

· 基础研究 ·

基于 ITS2 序列的博落回属植物鉴定研究[△]黄鹏¹, 刘金凤¹, 徐敏¹, 夏丽琼², 柳亦松^{1,3}, 唐其¹, 唐昭山⁴, 曾建国^{1*}

(1. 湖南农业大学 兽用中药资源与中兽药创制国家地方联合工程研究中心, 湖南 长沙 410128;

2. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208; 3. 湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128;

4. 湖南美可达生物资源股份有限公司, 湖南 长沙 410005)

[摘要] 目的: 采用 ITS2 序列对博落回属药用植物进行鉴定。方法: 通过对来自湖南、江西、浙江、湖北、河南、陕西、重庆的 30 个博落回属植物 ITS2 序列进行扩增和测序, 并对其进行扩增效率及测序成功率、碱基构成、种内和种间变异分析及 NJ 系统进化树分析来评估 ITS2 序列鉴定效果。结果: 博落回属药用植物 ITS2 序列长度在 500 bp 以内, 扩增效率和测序成功率为 100%, 并获得 30 条博落回 ITS2 序列。结论: ITS2 序列可以有效准确鉴别博落回属植物。

[关键词] 博落回属; ITS2 序列; DNA 条形码; 物种鉴定; 遗传分化

Identification of Plants in *Macleaya* spp. Based on ITS2 SequenceHUANG Peng¹, LIU Jinfeng¹, XU min¹, XIA liqiong², LIU Yisong^{1,3}, TANG Qi¹, TANG Zhaoshan⁴, ZENG Jianguo^{1*}

(1. National and Local Union Engineering Research Center for the Veterinary Herbal Medicine Resources and Initiative,

Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. School of pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

3. Veterinary Faculty of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

4. Micollta Bioresource Inc, Changsha 410005, China)

[Abstract] Objective: To identify the medicinal plant *Macleaya* spp. by using ITS2 sequence. Methods: The ITS2 sequence and sequence of 30 samples collected from Hunan, Jiangxi, Zhejiang, Hubei, Henan, Shanxi, Chongqing was amplified and the amplification efficiency, the sequencing success rate, the constitution of base pair, intra- and inter-specific variation and NJ(Neighbor-Joining) tree were analyzed, in order to evaluate the ITS2 sequencing results. Results: The ITS2 sequence length of *Macleaya* spp. was within 500 bp; the amplification efficiency and the success sequencing rate was 100% and 30 ITS2 sequences were obtained. Conclusion: The ITS2 sequence can be effective and accurate for identification of *Macleaya* spp. .

[Keywords] *Macleaya* spp. ; ITS2 sequence; DNA barcode; Species identification; Genetic differentiation

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.10.003

博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 与小果博落回 *M. microcarpa* (Maxim.) Fedde. 属于罂粟科博落回属植物。现代药理研究表明博落回属植物中的 4 种主要生物碱: 原阿片碱、别隐品碱、白屈菜红碱、血根碱对治疗多种炎症有效, 并对畜禽类有较好的肠道菌群调节作用, 目前已作为饲用抗菌药的替代品在欧洲等地区销售^[1]。博落回与小果博落回

主要分布于中国、东亚、北美洲和欧洲, 两者的形态区别主要是果荚部分, 博落回的果荚呈倒卵形, 而小果博落回的果荚呈近圆形。前期研究显示博落回与小果博落回中的 4 种主要生物碱具有组织分布特异性, 其中血根碱和白屈菜红碱主要分布在博落回的果荚和小果博落回的叶片中, 而原阿片碱和别隐品碱主要分布在博落回叶片、根和小果博落回果

[△] [基金项目] 国家重点实验室培育基地开放项目(15KFXM09); 湖南省科技重点计划(2016SK3002)

* [通信作者] 曾建国, 博士生导师, 教授, 研究方向: 中药资源与综合利用; Tel: (0731)84673824, E-mail: zengjianguo@hunau.edu.cn

莢中^[2]。由于在博落回属植物中一般只有博落回的果莢才是用来提取血根碱的原料,因此开发一种简单、准确的方法区分博落回与小果博落回具有重要的意义。

DNA 条形码技术是一种基于 DNA 分子进化原理,通过一段通用的标准短序列对物种进行鉴定的新生物学技术^[3]。近年来,DNA 条形码作为物种鉴定的工具已广泛应用于动植物的物种鉴定及种间亲缘关系的分析,在众多的 DNA 条形码中,ITS2 序列具有序列片段较短、进化速率较快等特点,已经成功运用于许多传统中药材的鉴定^[4-9]。这些研究均证明 ITS2 特征序列在中药材的鉴定方面具有广泛的应用价值^[10]。虽然应用 ITS2 条形码特征序列鉴别物种的研究越来越多,但是系统地用于博落回属植物鉴

别的报道很少。因此,利用 ITS2 序列片段建立一种准确鉴定博落回属植物的分子鉴定体系,不仅可以对其进行准确分类,而且对用药安全具有十分重要的意义。本研究对博落回属植物 ITS2 序列进行比较分析和快速准确鉴定,旨在为博落回属植物分子鉴定提供理论依据。

1 材料

共收集 30 份博落回属植物根部材料,采自湖南、江西、浙江、湖北、河南、陕西、重庆等地,均用网袋及泥土包裹根部材料运送至湖南省长沙市湖南农业大学国家中药材生产(湖南)技术中心。在种植 1 年后待长出地上部分再采集叶片进行 DNA 提取,具体样本信息见表 1。

表 1 博落回属植物样本信息

序号	植物拉丁名	样品编号	产地	序号	植物拉丁名	样品编号	产地
1	<i>M. cordata</i>	DHNJS1003	湖南津市	16	<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1302	重庆巫山
2	<i>M. cordata</i>	DHNNX1302	湖南宁乡县	17	<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1303	重庆巫山
3	<i>M. cordata</i>	DHNNX1305	湖南宁乡县	18	<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1304	重庆巫山
4	<i>M. cordata</i>	DHNNX1308	湖南宁乡县	19	<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1305	重庆巫山
5	<i>M. cordata</i>	DHNZZ1301	湖南株洲县	20	<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1309	重庆巫山
6	<i>M. cordata</i>	DJXHY1301	江西宜黄县	21	<i>M. microcarpa</i>	XHBNZ1306	湖北襄阳市南漳县
7	<i>M. cordata</i>	DJXJGS1306	江西井冈山	22	<i>M. microcarpa</i>	XHBNZ1307	湖北襄阳市南漳县
8	<i>M. cordata</i>	DJXRC1305	江西瑞昌县	23	<i>M. microcarpa</i>	XHBNZ1309	湖北襄阳市南漳县
9	<i>M. cordata</i>	DJXRC1309	江西瑞昌县	24	<i>M. microcarpa</i>	XHBNZ1310	湖北襄阳市南漳县
10	<i>M. cordata</i>	DJXSR0007	江西上饶	25	<i>M. microcarpa</i>	XHNNY1301	湖北襄阳市南漳县
11	<i>M. cordata</i>	DZJLA0007	浙江临安县	26	<i>M. microcarpa</i>	XHNNY1305	湖北襄阳市南漳县
12	<i>M. cordata</i>	DZJLA1304	浙江临安县	27	<i>M. microcarpa</i>	XHNNY1310	湖北襄阳市南漳县
13	<i>M. cordata</i>	DZJLA1306	浙江临安县	28	<i>M. microcarpa</i>	XHNSX1301	河南嵩县
14	<i>M. cordata</i>	DZJLA1308	浙江临安县	29	<i>M. microcarpa</i>	XSXL1301	陕西蓝田县
15	<i>M. cordata</i>	DZJLA1310	浙江临安县	30	<i>M. microcarpa</i>	XSXSL1304	陕西商洛市

2 方法

2.1 DNA 提取和序列扩增

博落回与小果博落回新鲜叶片用超纯水洗净之后,用灭菌滤纸吸净表面水分。加入适量液氮充分研磨成粉末;再用取样小勺称取 200 ~ 300 mg 粉末样本置 1.5 mL 离心管中,使用磁珠法植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA(TIANGEN#DP342-01)。在凝胶成像仪下观察拍照并筛选出提取效果较好的样品用于下一步的 PCR 扩增。PCR 反应体积为 25 μ L,体系内包含:ddH₂O 12 μ L、2 Taq mastermix 10 μ L、DNA 模板 1 μ L、正向引物 1 μ L、反向引物

1 μ L。本实验参照远志属研究结果^[11],引物正向为:ATGCGATACTTGGTGTGAAT,反向为:GACGC-TTCTCCAGACTACAAT。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,再进行 35 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

2.2 电泳检测

称取 0.5 g 琼脂糖凝胶于锥形瓶中,加入 50 mL 50 $\times$ TAE 缓冲液,中高火微波 2 min,将锥形瓶置于水中 5 min,加入 0.5 μ L GelRed,混匀后倒于凝胶模具中 20 min 后使用。取 PCR 产物点样电泳,100 V,23 min 后,在凝胶成像系统对凝胶拍照,得到结果。

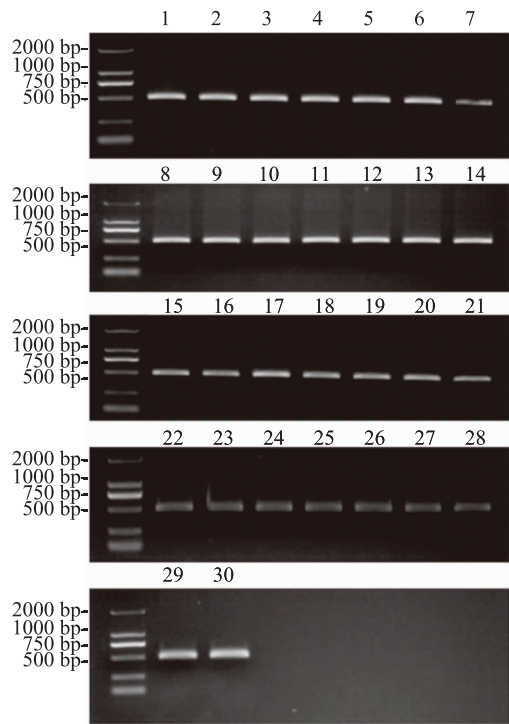
2.3 数据处理

选择 PCR 扩增成功的 DNA 样品交由擎科生物有限公司进行测序,将测序结果输入计算机后应用 Clustal W 软件对所有 ITS2 序列对位排列,并用 Geneious 10.0.2 对校对后的序列进行分子进化遗传分析。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取、PCR 扩增

对 30 份博落回样品的 ITS2 序列分析发现,所有实验样本的 PCR 扩增及测序成功率均为 100%,序列获得率(有效序列比例)亦为 100%,经琼脂糖凝胶电泳得到 PCR 扩增电泳图(见图 1),扩增效果较好,条带较亮,没有拖尾现象,产物大小在 500 bp 以内。



注:泳道上序号对应样本序号。

图 1 30 份博落回样本的 ITS2 序列凝胶电泳图

3.2 测序及序列分析

博落回属的 30 份样本 ITS2 序列的 PCR 及测序成功率均为 100%。ITS2 序列博落回种内遗传距离为 0.001 4~0.009 4,平均值为 0.003 2。种间的遗传距离为 0.077 2~0.084 8,平均值为 0.079 3。表明其种间遗传距离要明显大于种内遗传距离。

3.3 碱基构成分析

由表 2 可知,博落回属植物 ITS2 序列中 A、C、

G、T 碱基的变化范围分别为 1.27%、2.17%、0.9%、2.99%。其中,湖南株洲县产地的博落回 A 碱基含量最高,为 21.3%;江西瑞昌县产地的博落回 A 碱基含量最低,为 16.7%。河南嵩县产地的小果博落回 C 碱基含量最高,为 33.9%。浙江临安县产地的博落回 C 碱基含量最低,为 28.9%。浙江临安县产地的博落回以及重庆巫山、湖北襄阳市南漳县、陕西商洛市产地的小果博落回 G 碱基含量最高,为 32.6%;湖南株洲县产地的博落回 G 碱基含量最低,为 29.4%。江西瑞昌县产地的博落回 T 碱基含量最高,为 21.9%。湖北襄阳市南漳县小果博落回 T 碱基含量最低,为 14.7%。

表 2 博落回属植物 ITS2 序列碱基构成

植物拉丁名	样品编号	碱基构成(%)				GC 含量(%)	碱基总数
		A	C	G	T		
<i>M. cordata</i>	DHNJS1003	16.9	29.1	32.4	21.5	61.5	478
<i>M. cordata</i>	DHNNX1302	17.4	29.5	32.2	21.0	61.6	482
<i>M. cordata</i>	DHNNX1305	17.1	29.2	32.5	21.3	61.7	480
<i>M. cordata</i>	DHNNX1308	17.0	29.1	32.5	21.4	61.6	477
<i>M. cordata</i>	DHNZZ1301	21.3	32.8	29.4	16.4	62.3	469
<i>M. cordata</i>	DJXHY1301	17.2	29.3	32.2	21.4	61.4	482
<i>M. cordata</i>	DJXJGS1306	16.9	29.0	32.4	21.7	61.4	479
<i>M. cordata</i>	DJXRC1305	17.4	29.0	32.1	21.5	61.1	483
<i>M. cordata</i>	DJXRC1309	16.7	29.0	32.4	21.9	61.4	479
<i>M. cordata</i>	DJXSR0007	21.2	32.7	29.5	16.7	62.2	468
<i>M. cordata</i>	DZJLA0007	21.1	32.8	29.2	16.8	62.0	469
<i>M. cordata</i>	DZJLA1304	16.9	29.0	32.4	21.7	61.4	479
<i>M. cordata</i>	DZJLA1306	17.0	29.1	32.0	21.8	61.1	481
<i>M. cordata</i>	DZJLA1308	17.0	28.9	32.6	21.4	61.5	481
<i>M. cordata</i>	DZJLA1310	17.2	29.3	32.2	21.3	61.5	478
<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1302	19.2	33.5	32.2	15.1	65.7	490
<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1303	18.6	33.6	32.4	15.4	66.0	488
<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1304	19.1	33.6	32.2	15.1	65.8	491
<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1305	18.9	33.8	32.2	15.2	66.0	488
<i>M. microcarpa</i>	XCQWS1309	18.4	33.4	32.6	15.6	66.0	488
<i>M. microcarpa</i>	XHBNZ1306	19.0	33.5	32.0	15.5	65.5	490
<i>M. microcarpa</i>	XHBNZ1307	18.6	33.5	32.3	15.5	65.8	489
<i>M. microcarpa</i>	XHBNZ1309	18.6	33.8	32.6	15.0	66.4	488
<i>M. microcarpa</i>	XHBNZ1310	18.8	33.5	32.1	15.5	65.6	489
<i>M. microcarpa</i>	XHNNY1301	19.1	33.6	32.2	15.1	65.8	491
<i>M. microcarpa</i>	XHNNY1305	19.0	34.2	32.1	14.7	66.3	483
<i>M. microcarpa</i>	XHNNY1310	18.6	33.7	32.5	15.1	66.3	489
<i>M. microcarpa</i>	XHNSX1301	18.6	33.9	32.4	15.1	66.3	490
<i>M. microcarpa</i>	XSXLT1301	18.7	33.6	32.4	15.3	66.0	491
<i>M. microcarpa</i>	XSXSL1304	18.4	33.8	32.6	15.2	66.4	488

3.4 构建系统进化发育树

利用 Geneious10.0.2 软件,采用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树(见图 2)。拓扑结构的可靠性用 1000 次重复的自展检验(Bootstrap analysis)来评估,分支的支持值低于 50% 的略去。结果显示博落回分为一支,小果博落回被分为另一支。

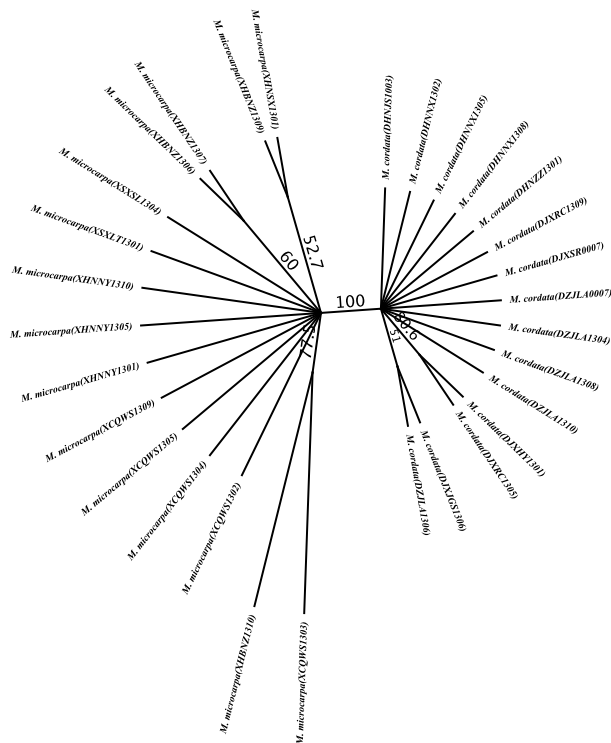


图 2 基于 ITS2 序列构建的 NJ 树

4 讨论

近年来,随着 DNA 条形码技术的不断发展及应用,越来越多的药用植物都使用该技术进行物种鉴定,如野豌豆属^[11]、远志属^[12]、千斤拔属^[13]和黄芩属^[14]等大量的药用植物均已成功使用 DNA 条形码技术进行物种鉴定。陈士林等^[10]认为应当建立以 ITS2 为核心、psbA-trnH 为辅的植物类药材 DNA 条形码鉴定体系和以 COI 为主、ITS2 为辅的动物类药材 DNA 条形码鉴定体系,这为中药材准确、可靠鉴定及临床用药安全提供新的技术手段。

本课题组已于 2012 年完成了博落回属植物的转录组高通量测序^[1],对不同时间的根叶果材料的转录组以及生物碱生源合成可能的机理进行了探索,之后又对博落回进行了全基因组测序,为下一步的功能基因挖掘和分子育种提供基础数据。由于博落回是目前最主要的血根碱来源植物,在博落回属植

物中只有博落回的果荚才是用来提取血根碱的原料。而分辨博落回与小果博落回的主要区别也是果荚部位,因此在博落回属植物生长早期区分两者困难较大。本实验运用 ITS2 序列鉴定博落回属植物,结果显示所有实验样本的 PCR 扩增和测序成功率均达到 100%,表明 ITS2 序列适合于博落回属植物的鉴定且稳定性较好。除了运用 ITS2 序列以外,本实验样本涵盖了湖南、江西、浙江、湖北、河南、陕西、重庆等多个产地,鉴定结果表明不同产地的博落回属植物种内差异较小,说明博落回属植物遗传多样性较低并且符合本实验室之前的 SSR 实验结果^[15]。从最终数据分析,ITS2 条形码序列构建的 NJ 进化树显示 ITS2 序列能够准确鉴别博落回与小果博落回,保证了原料收集的准确性。

参考文献

- [1] Zeng J, Liu Y, Liu W, et al. Integration of transcriptome, proteome and metabolism data reveals the alkaloids biosynthesis in *Macleaya cordata* and *Macleaya microcarpa* [J]. Plos One, 2013, 8(1): 2159-2163.
- [2] 刘秀斌. 博落回属植物中生物碱代谢累积研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [3] Hebert P D, Ratnasingham S, DeWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270 (Suppl 1): S96-S99.
- [4] Chen J, Zhao J, Erickson D L, et al. Testing DNA barcodes in closely related species of *Curcuma* (Zingiberaceae) from Myanmar and China [J]. Mol Ecol Resour, 2015, 15(2): 337-348.
- [5] Ashfaq M, Asif M, Anjum Z I, et al. Evaluating the capacity of plant DNA barcodes to discriminate species of cotton (*Gossypium*; Malvaceae) [J]. Mol Ecol Resour, 2013, 13(4): 573-582.
- [6] Yan L J, Liu J, Moller M, et al. DNA barcoding of *Rhododendron* (Ericaceae), the largest Chinese plant genus in biodiversity hotspots of the Himalaya-Hengduan Mountains [J]. Mol Ecol Resour, 2015, 15(4): 932-944.
- [7] Yang J B, Wang Y P, Moller M, et al. Applying plant DNA barcodes to identify species of *Parnassia* (Parnassiaceae) [J]. Mol Ecol Resour, 2012, 12(2): 267-275.
- [8] Yuan Q J, Zhang B, Jiang D, et al. Identification of species and materia medica within *Angelica* L. (Umbelliferae) based on phylogeny inferred from DNA barcodes [J]. Mol Ecol Resour, 2015, 15(2): 358-371.

(下转第 1381 页)

- [3] 罗友鲜,王学胜,曾君洋.博落回中毒致严重室性心律失常5例报告[J].贵州医药,2001,25(9):838.
- [4] 彭海鹏.博落回的开发利用[J].中国野生植物资源,2003,22(3):58.
- [5] 刘炳仑.我国14种有毒蜜粉源植物的花粉形态[J].中国养蜂,1995(3):21-23.
- [6] 刘炳仑.我国14种有毒蜜源植物及其花粉形态(一)[J].蜜蜂杂志,1995(2):24-25.
- [7] 姚海春,姚京辉,陈云.有毒蜜粉源植物的人蜂中毒机理及防治[J].蜜蜂杂志,2011(4):38-40.
- [8] 杨治高.一起蜜渣中毒的流行病学调查[J].江西医药,1982(增刊1):24-25.
- [9] 周勇亚.蜂蜜中毒14例临床分析[J].中级医刊,1982(12):38-41.
- [10] 陈宏标,张永杰,吴生根,等.2014年福建省某村庄一起野蜂蜜食物中毒事件调查[J].中国食品卫生杂志,2016,28(3):392-395.
- [11] 高凯. PE50对动物腹泻的药效学研究[D].长沙:湖南农业大学,2014.
- [12] 王超,朱艳华,阎雪莹,等.博落回总碱半数致死量测定[J].中国民族民间医药,2010(17):14.
- [13] 王大菊,周诗其,叶冬青,等.博落回急性及亚慢性毒性试验[J].华中农业大学学报,1993,12(6):612-616.
- [14] 卿志星,徐玉琴,杨鹏,等.博落回果荚中生物碱的研究[J].中药材,2016,39(2):312-314.
- [15] 彭懿,左姿,卿志星,等.基于HPLC-Q-TOF/MS技术鉴定博落回叶中化学成分[J].中南药学,2016,14(5):465-470.
- [16] 左姿,郑亚杰,梁之桃,等.博落回根中生物碱的组织化学定位研究[J].中草药,2016,47(10):1785-1790.
- [17] 黄敬,曾建国,罗卫梅,等.HPLC法同时测定博落回不同部位原阿片碱、别隐品碱的含量[J].湖南中医药大学学报,2010,30(1):41-42.
- [18] Qing Z X,Xu Y Q,Yang P,et al. Mass spectrometry-guided isolation of two new benzoquinoline alkaloids from [J]. Nat Prod Res,2015,30(9):1030.
- [19] Farrow S C,Hagel J M,Facchini P J. Transcript and metabolite profiling in cell cultures of 18 plant species that produce benzyloquinoline alkaloids [J]. Phytochemistry,2012,77(5):79-88.
- [20] 邹惠亮,付书娜,张杨梅,等.博落回非生物碱类化学成分研究[J].中药材,2016,39(3):559-561.
- [21] 王珂佳,刘芸.药用植物博落回研究进展[J].河南农业,2015(7):62-64.
- [22] Sai C M,Li D H,Li S G,et al. Racemic alkaloids from *Macleaya cordata*: structural elucidation, chiral resolution, and cytotoxic, antibacterial activities [J]. Rsc Adv,2016,6(47):41173-41180.
- [23] 邹惠亮,李红玉,余绍福,等.博落回的生物碱成分及细胞毒活性研究[J].中国中药杂志,2015,40(3):458-462.
- [24] Yu X L,Gao X L,Zhu Z X,et al. Alkaloids from the Tribe *Bocconieae*(*Papaveraceae*): A Chemical and Biological Review[J]. Molecules,2014,19(9):13042-13060.

(收稿日期 2017-02-20)

(上接第1370页)

- [9] 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.
- [10] Chen S,Pang X,Song J,et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA[J]. Biotechnol Adv,2014,32(7):1237-1244.
- [11] 李骁,赵龙,王佩,等.野豌豆属蒙药药用植物的rDNA-ITS序列分析[J].中草药,2015,46(12):1814-1818.
- [12] 樊杰,白妍,束明月.远志属7种药用植物ITS1和ITS2序列分析[J].中草药,2015,46(4):562-565.
- [13] 张忠廉,宋美芳,李海涛,等.千斤拔属药用植物DNA条形码鉴定研究[J].中草药,2015,45(1):118-122.
- [14] 夏至,高致明,张红瑞,等.黄芩及其同属近缘种的DNA条形码鉴定研究[J].中草药,2014,45(1):107-112.
- [15] 朱鹏程,柳亦松,黄鹏,等.博落回SSR引物的开发以及遗传多样性分析[J].生命科学研究,2013,17(2):120-124.

(收稿日期 2017-02-20)