

黄精属药用植物 DNA 条形码鉴定研究

杨 培¹ 周 红¹ 辛天怡¹ 马双姣¹ 段宝忠² 姚 辉¹

(1 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京, 100193; 2 大理大学药学院, 大理, 671000)

摘要 目的: 评价 DNA 条形码候选序列对黄精属药用植物的鉴定能力。方法: 对 44 份黄精属样品应用通用引物扩增其叶绿体 *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH* 及核 ITS2 和 ITS 序列, 分析其种内种间变异和 barcoding gap, 应用 BLAST 和 Nearest Distance 方法计算物种鉴定效率。结果: ITS2 和 ITS 序列通用引物扩增效率低, 叶绿体 *matK* 序列获得率最低, *rbcL* 最高, 三条序列种内与种间变异均较小, 无明显的 barcoding gap。基于 BLAST 和 Nearest Distance 方法计算, 三条叶绿体序列对黄精属药用植物的鉴定效率均较低。结论: DNA 条形码候选序列 *psbA-trnH*、*matK* 及 *rbcL* 不适用于黄精属药用植物的鉴定, 叶绿体全序列或通过叶绿体全序列筛选合适的 DNA 片段可能是该属药用植物分子鉴定的方向。

关键词 黄精属; 分子鉴定; DNA 条形码

Identification Study of DNA Barcode Sequences in the Medicinal Plants of Polygonatum

Yang Pei¹, Zhou Hong¹, Xin Tianyi¹, Ma Shuangjiao¹, Duan Baozhong², Yao Hui¹

(1 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2 College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract Objective: To evaluate the identification efficiencies of the DNA barcode sequences for the medicinal plants of Polygonatum. **Methods:** The chloroplast *psbA-trnH*, *matK*, and *rbcL* and nuclear ITS and ITS2 of 44 Polygonatum samples were amplified using the universal primers. The intra- and inter-specific genetic distance and barcoding gap were analyzed. The identification efficiencies of the sequences were calculated by BLAST and Nearest Distance methods. **Results:** ITS and ITS2 of Polygonatum were difficult to obtain using the universal primers. The available *rbcL* were the highest while the *psbA-trnH* was the lowest. The intra- and inter-specific genetic distances were all low and no obvious barcode gap existed in three candidate loci. The identification efficiencies of the three chloroplast regions were all low according to BLAST and Nearest Distance methods. **Conclusion:** The DNA barcode sequences did not meet the demands of identifying the medicinal plants of Polygonatum, and the complete chloroplast genome sequences (CP) or the suitable regions screened from CP may be applied to identify the medicinal plants of Polygonatum in the future.

Key Words Polygonatum; Molecular identification; DNA barcode

中图分类号: R282.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.08.010

常用中药材黄精和玉竹均为百合科黄精属植物。黄精 *Polygonati Rhizoma* 来源于滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *P. sibiricum* Red. 或多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua 的干燥根茎, 按形状不同, 习称“大黄精”“鸡头黄精”“姜形黄精”^[1]。黄精味甘, 性平, 具有补气养阴, 健脾, 润肺, 益肾的功效, 是降血糖、血脂的佳品^[2]。黄精中含有丰富的黄精多糖^[3], 薯蓣皂苷元, 毛地黄苷元^[4]及木脂素^[5]类等成分, 能起到降血糖, 抗肿瘤^[6]、抗菌、抗炎、抗病毒^[7]等多种药理作用。全世界约有黄精属植物 60 余种, 有分布地区广泛, 交叉重叠分布等特点。据林琳调查^[8], 我国黄精属植物有 30 余种, 有

20 余种在不同地区入药, 有 17 种作为黄精入药。药材玉竹 *Polygonati odorati Rhizoma* 为百合科植物玉竹 *P. odoratum* (Mill.) Druce 的干燥根茎^[1]。事实上古今均将黄精属多种具互生叶而根茎圆柱状者作玉竹用, 故其商品来源较复杂, 造成玉竹品种混淆与鉴别的困难。例如毛筒玉竹 *P. inflatum* Kom、小玉竹 *P. humile* Fisch. 也在我国很多地区应用。由于黄精属原植物形态和生药性状的相似, 物种鉴定困难, 混伪品多, 给用药安全带来很大的隐患, 因此对黄精属药用植物进行快速准确的鉴定就显得尤为重要和迫切。

随着分子鉴定技术的发展, 在传统鉴定的基础

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2011BAI07B08); 国家自然科学基金项目 (编号: 31460084)

作者简介: 杨培, 在读硕士研究生, E-mail: yp892221944@126.com

通信作者: 姚辉, 博士, 副研究员, 主要研究方向: 中药资源, 电话: (010) 57833194, E-mail: scauyao@ sina.com; 段宝忠, 副教授, 主要研究方向: 中药资源与鉴定, E-mail: bzduan@126.com

上,刘塔斯、周晔等利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析、简单重复序列扩增多态性 (ISSR) 用于黄精属黄精、玉竹及其混伪品的鉴定^[9-14]。DNA 条形码技术是一种新的分子鉴定技术^[15-17],不需要多年经验积累,且可以构建统一的鉴定数据库,因此本研究选用常用 DNA 条形码序列 *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH*、ITS2 和 ITS,考察其对黄精属药用植物及混伪品的鉴定能力,以期为黄精属药用植物的鉴定提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 本文共收集 44 份样品,包括滇黄精、黄精、多花黄精、玉竹等 8 个物种,分别来自贵州、江苏、安徽、陕西、北京等地。样品经中国医学科学院药用植物研究所林余霖教授鉴定,详细信息见表 1。

表 1 试验样品信息表

物种名	拉丁名	实验编号	取样部位	产地
滇黄精	<i>P. kingianum</i>	YC0073MT01	根	贵州贞丰
滇黄精	<i>P. kingianum</i>	YC0073MT02-04	叶	重庆
多花黄精	<i>P. cyrtanema</i>	YC0036MT01	根	江苏南京
多花黄精	<i>P. cyrtanema</i>	YC0036MT02	叶	江苏南京
多花黄精	<i>P. cyrtanema</i>	YC0036MT03	叶	安徽丫山
多花黄精	<i>P. cyrtanema</i>	YC0036MT04	叶	河南南阳
多花黄精	<i>P. cyrtanema</i>	YC0036MT05-06	根	河南南阳
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT13-15	根	北京八达岭
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT16	叶	北京八达岭
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT17-18	根	陕西秦岭
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT19	根	北京莲花山
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT20	叶	北京莲花山
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT21	叶	北京药植园
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT22	叶	北京药植园
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT27	根	天津盘山
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT28	根	天津盘山
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT29	根	天津盘山
黄精	<i>P. sibiricum</i>	YC0088MT30	叶	天津盘山
轮叶黄精	<i>P. verticillatum</i>	YC3334MT01	叶	云南大理
毛筒玉竹	<i>P. inflatum</i>	YC0150MT12	根	吉林通化
热河黄精	<i>P. macropodium</i>	YC3333MT01-02	根	北京八达岭
热河黄精	<i>P. macropodium</i>	YC3333MT04-08	根	天津盘山
玉竹	<i>P. odoratum</i>	YC0150MT01	根	湖北罗平
玉竹	<i>P. odoratum</i>	YC0150MT02-04	根	山西交城
玉竹	<i>P. odoratum</i>	YC0150MT05	叶	江苏连云港
玉竹	<i>P. odoratum</i>	YC0150MT06	叶	安徽
小玉竹	<i>P. humile</i>	YC0150MT07-09	叶	北京
小玉竹	<i>P. humile</i>	YC0150MT10	根	北京
小玉竹	<i>P. humile</i>	YC0150MT11	根	北京

1.2 方法 新鲜根茎采集后清洗干净,置于 45 ℃ 烘箱中烘干,硅胶干燥保存。根茎样品用 75% 乙醇擦拭药材表面后,刮去外表皮,取内部的药材约 30 mg,加入 1% 的 PVP(聚乙烷基吡咯烷酮);叶类样品

取样 20 mg,用 DNA 提取研磨仪 (Retsch MM400, Germany) 研磨 2 min (30 次/s) 后,利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China) 提取总 DNA。

rbcL、*matK*、*psbA-trnH*、ITS2 和 ITS 序列引物及 PCR 反应条件见文献研究^[18-19],部分样品采用 KIM3F/1R 引物^[18]扩增 *matK* 序列。序列拼接及比对参照 Chen 等研究^[19]。应用 MEGA5.0^[20] 进行种内和种间遗传距离计算,构建 barcoding gap 图,利用 BLAST 和 Nearest Distance 方法比较不同序列鉴定效率。

2 结果与分析

2.1 候选序列的序列特征 本研究 44 份样品,ITS2 和 ITS 序列 PCR 扩增及测序效率非常低,不能进行后续分析。共获得 41 条 *rbcL* 序列,39 条 *psbA-trnH* 序列,28 条 *matK* 序列,序列获得率分别为 93%、89% 和 64%。三条序列比对后长度分别为 564 bp,576 bp,651 bp,其中 GC 含量最高的序列为 *rbcL*,为 42.5%,*matK* 最低,为 30.6%。三条序列中 *rbcL* 变异位点最少,占总位点的 0.7%,*psbA-trnH* 序列与 *matK* 序列变异位点数相近,分别占总位点的 2.6% 和 2.0%,详见表 2。玉竹 *P. odoratum* 和黄精 *P. sibiricum* 的 10 份样品 *psbA-trnH* 序列存在 160-233 位点的序列缺失。

2.2 候选序列的种内种间变异分析 从表 3 中可以看出,*psbA-trnH* 序列的种内和种间遗传距离均最大,*matK* 序列次之,*rbcL* 序列最小。同时,从表 3 中可以看出三条序列的种内与种间遗传距离值均较小,且种内遗传距离与种间遗传距离差异较小。该结果与序列特征一致,从表 2 中可知,三条候选序列的变异位点数均较低,不能提供足够的变异来区分物种,导致种内种间遗传距离值均相对较低。

2.3 不同序列 barcoding gap 的评估 从不同序列种间变异和种内变异的分布图(图 1)来看,*rbcL*、*matK* 和 *psbA-trnH* 序列均没有明显的 barcoding gap,种内与种间变异均较小,大部分分布在 0~0.01 之间。

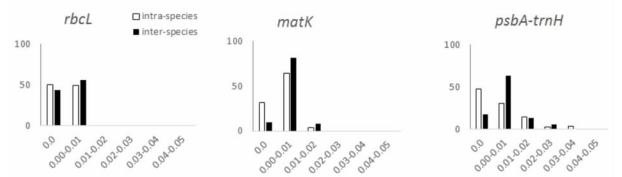


图 1 叶绿体 3 个候选序列 barcoding gap 图

表 2 黄精属药用植物 *rbcL*、*matK* 和 *psbA-trnH* 序列特征

Sequence characteristics	<i>rbcL</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>matK</i>
Length in <i>Polygonati Rhizoma</i> (bp)	564	563-576	648
Length in <i>Polygonati odorati Rhizoma</i> (bp)	564	566	648
Length in all taxa(bp)	564	490-576	648
Aligned length(bp)	564	576	648
GC content range(mean) in all taxa(%)	42. 02-42. 73(42. 5)	32. 30-34. 04(33. 6)	30. 40-31. 17(30. 6)
Number(and %) of variable sites in all taxa	4(0. 7)	15(2. 6)	13(2. 0)

表 3 叶绿体 3 个候选序列种内种间遗传距离

	<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>
All intra-specific distance	0. 0044 ± 0. 0040	0. 0052 ± 0. 0080	0. 0013 ± 0. 0016
Theta	0. 0024 ± 0. 0021	0. 0029 ± 0. 0039	0. 0008 ± 0. 0008
Coalescent depth	0. 0062 ± 0. 0061	0. 0087 ± 0. 0132	0. 0023 ± 0. 0029
All inter-specific distance	0. 0050 ± 0. 0031	0. 0066 ± 0. 0064	0. 0013 ± 0. 0014
Theta prime	0. 0037 ± 0. 0026	0. 0059 ± 0. 0059	0. 0011 ± 0. 0003
Minimum inter-specific distance	0. 0015 ± 0. 0027	0. 0007 ± 0. 0019	0

2.4 候选序列的鉴定效率评价 本研究使用 BLAST 和 Nearest Distance 算法来评估 *rbcL*、*matK* 和 *psbA-trnH* 序列的鉴定效率,发现两种鉴定方法得到结果基本一致。三条候选序列鉴定效率均较低,尤其是 *rbcL* 序列,鉴定效率低于 5% (BLAST 和 Nearest Distance)。 *psbA-trnH* 序列的 BLAST 鉴定效率最高,为 31%,*matK* 序列的 Nearest Distance 鉴定效率最高,为 29%,具体见图 2。

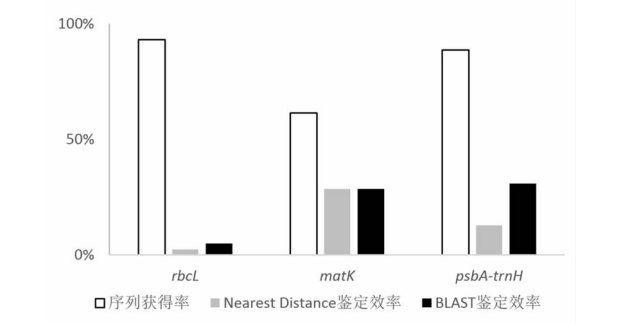


图 2 叶绿体 3 个候选序列获得率和鉴定效率

3 讨论

在黄精与玉竹的药材性状鉴别中,常依据根状茎的形态,划分为圆柱状、连珠状、鸡头状和姜块状 4 种,从根状茎的形态上难以区分其来源。黄精属在“属”一级以上的分类特征比较清晰,是公认的比较自然的属。然而,属内的分类比较困难,种间的形态特征有显著的交错过渡,变异复杂,常有种间杂交现象,种的界限相当模糊,致使该属的系统分类很不明确^[21]。研究者也曾利用染色体数目及结构变异的特点等从染色体分析角度对黄精属的分类问题进行探讨^[22-23],但这都不如从遗传物质进行分析准确^[24],有研究者利用 *psbA-trnH*、*rbcL*、*trnK* (*matK* 和

trnC-petN 来研) 究黄精属的系统进化,对现有的轮叶系和互叶系的分类提出疑问^[25]。本研究考察了 DNA 条形码候选序列对黄精属药用植物的鉴定能力,包括序列获得效率,基于 k2p 距离计算其种内种间变异情况,构建 barcoding gap 图和鉴定效率评价等。结果显示核 ITS 和 ITS2 序列应用通用引物扩增困难,三条叶绿体序列中,*matK* 序列的扩增和测序效率最低,*rbcL* 序列获得率最高为 93%。三条序列的变异位点数均较少,占比均小于 5%,说明序列的变异性较低,保守性较高。其中,变异率最低的为 *rbcL*,564 bp 长的序列只有 4 个变异位点,占比 0. 7%,不能为种间的成功鉴定提供基础。同时,通过 BLAST 和 Nearest Distance 算法得出的鉴定效率可知,*rbcL* 序列的鉴定成功率最低。通过与 Gen-Bank 中数据比对,三条候选序列可以实现对黄精属药用植物属水平的鉴定,但其种内变异与种间变异差异较小,对物种水平的鉴定能力有限。虽然目前已经建立了以 ITS2 序列为主的中药材 DNA 条形码分子鉴定法并在市场药材的监测中应用^[26-27],但本实验中 ITS/ITS2 序列在现在通用的引物扩增情况下,扩增效率较低,不能获得足够的序列信息。

随着叶绿体全基因组测序技术的发展,黄精属药用植物的分子鉴定工作可以通过其叶绿体全基因组序列实现鉴定,或基于叶绿体全基因组筛选合适的 DNA 片段来进行鉴定。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[S] (2010 年版). 北京:中国医药科技出版社,2010:78,288.
[2] 徐茂红,李卫平,公惠玲. 黄精多糖对四氧嘧啶糖尿病模型小鼠

- 糖脂代谢的影响[J]. 安徽医药, 2009, 13(3): 263-265.
- [3] 刘柳, 郑芸, 董群, 等. 黄精中的多糖组分及其免疫活性[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1132-1134.
- [4] 徐德平, 孙婧, 齐斌, 等. 黄精中三萜皂苷的提取分离与结构鉴定[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1470-1472.
- [5] 孙隆儒, 李铤. 黄精化学成分的研究(Ⅱ)[J]. 中草药, 2001, 32(7): 586-588.
- [6] Wang SY, Yu QJ, Bao JK, et al. Polygonatum Cyrtoneura lectin, a potential antineoplastic drug targeting programmed cell death pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(4): 497-500.
- [7] 汪滢, 王国平, 王丽薇, 等. 一株多花黄精内生真菌的鉴别及其抗菌代谢产物[J]. 微生物学报, 2010, 50(8): 1036-1043.
- [8] 林琳, 林寿全. 黄精属药用植物聚类分析[J]. 中药材, 1994, 17(6): 12-18.
- [9] Liu TS, Li Z, Liu CL. Analysis of Polygonatum odoratum and its substitutes by RAPD[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2002, 37: 734-736.
- [10] 刘塔斯, 李钟, 刘春林. 玉竹及其混伪品黄精的 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志, 2002, 37(10): 734-736.
- [11] 王润玲, 唐铖, 周晔, 等. 玉竹及其掺伪品的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2006, 37(11): 1727-1729.
- [12] 周晔, 王润玲, 唐铖, 等. RAPD 标记法鉴定中药黄精及长梗黄精的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2149-2150.
- [13] 周晔, 唐铖, 安适之, 等. ISSR 法鉴定中药玉竹与小玉竹[J]. 中医药学报, 2006, 34(5): 7-9.
- [14] 周晔, 王润玲, 唐铖, 等. ISSR 法鉴定中药黄精与卷叶黄精[J]. 天津医科大学学报, 2006, 12(2): 178-180, 189.
- [15] 陈士林, 庞晓慧, 罗焜, 等. 生物资源的 DNA 条形码技术[J]. 生命科学, 2013, 25(5): 458-466.
- [16] 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: 146, 403-404.
- [17] 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, 184.
- [18] Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, et al. A DNA barcode for land plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [19] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PloS One, 2010, 5(1): e8613.
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [21] 杨崇仁, 张影, 王东, 等. 黄精属植物甾体皂苷的分子进化及其化学分类学意义[J]. 云南植物研究, 2007, 29(5): 591-600.
- [22] 杨继, 汪劲武, 李懋学. 黄精属细胞分类学研究——Ⅲ. 国产 6 种黄精的染色体数目和核型[J]. 武汉植物学研究, 1992, 10(3): 201-206, 303.
- [23] 杨继, 汪劲武, 李懋学. 黄精属细胞分类学研究——Ⅱ. 四川金佛山地区黄精属植物核型[J]. 武汉植物学研究, 1988, 6(4): 311-314, 411-412.
- [24] 周晔, 唐铖, 高翔, 等. 中药玉竹的研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(2): 328-330.
- [25] Meng Y, Nie ZL, Deng T, et al. Phylogenetics and evolution of phyllostachy in the Solomon's seal genus Polygonatum (Asparagaceae: Polygonateae)[J]. Bot J Linn Soc, 2014, 176(4): 435-451.
- [26] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [27] Xin TY, Li XJ, Yao H, et al. Survey of commercial Rhodiola products revealed species diversity and potential safety issues[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8337.

(2015-06-29 收稿 责任编辑: 洪志强)

俄罗斯第一届中医药大会

由俄罗斯全俄中医师协会、俄罗斯李-维斯特集团公司主办, 世界中医药学会联合会作为支持单位的俄罗斯第一届中医药大会将于 2015 年 10 月 18 日在俄罗斯索契召开。会议以中医康复疗法与运动医学为主题, 邀请俄罗斯医疗领域专家进行专题学术研讨, 现诚邀境内外从事中医康复疗法、运动医学中医特色疗法、中医药各科临床及推广、中医药名称标准化、养生保健、老年医学等方面的专家前往参会并进行学术报告。

会议时间: 2015 年 10 月 18-19 日, 会议地址: 俄罗斯·索契, 会议议题: 1. 中医康复研究进展; 2. 中医临床经验研究介绍; 3. 中医在运动医学应用经验总结; 4. 中医特色疗法体会及推广; 5. 中医药各科

系临床及理论研究; 6. 中医药名称标准化推广状况; 7. 中医养生保健治未病研究; 8. 老年医学健康长寿研究; 9. 针灸临床实践研究体会; 10. 特殊针法临床经验介绍; 11. 针、药配合临床研究; 12. 其他相关议题。参会人员: 世界各地中医药、传统医药、现代医药及相关领域从事医疗、教育、科研、管理、生产、贸易的专家学者和政府官员等。联系方式: 世界中医药学会联合会, 联系人: 赵欣怡、刘子宁、刘佳龙, 电子邮箱: wfcms@foxmail.com, 电话: 0086-10-58239006; 58650234; 58650235, 传真: 010-58650041。

世界中医药学会联合会综合办公室
2015 年 7 月 1 日