylla* was significantly less than the minimum K2P of intraspecific. The DNA barcoding comparison and NJ tree showed that *psbA-trnH* sequences can be used to distinguish *P. polyphylla*. The method was stable, accurate and will provide new technical means for clinical medication safety.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; DNA barcoding; *psbA-trnH*; molecular identification

重楼属 (*Paris* L.) 隶属于百合科 (Liliaceae), 全属共 28 种, 均为多年生草本, 分布于欧亚大陆的热带及温带地区^[1]。该属是一个有着重要经济价值的植物类群, 药用历史悠久, 但药用重楼的基源一直比较混乱, 本属蚤休亚属 (*Paris* subg. *Daiswa* sensus) 的所有种类均具有粗壮的根状茎^[1]。为澄清药用重楼基源混乱的问题, 李恒对《滇南本草》等古籍文献进行考证, 表明药用重楼应以滇重楼 (*Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* [Franch.] Hand-Mazz) 为正品, 其它种类均为代用品^[2]。

滇重楼 (*P. polyphylla*) 为多年生草本植物, 味苦, 有小毒, 具有清热解毒、消肿止痛之功效, 具有抗肿瘤、止血、止咳平喘、抗菌、抗病毒等作用, 也可用于疮痍肿痛、咽喉肿痛、惊风抽搐的治疗, 是很多中成药如宫血宁胶囊、三七血伤宁胶囊和清热解毒片等著名中成药的主要原料^[3]。因滇重楼以根状茎入药, 根据形态学、解剖学等特征难以对正品及代用品进行区分, 使得在药材的收购及工厂化生产中无法将滇重楼与其它种区别开来; 鉴于不同种类的重楼在药用成分甾体皂甙的种类、含量等方面存在显著的差异^[4], 滇重楼及代用品的混用将给中医用药医药工业生产的质量控制带来了极大的隐患。因此, 对滇重楼及其代用品的鉴定方法和手段进行研究, 摸索一套在药材收购和生产中行之有效的鉴定

收稿日期: 2014-11-07 接受日期: 2015-02-03

基金项目: 云南省高新技术产业发展项目 (云发改高技 20121956); 国家自然科学基金 (31260075); 云南省自然科学基金 (2012FB146)

* 通讯作者 E-mail: 52133490@qq.com

方法,对于医药生产的质量控制及保护重楼属植物中的珍惜、濒危种类有着重要的意义。

对于滇重楼的药材的鉴定目前主要还是利用传统的形态鉴别方式,尽管也有学者利用滇重楼中皂甙类物质进行药材品质的判断依据,但由于滇重楼的药理作用并非仅仅由单一成分决定,同时各品种所含皂甙类化学成分及含量有较大差别,因此仅用皂甙类物质鉴别药材的品质和真伪也不具客观性。分子方面,张金渝等利用 RAPD 技术从植物系统分类的角度对重楼属中的 4 种植物进行多态性分析,发现不同种类指纹图谱有明显的差异^[5];何俊等采用 ISSR 技术对主要分布于云南的滇重楼不同居群进行多态性分析,发现不同居群的指纹图谱也有明显的差异,认为遗传多样性主要存在于居群间^[6];但由于有限的采样数量和所采用分子标记的低分辨率,加之上述作者并未从分子鉴定的角度对滇重楼进行研究,因此重楼属不同种类和居群的遗传多样

性和分子鉴定还有待进一步的研究。

DNA 条形码(DNA barcoding)技术以稳定的基因组信息为依据,有望实现对物种鉴定的标准化^[7,8]。但到目前为止,还没有应用 DNA Barcoding 技术对滇重楼进行分子鉴别,更没有滇重楼的专用条形码的报道。本实验利用 DNA Barcoding 技术对重楼属下滇重楼进行分子鉴定。为重楼药材的快速准确鉴定提供保障,也为临床用药安全奠定基础。

1 实验材料

本研究所用材料共 12 个物种 35 个样品,包括试验样品及 GenBank 下载序列。其中,滇重楼药材样品 24 个(来自不同局群),其余重楼种类样品各 1 个。所有材料经云南农业大学何忠俊教授鉴定,凭证样品保存于云南农业大学农学与生物技术学院。实验材料及序列的 GenBank 登录号见表 1。

表 1 本实验中所采集的滇重楼样本信息

Table 1 Origins of *P. polyphylla* samples used in this study

序号 No.	采集地 Resource	拉丁名 Latin name	中文名 Chinese name	NCBI 网站上序列登录号 NCBI accession No.
1	云南省宣威市 Xuanwei city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
2	云南省墨江县 Mojiang city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
3	云南省西昌县 Xichang city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
4	云南省丽江市 Lijiang city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
5	云南省弥渡县 Midu city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
6	云南省禄劝县 Luquan city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
7	云南省镇源县 Zhenyuan city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
8	云南省玉溪市 Yuxi city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
9	云南省普洱市 Puer city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
10	云南省巧家县 Qiaojia city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
11	云南省泸水县 Lushui city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
12	云南省维西县 Weixi city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
13	云南省龙里县 Longli city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
14	云南省永胜县 Yongsheng city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
15	云南省富宁县 Funing city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
16	云南省镇雄县 Zhenxiong city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
17	云南省剑川县 Jianchuan city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
18	云南省会里县 Huili city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
19	云南省永善县 Yongshan city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
20	云南省迪庆县 Diqing city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
21	云南省永平县 Yongping city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	

22	云南省石屏县 Shiping city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
23	云南省中甸县 Zhongdian city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
24	云南省临沧县 Lincang city	<i>P. polyphylla</i>	滇重楼	
25	海南省五指山 Wuzhishan city	<i>P. dunniana</i>	海南重楼	DQ404259
26	云南省剑川县 Jianchuang city	<i>P. daliensis</i>	大理重楼	DQ404260
27	云南省勐腊县 Mengla city	<i>P. vietnamensis</i>	南重楼	DQ404246
28	云南省巍山县 Weishan city	<i>P. mairei</i>	毛重楼	DQ404247
29	云南省西畴县 Xichou city	<i>P. cronquistii</i>	凌云重楼	DQ404255
30	重庆市南川区 Nanchong district	<i>P. delavayi</i> var. <i>delavayi</i>	金线重楼	DQ404249
31	云南省福贡县 Fugong city	<i>P. thibeitca</i> var. <i>apetala</i>	黑籽重楼	DQ404250
32	湖南省桑植县 Sangzhi city	<i>P. fargessi</i>	球药隔重楼	DQ404251
33	云南省屏边县 Pingbian city	<i>P. delavayi</i> var. <i>petiolata</i>	卵叶重楼	DQ404254
34	云南省巧家县 Qiaojia city	<i>P. marmorata</i>	花叶重楼	DQ404256
35	云南省宜良县 Yiliang city	<i>P. axialis</i>	五指莲重楼	DQ404244

2 实验方法

2.1 样本 DNA 的提取

硅胶干燥样品各 0.5 g,液氮研磨,用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN) 提取基因组 DNA。

2.2 PCR 扩增及测序

引物为 *psbA/trnH* 引物,引物 *psbA* 的碱基序列: GTTATGCATGAACGTAATGCTC, 下游引物 *trnH* 的碱基序列: CGCGCATGGTGGATTCACAAATC; 样本 DNA 加入 *psbA/trnH* 引物进行扩增,反应热循环程序为:94 °C 预变性 5 min; 然后进入循环,每个循环 94 °C 变性 30sec,54 °C 退火 30 sec,72 °C 延伸 90 sec,共 30 个热循环,最后延伸 72 °C 延伸 7min;4 °C 冷却后取出;扩增反应在 PCR 仪上进行。PCR 反应体系 (25 μ L): ddH₂O 17.8 μ L, 10 \times PCR buffer (Mg⁺ + Plus) 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5 μ L, Tag 酶 (5 u/ μ L) 0.2 μ L, 正向引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 模板 DNA (50 ng/ μ L) 1.0 μ L。将扩增成功的 PCR 产物 (出现明显 PCR 条带) 进行纯化后 (采用上海生工核酸凝胶纯化试剂盒), 送上海生工测序中心使用 ABI3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co., USA) 双向测序。RNA 酶、dNTP、PCR reaction buffer, 均购自宝生生物公司。

2.3 数据处理和分析

测序峰图采用序列拼接软件 Codoncode Aligner

v2.06 (CodonCode Co, USA) 校对拼接, 去除低质量序列及引物区, 利用 ClustalX v2.0 进行多序列比对并查错。利用软件 MEGA5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 分析比对^[9], 并基于 Kimura 2-parameter (K2P) 模型进行种内种间遗传距离分析, 用邻接 (NJ) 法构建系统聚类树。利用 BLAST 比对和 NJ 树对滇重楼及其同属近缘种进行鉴定分析。

3 实验结果

3.1 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

提取的重楼样品基因组 DNA 电泳检测显示条带主带明显, 边缘有弥散状出现, 说明 DNA 有少部分降解。NanoDrop 检测结果表明所提取基因组 DNA 的 A260/A280 值均处于 1.6 ~ 1.8 间, 且 DNA 浓度均较高 (>100 ng/ μ L), 说明样品污染小, 可作为 PCR 反应模版扩增。经 PCR 反应, 所有样品的均显示较亮条带, 可用于测序分析。PCR 扩增效率和测序成功率是评价 DNA 条形码序列的一个重要指标, 实验表明, *psbA-trnH* 片段在重楼属植物中扩增非常容易, 测序成功率高, 适合做为重楼属植物的条形码序列。

3.2 滇重楼及其它种重楼 *psbA-trnH* 序列分析

本研究中重楼药材的 *psbA-trnH* 序列分析表明, 基于 K2P 模型的遗传距离分析, 滇重楼种内变异较小, 其 K2P 遗传距离为 0 ~ 0.018, 平均 K2P 遗传距离为 0.007, 不同重楼种间变异较大, 平均 K2P 遗传距离为 0.025, 滇重楼与其它种最小种间 K2P 遗传距离为 0.040。种间最小遗传距离明显大于滇重楼

的种内最大遗传距离。利用中药材 DNA 条形码鉴定系统对滇重楼及其它重楼的序列进行比对,显示所有地区的滇重楼在位点 1-4 上的碱基都为 CTGA,而其余重楼为 AGAC;所有地区的滇重楼在位点 19 上的碱基缺失,而其余重楼为 A;所有地区的滇重楼在位点 77 上的碱基都为 C,而其余重楼为 T;所有地区的滇重楼在位点 138 上的碱基都为 C,而其余重楼为 T;所有地区的滇重楼在位点 792 上的碱基都为 G,而其余重楼为 T 或 C;所有地区的滇重楼在位点 1110-1113 上的碱基都为 GGCG,而其余重楼为 TCGA;所有地区的滇重楼在位点 1116 上的碱基都为 G,而其余重楼为 T;所有地区的滇重楼在位点 1119-1120 上的碱基都为 CC,而其余重楼为 TA、TG 或 GA。详细情况见表 2。通过这些滇重楼的 DNA 条形码可以非常容易的对滇重楼进行鉴定。

表 2 实验样本的 *psbA-trnH* 片段信息位点统计情况

Table 2 The informative sites statistics of *psbA-trnH* fragment in this experiment

样品来源 Sample resource	滇重楼 <i>P. polyphylla</i>	重楼属下其它重楼种 Other <i>Paris</i>
位点 site (1-4)	CTGA	AGAC
位点 site (19)	缺失	A
位点 site (77)	C	T
位点 site (138)	C	T
位点 site (792)	G	T 或 C
位点 site (1110-1113)	GGCG	TCGA
位点 site (1116)	G	T
位点 site (1119-1120)	CC	TA、TG 或 GA

基于 *psbA-trnH* 序列构建的 NJ 系统聚类树见图 1,结果显示,滇重楼单独聚为一支,其近缘种聚为一支,表现出良好的单系性。因此,*psbA-trnH* 序列作为条形码可快速准确鉴别滇重楼及其它重楼。理想的 DNA 条形码序列应当具有明显的种间变异,同时种内变异足够小。实验表明,*psbA-trnH* 片段在滇重楼种内变异幅度在 0.0% ~ 1.8% 之间,而种间变异程度在 4.0% ~ 6.2% 之间,因此该序列适合做为重楼属植物的条形码序列,且很容易将不同种重楼鉴别开来。

4 讨论

近年来,由于 DNA 分子标记技术在植物学中的广泛应用,使药用植物的鉴别工作也取得了空前的

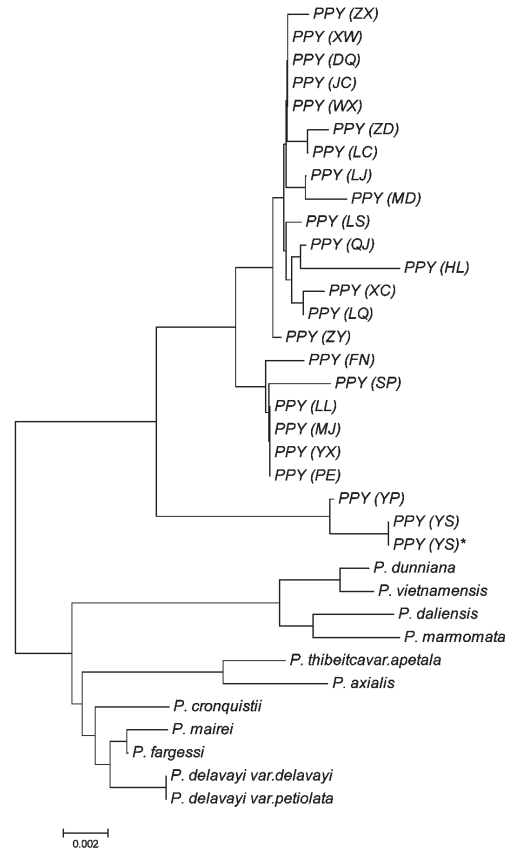


图 1 基于 *psbA-trnH* 序列构建的 NJ 树

Fig. 1 NJ tree based on *psbA-trnH* sequences

发展。传统的鉴定手段人为干扰因素较多,而 DNA 分子标记在中药鉴别中不受生长发育阶段、供试部位、环境条件的影响,能从分子水平上客观地反映待测材料之间的差异,特别适合药材近缘品种和道地药材的鉴定。从国内外研究状况来看,由于 DNA 分子标记技术能客观反映物种间亲源关系和遗传多样性,近年来,不少学者都已成功尝试把它们用于药用植物的鉴定。但这些分子标记技术往往表现出通用性低,可重复性不强的特点^[10]。与其他分子鉴定方法相比,DNA 条形码技术可使鉴定过程更加趋于标准化,在中药鉴定领域中展示了广阔的应用前景^[8]。

滇重楼是我国重要的民族中药,因同属重楼在形态上难以区分,使得在药材的收购及工厂化生产中无法将滇重楼与其它种区别开来,给中医用药医药工业生产的质量控制带来了极大的隐患。为了确保临床用药安全,本研究采用 DNA 条形码技术对中药材滇重楼及同属其他种进行鉴定研究。结果表明 *psbA-trnH* 条形码序列可有效鉴别滇重楼药材,为滇

重楼药材鉴定的标准化奠定了基础,具有重要的应用和参考价值。

本研究为排除滇重楼不同产地个体间存在的变异信息,找到滇重楼特有的区别与其它重楼的信息位点,便从取样策略上,广泛采集了滇重楼所分布的区域,以此来确保滇重楼条形码的准确性。通过比对发现,叶绿体上的 *psbA-trnH* 片段在滇重楼种内变异很小,即不同产地间个体的序列相似性达到(98.2%~100%),说明该片段在滇重楼种内的信息位点很稳定;而种间比较发现,滇重楼与重楼属下的其它重楼种间的序列相似性低于96%,即该片段在种间变异幅度较大,可以轻易地将不同种重楼区分开来。因此仅从序列的相似性程度就可以将滇重楼与其它重楼种区分开来。

为了找到滇重楼特有的DNA条形码,发明人通过序列比对分析,找出了滇重楼内部稳定的信息位点,而这些位点恰恰区别于重楼属下的其它重楼植物,详细信息见表2。通过这些特有的信息位点,可以轻易的将滇重楼植物与重楼属下的其他重楼植物鉴别开来。另外,*psbA-trnH* 片段序列两端的序列都很保守,便于通用引物的设计,十分适合做滇重楼的DNA条形码,该条形码的发现对于滇重楼道地药材的保护利用具有十分重要的作用。

参考文献

- 1 Ji YH, Fritsch PW, Li H, *et al.* Phylogeny and classification of *Paris* (Melanthiaceae) inferred from DNA sequence data. *Ann Bot*, 2006, 98:245-256.
- 2 Li H (李恒). Chonglou Phylogeny See: Li Heng (Ed.), Re-

- building Genus. Beijing: Science Press (科学出版社), 1998. 8-65.
- 3 Wu SS (武珊珊), Gao WY (高文远), Duan HQ (段宏泉), *et al.* Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of Rhizoma Paridis. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35:344-347.
- 4 Chen CX (陈昌祥). Chonglou Chemical Constituents See: Li Heng (Ed.), Re-building Genus. Beijing: Science Press, 1998. 159-193.
- 5 Zhang JY (张金渝), Yu H (虞泓), Zhang SG (张时刚), *et al.* PAPD variation within and among four populations of *Paris palyphylla*. *Bioiversity* (生物多样性), 2004, 12:517-522.
- 6 He J (何俊), Yang BY (杨柏云), Chen SF (陈少风), *et al.* Assessment of genetic diversity of *Paris polyphylla* (Trilliaceae) by ISSR markers. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2007, 29:388-392.
- 7 Chen SL (陈士林). DNA Barcode Molecular Identification of Chinese Medicine. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012. 4.
- 8 Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: S96-S99.
- 9 Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10):27-31.
- 10 Chen SL (陈士林), Yao H (姚辉), Song JY (宋经元), *et al.* Based on the DNA barcoding (bar code) in identification of medicinal materials. *World Sci Technol Chin Med Mod Technol* (世界科学技术-中医药现代化), 2007, 9:7.