

重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究

朱英杰^{1,2}, 陈士林², 姚辉^{2*}, 谭睿^{1*}, 宋经元², 罗焜³, 鲁静⁴

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 3. 湖北中医学院药学院, 湖北 武汉 430061; 4. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要: 为评价 DNA 条形码候选序列对重楼属药用植物的鉴定作用, 探讨重楼属药用植物鉴定新方法, 本研究对重楼属 11 个物种 17 份样品的 *psbA-trnH*、*rpoB*、*rpoC1*、*rbcL*、*matK* 和核 ITS2 序列进行 PCR 扩增和测序, 比较各序列扩增和测序效率、种内和种间变异, 进行 barcoding gap 分析, 采用 BLAST1 和 Nearest Distance 方法评价不同序列的鉴定能力。结果显示, ITS2 序列在所研究的重楼属药用植物中的扩增和测序效率均为 100%, 其种内种间变异、barcoding gap 与其他 DNA 条形码候选序列相比具有明显的优势, ITS2 序列在重楼属中的鉴定成功率达到 100%, 而生物条形码协会 (CBOL) 植物工作组推荐的 *matK* 和 *rbcL* 序列的鉴定成功率分别为 52.9% 和 5.9%, 二者联合鉴定能力没有提高, 对于 ITS2 序列扩大至 29 个物种 67 份样品依然具有 100% 的鉴定成功率。实验结果表明, ITS2 序列能够准确鉴定重楼属药用植物, 可以作为潜在的药用植物通用条形码序列。

关键词: 重楼属; DNA 条形码; ITS2; 药用植物; 鉴定

中图分类号: R931.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 03-0376-07

DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris*

ZHU Ying-jie^{1,2}, CHEN Shi-lin², YAO Hui^{2*}, TAN Rui^{1*}, SONG Jing-yuan², LUO Kun³, LU Jing⁴

(1. School of Bioscience and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 3. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 4. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: DNA barcoding is a technique in which species identification and discovery are performed by using short and standard fragments of DNA sequences. In this study, eleven species of *Paris*, including seven varieties, were sampled. Five chloroplast sequences, *psbA-trnH*, *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, and one nuclear marker, the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA, were amplified and sequenced. The PCR amplification and sequencing efficiency, intra- and inter-specific divergence and barcoding gap were used to evaluate different loci, and the identification efficiency was assessed using BLAST1 and Nearest Distance methods. The ITS2 sequences in the studied samples of *Paris* were amplified and sequenced successfully using primers designed by our group, while *matK* showed low level in the amplification and *psbA-trnH* was difficult for sequencing because of over 800 bp and poly (A) structure. Analysis of the intra- and inter-specific divergence and barcoding gap showed ITS2 was superior to other loci. The ITS2 showed a much higher percentage of success (100%) in identification than other five loci, none of which indicated more than 50% except *matK* (52.9%). The 2-locus combination of *rbcL+matK* didn't improve ability of authentication. In addition, the rate of successful identification with ITS2 kept 100% when the samples were expanded to 67 samples of 29 species. In conclusion, ITS2 can be used to correctly identify medicinal plants of *Paris*, and it will be a potential DNA barcode for identifying medicinal plants of other taxa.

收稿日期: 2009-11-17.

基金项目: 国际科技合作项目 (2007DFA30990); 卫生行业科研专项 (200802043).

*通讯作者 Tel: 86-10-62899727, Fax: 86-10-62899776, E-mail: scauyaoh@sina.com, tanrui.swjtu@gmail.com

Key words: *Paris*; DNA barcoding; ITS2; medicinal plant; identification

重楼属 (*Paris* L.) 是百合科多年生草本植物, 《中国植物志》英文版^[1]中记载重楼属植物全世界约有 39 个物种 (含 19 个变种), 主要分布在欧亚大陆的热带至温带地区。该属植物在国内多做药用, 其中滇重楼 [*Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.- Mazz.] 及华重楼 [*P. polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) Hara.] 收载于 2005 年版《中国药典》, 是云南白药等多种中药的重要原料之一。然而重楼植物分类复杂, 由于不同类群的特征性状交叉重叠, 各类型界限模糊不清, 给重楼药用植物鉴定带来困难^[2]。近年来, 随着对重楼需求量的增大, 野生重楼资源急剧减少, 商品药材品种混乱, 药材品质不一^[3], 寻找鉴定重楼药材的有效方法迫在眉睫。有关重楼植物鉴定, 已有形态学、细胞学 (包括核型和染色体多态性) 和 RAPD、AFLP 等 DNA 分子标记方面^[4, 5]的研究, 这些研究都为重楼属药用植物的鉴定提供了依据。而 DNA 条形码技术直接利用 DNA 序列进行物种的鉴定, 具有独一无二的可重复性, 为药用植物鉴定带来了新的机遇^[6]。

自加拿大动物学家 Paul Hebert^[7]于 2003 年首次提出 DNA 条形码 (DNA barcoding) 概念以来, DNA 条形码研究已成为近年来生物分类学研究的热点和前沿^[8]。DNA 条形码技术是利用基因组中一段通用的标准短序列来进行物种鉴定的分子诊断新技术^[6], 通过建立生物 DNA 条形码系统能够实现快速、准确和自动化的物种鉴定。截止目前, 研究者们已经提出了 10 多条植物候选 DNA 条形码序列^[9], 并在不同的类群中对各条形码的鉴定能力进行了考察, CBOL 植物工作组提出使用 *rbcL*+*matK* 复合序列作为植物界的通用条形码序列^[10], 但由于扩增效率、鉴定成功率等问题, 其在植物界的通用性仍受到质疑。ITS2 是真核生物 rDNA 上的一段顺反子, 位于 5.8S 和 26S rRNA 之间, 它在物种间具有显著地差异, 因此, 被广泛用于物种分类及系统进化研究^[11]。ITS2 序列具有适合扩增和测序的长度, 有利于对发生降解的样品进行扩增^[12]。ITS2 片段在物种水平的变异较快, 有更多的突变位点以区分不同的物种, 因此, 在 DNA 条形码鉴定物种方面具有潜在的研究价值。

本研究应用近年来提出的植物 DNA 条形码候选序列 *psbA-trnH*、*rpoB*、*rpoC1*、*rbcL*、*matK*^[13-15], 以及在系统进化中应用广泛的核 ITS2 序列^[16]对重楼属进行研究, 考查不同 DNA 条形码候选序列在重楼属

药用植物鉴定中的能力, 以期建立重楼属药用植物数字鉴定方法。

材料与方法

材料 重楼属实验材料 11 个物种 (含 7 个变种) 17 份样品采自云南、四川等地, 经中国药品生物制品检定所鲁静研究员和中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定, 凭证标本保存于中国药品生物制品检定所和中国医学科学院药用植物研究所。实验材料详见表 1, GenBank 登录号为 GU178884-GU178972。

Table 1 Samples for testing potential barcodes

Samples name	Sampling location	Voucher number
<i>Paris vietnamensis</i>	Yunnan Simao	PS1642MT01
<i>P. verticillata</i>	Liaoning Dalian	PS1635MT01
<i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	Yunnan Wuding	PS1637MT05
<i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	Yunnan Wuding	PS1637MT04
<i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	Yunnan Wuding	PS1637MT01
<i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	Yunnan Wuding	PS0051MT03
<i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	Shanxi Qinling	PS0051MT02
<i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	Sichuan Hongya	PS0051MT26
<i>P. polyphylla</i> var. <i>stenophylla</i>	Sichuan Hongya	PS1644MT21
<i>P. polyphylla</i> var. <i>stenophylla</i>	Yunnan Wuding	PS1644MT01
<i>P. fargesii</i> var. <i>fargesii</i>	Yunnan Wuding	PS1643MT01
<i>P. polyphylla</i> var. <i>pseudothibetica</i>	Yunnan Wuding	PS1636MT01
<i>P. polyphylla</i> var. <i>pseudothibetica</i>	Yunnan Wuding	PS1636MT02
<i>P. luquanensis</i>	Yunnan Wuding	PS1641MT01
<i>P. marmorata</i>	Yunnan Wuding	PS1638MT01
<i>P. delavayi</i> var. <i>delavayi</i>	Yunnan Wuding	PS1640MT01
<i>P. polyphylla</i> var. <i>polyphylla</i>	Sichuan Hongya	PS1651MT01

样品 DNA 的提取、PCR 扩增和测序 药材根茎使用 70%乙醇擦洗表面后研磨, 无水乙醇浸泡 5 min 后脱水, 植物叶片采用硅胶进行干燥, 取样 10 mg, 用 DNA 提取研磨仪 (Retsch MM400, Germany) 研磨 1 min (1 800 r·min⁻¹) 后, 使用北京天根生化 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。扩增 ITS2 序列所用引物, 正向为 5'-GCGATACTTGGTGTGAAT-3', 反向为 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体积为 25 μL, 体系内含 MgCl₂ 2 μL (25 mmol·L⁻¹)、dNTP 2 μL (2.5 mmol·L⁻¹)、PCR buffer 2.5 μL (10×)、引物各 1.0 μL (2.5 μmol·L⁻¹)、Taq 聚合酶 1.0 U、总 DNA 约 1 μL (~30 ng)。扩增程序: 94 °C, 变性 5 min; 再进行 40

个循环 (94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s); 最后 72 °C 延伸 10 min。其余各序列的 PCR 反应条件、通用引物及扩增程序参考文献^[12, 17-19]。PCR 扩增产物经纯化后, 使用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co., USA) 进行双向测序。

数据处理 测序峰图采用序列拼接软件 CodonCode Aligner V 2.06 (CodonCode Co., USA) 校对拼接, 去除低质量序列及引物区, 利用 ClustalX V2.0 (Higgins D.G.) 进行多序列比对并查错。

对于 ITS2 序列, 拼接得到一致序列后使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法, 去除两端 5.8S 和 26S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[20]。另外, 为了在重楼属更为广泛的范围内考察 ITS2 序列的鉴定能力, 作者从 GenBank 数据库中获得了重楼属的 ITS2 序列用于物种的鉴定效率分析。

17 个实验样本所得各序列经 ClustalW 1.83 进行序列比对, 用 PAUP 4b10 (Florida State University, USA) 计算 K2P 距离, 对不同序列种间、种内变异大小进行比较。采用计算机 Perl 语言统计不同序列种间、种内遗传距离的分布频度, 评价不同 DNA 条形码候选序列的 barcoding gap。最后采用相似性搜索算法 (BLAST1) 和最近距离法 (Nearest Distance) 考察序列的鉴定成功率^[21]。

结果

1 序列信息、PCR 扩增效率和测序成功率

各条 DNA 条形码候选序列的长度、GC 含量统计结果见表 2。各序列长度从 232~1 037 bp 不等, 其中 ITS2 序列最短, 为 232~234 bp, *psbA-trnH* 基因间隔区最长, 为 1 023~1 037 bp, 其间隔区中含有编码基因 *rps19*。各序列的 GC 含量也有不同, ITS2 的 GC 含量最高, 达到 57.3%, *psbA-trnH* 和 *matK* 则最低, AT 含量接近 70%。

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, 各候选序列的 PCR 扩增效率, *matK* 较低, 为 82.4%, *psbA-trnH*、*rpoC1* 和 ITS2 均为 100%, 经琼脂糖凝胶电泳得到 PCR 扩增电泳图 (图 1)。测序成功率以 *psbA-trnH* 最低, 为 76.5%, *rpoB*、*rpoC1* 和 ITS2 均为 100%。综合 PCR 扩增效率和测序成功率, 以 *rpoC1* 和 ITS2 序列最好, 均为 100%, *matK* 序列最低, 为 70.6%。

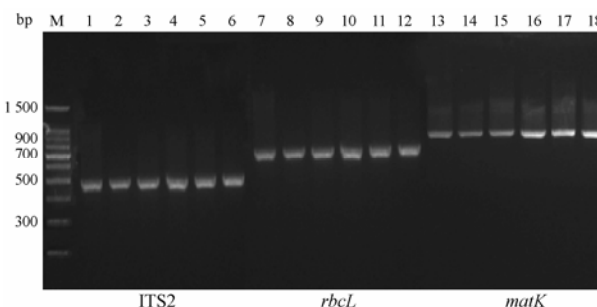


Figure 1 PCR amplification results of different loci. 1, 7, 13: *P. polyphylla* var. *Chinensis*; 2, 8, 14: *P. Verticillata*; 3, 9, 15: *P. polyphylla* var. *pseudothibetica*; 4, 10, 16: *P. polyphylla* var. *yunnanensis*; 5, 11, 17: *P. polyphylla* var. *polyphylla*; 6, 12, 18: *P. vietnamensis*

2 不同 DNA 条形码候选序列种内种间差异分析

在 Meyer 等^[22]对 DNA 条形码序列变异分析方法的基础上, 引入“种间最小变异” (minimum interspecific distance) 以对应种内最大变异 (coalescent depth)。对实验获得的重楼属不同 DNA 条形码候选序列的种内变异、种间变异、种间最小变异和种内最大变异进行分析。结果表明 (表 3), *rpoB* 序列的种间变异最大, 其次是 ITS2 序列, *rpoC1* 序列种间变异最小。各序列的种内变异同样是 *rpoB* 最大, *rpoC1* 和 *matK* 序列种内变异为 0。在种间最小变异中, ITS2 序列最大, *rpoB* 序列次之, *rpoC1* 序列最小。种内最大变异中, *rpoB* 序列最大, *rpoC1* 和 *matK* 序列最小, *psbA-trnH* 和 *rpoB* 的种内最大变异均超过了种间最小变异。

Table 2 Identification efficiency of six loci using different methods for species identification

Markers	<i>psbA-trnH</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpoC1</i>	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS2	
Length range /bp	1023-1037	472	487	703	894-899	232-234	
GC content/%	33.0	39.6	44.0	43.1	32.0	57.3	
Efficiency of PCR amplification/%	100	94.1	100	88.2	82.4	100	
Success rate of sequencing/%	76.5	100	100	93.3	85.7	100	
Relative identification efficiency/%	BLAST1	21.4	37.5	5.9	7.1	75	100
	Nearest Distance	21.4	37.5	5.9	7.1	50	100
Absolute identification efficiency/%	BLAST1	17.6	35.3	5.9	5.9	52.9	100
	Nearest Distance	17.6	35.3	5.9	5.9	35.3	100

Table 3 Analysis of inter-specific divergence between congeneric species and intra-specific variation of candidate barcodes

Marker	<i>psbA-trnH</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpoC1</i>	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS2
All inter-specific distance	0.005 7 ± 0.006 2	0.090 1 ± 0.071 6	0.000 3 ± 0.000 7	0.001 8 ± 0.003 4	0.001 9 ± 0.001 7	0.049 4 ± 0.024 3
All intra-specific distance	0.004 6 ± 0.007 1	0.069 0 ± 0.076 2	0	0.000 5 ± 0.000 8	0	0.003 8 ± 0.003 5
Minimum inter-specific distance	0.001 7 ± 0.004 2	0.002 6 ± 0.003 6	0.000 2 ± 0.000 7	0.000 9 ± 0.002 7	0.001 1 ± 0.001 5	0.035 4 ± 0.028 0
Coalescent depth	0.004 6 ± 0.007 1	0.065 7 ± 0.077 7	0	0.000 5 ± 0.000 8	0	0.004 9 ± 0.003 7

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。通过重楼属各条形码候选序列的种内变异、种间变异、种间最小变异和种内最大变异分析发现, ITS2 序列能够满足这一条件, 且种间最小变异明显大于种内最大变异。*rpoB* 序列虽然种间变异最大, 但种内变异也很大, 容易产生错误分类与鉴定。

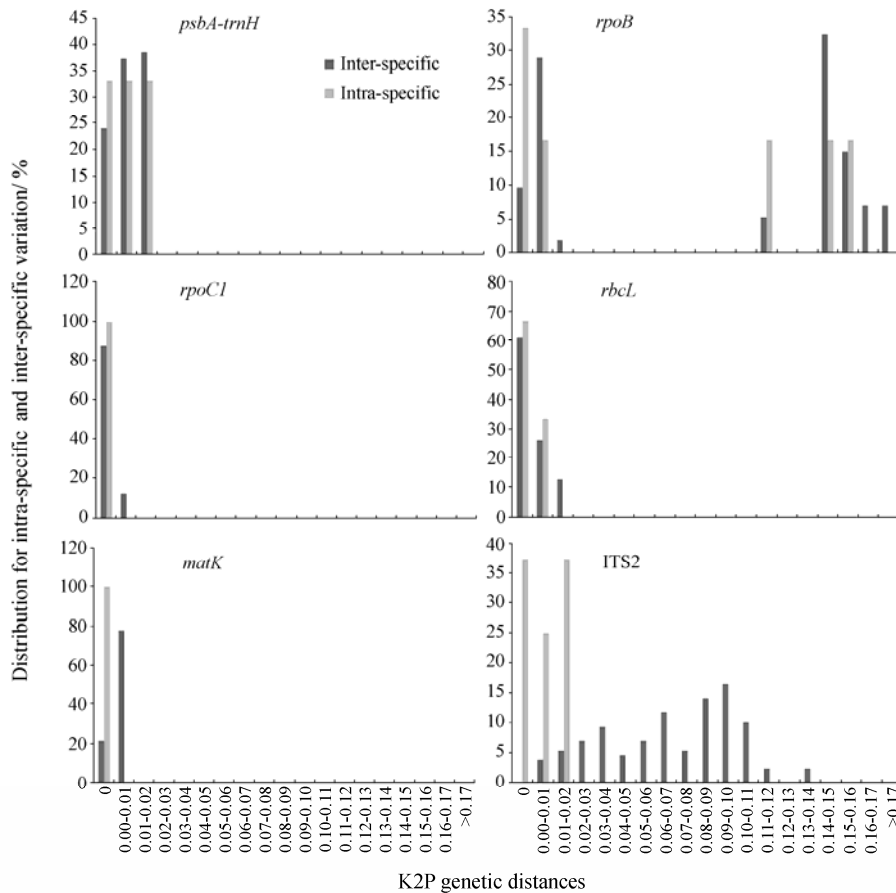
3 重楼属不同 DNA 条形码候选序列 barcoding gap 检验

理想的条形码种间遗传变异应明显大于种内遗传变异, 并在两者之间存在显著差异, 形成一个明显的间隔区, 即 barcoding gap^[17, 22]。重楼属不同 DNA 条形码候选序列 barcoding gap 图显示 (图 2): *psbA-trnH*、*rpoB*、*rpoC1* 和 *rbcL* 序列种内和种间遗传

变异重叠比例大, 无明显的 barcoding gap, 相比来说 *matK*、ITS2 序列虽然 barcoding gap 不明显, 但种内和种间遗传变异重叠比例较小, 有利于区分物种。

4 重楼属 DNA 条形码候选序列鉴定效率评价

比较不同序列对物种的鉴定能力是评价不同条形码序列优劣的标准之一。相对鉴定成功率和绝对鉴定成功率分别以测序成功样本和原始实验样本为基础。由表 2 可以看出, 通过 BLAST1 和 Nearest Distance 方法均显示 ITS2 序列的鉴定能力最高, 达到 100%, 其次是 *matK* 序列, 而其他序列鉴定效率均低于 50%。为验证 ITS2 在更多样本中的鉴定能力, 加入从 GenBank 下载的 28 个物种 (含 10 个变种) 50 条 ITS2 序列, 经 BLAST1 和 Nearest Distance 计算其鉴定成功率依然为 100%。另外, 作者还比较了 BLAST1

**Figure 2** Relative distribution of inter-specific divergence between congeneric species and intra-specific variation

和 Nearest Distance 这两种鉴定算法,发现 BLAST1 算法在鉴定的准确度和计算速度方面优于 Nearest Distance 算法,因此 BLAST1 鉴定更具实用性。

讨论

针对 DNA 条形码研究中的热点问题,本实验以重楼属为研究对象筛选重楼属药用植物候选条形码序列,并对 DNA 条形码技术在重楼属药用植物鉴定中的应用进行探讨。对于植物 DNA 条形码的研究,不同学者提出了多条 DNA 条形码候选序列及不同的序列组合,宁淑萍等^[9]和 Hollingsworth 等^[23]对此进行了较为详细的评述。

1 DNA 条形码筛选标准及重楼属各序列优缺点比较

理想的 DNA 条形码序列应能够使用单引物对进行扩增,通过双向测序得到高质量的序列,同时具有显著的种间差异和较小的种内变异^[10]。对重楼属不同序列分析发现,综合 PCR 扩增和测序成功率、barcoding gap 和鉴定成功率指标,ITS2 较其他条形码序列具有明显的优势,自行设计的 ITS2 引物在重楼属中获得了 100% 的 PCR 扩增效率,测序和鉴定结果均达到 100% 的理想值。*psbA-trnH*、*rpoC1* 和 *rbcL* 虽然具有较高的序列获得率,但其物种鉴定效率很低,*rpoB* 因具有较大的种内变异不利于分类和鉴定,*matK* 序列在区分物种上具有一定的优势,但受到扩增和测序的限制。

psbA-trnH、*rpoC1* 和 *rbcL* 虽然在重楼属植物中鉴定能力较差,但它们依然具有各自的特点。*psbA-trnH* 间隔区在被子植物中具有高度变异性^[12],它的两端具有 75 bp 的保守区序列,便于设计通用引物^[12, 15, 24],在重楼属中的扩增效率达 100%,但其序列较长、存在大量的 poly (A) 结构域^[25],降低了测序的质量,同时在不同物种中普遍存在插入/缺失的情况,从而导致不同物种该片段长度变异较大,难以进行比对,给数据分析带来一定的困难;*rpoC1* 序列长度集中在 487 bp 左右,扩增和测序都能够顺利完成,但序列非常保守,缺少足够的信息位点;*rpoB* 序列在序列长度、扩增和测序方面与 *rpoC1* 序列有类似之处,不同的是 *rpoB* 在表 3 中各指标均显示具有高的种间变异,但 35.3% 的鉴定成功率并没有反映出高指标序列应有的鉴定能力,这可能与某些物种 *rpoB* 序列具有较高的进化速率有关。

matK 序列是植物叶绿体 DNA 中进化较快的一

条编码区序列,也是多位研究者推荐的条形码序列之一^[15, 17, 26],特别是 Lahaye 等^[17]通过对 1 561 种植物的 *matK* 序列研究表明,*matK* 序列在种内变异、种间变异、barcoding gap 和 monophyly 检验中具有很好的效果,并提出 390F/1326R 引物在被子植物中较通用,但其研究结果也受到一些学者的质疑,Fazekas 等^[24]对来自于 32 个不同属的 92 个物种的研究结果发现此引物的扩增效率只有 88%,且需要 10 对引物才能全部扩增。在重楼属中 *matK* 序列的扩增效率为 82.4%,实验中需进行 2 次 PCR,最终能够鉴定重楼属 52.9% 的物种。CBOL 植物工作组通过对包括被子植物、裸子植物和藻类在内的 550 个物种的 *rpoB*、*rpoC1*、*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA*、*atpF-atpH* 和 *psbK-psbI* 序列进行研究,发现单序列、双序列和三序列组合分别可达到最高 69%、75% 和 76% 的鉴定能力,没有得到理想的单序列作为植物的通用条形码序列,最终推荐 *rbcL+matK* 的复合序列作为植物界的条形码,其鉴定能力为 72%,但 CBOL 植物工作组认为这项结果并不完美^[25]。重楼属 *rbcL* 序列扩增效率较高,但其鉴定成功率只有 5.9%,且 *rbcL* 序列能够鉴定的物种 *matK* 序列也同样可以鉴定,所以 *rbcL+matK* 复合序列对重楼属的鉴定能力没有提高。

2 ITS2 序列在重楼属药用植物及药材鉴定中的作用

本实验通过对叶绿体及核基因组部分片段进行研究,结果显示,ITS2 在重楼属植物鉴定方面具有以下特点:① ITS2 序列两端的 5.8S 和 26S 序列都很保守,便于通用引物的设计;② ITS2 序列较短,在重楼属植物中约为 200 bp,降低了提取、扩增和测序的难度,Kress 等^[12]认为短序列更有利于获取发生降解的样本序列,这对于 DNA 条形码在实际中的应用具有重要的意义;③ ITS2 序列能够与保守的 5.8S 和 26S 区段形成特定的颈环二级结构^[20, 27, 28],Schultz 等^[11]建立的 ITS2 数据库能够预测 ITS2 二级结构并对间隔区进行注释,数据库已有 216 374 条序列得到预测,这使 ITS2 序列的处理和分析更加准确可靠;④ ITS2 序列具有进化速率快的特点,较高的变异程度使其在区分物种方面能力较强,Müller 等^[29]使用互补碱基替换 (CBCs) 方法对 ITS2 的鉴定能力做出评估,得出 ITS2 序列具有足够的力量区分物种,Moniz 等^[30]使用 5.8S+ITS2 成功鉴定了硅藻属 99.5% 的物种。本实验通过对重楼属不同条形码序列进行比较,筛选得到的 ITS2 序列成功鉴定了包括华重楼、滇重楼、七叶一枝花、长药隔重楼等重要重楼属药用植物。除

少数重楼属物种外, 通过 ITS2 序列可将我国大部分重楼属物种区分开。

重楼为根茎入药, 而植物根茎经常存在寄生植物或真菌, 在提取样品 DNA 时进行前处理以避免霉变、虫蛀等问题。另外, 为了考察获得序列的正确性, 作者将所得序列与 GenBank 数据库进行比对搜索, 以保证序列未受真菌污染, 排除了“假阳性”数据的干扰。Chiou 等^[31]针对经过加工的药材专门设计了两对引物, 在 48 个科的 55 种药材中验证了其设计的 ITS2 引物具有较好的通用性, 本实验选取了 2 个滇重楼药材样本, 其 ITS2 序列得到成功扩增和测序, 说明应用 ITS2 序列鉴定药材具有可行性。

3 DNA 条形码技术在药用植物鉴定中的应用

中药材传统鉴定方法如植物形态、显微结构、超微结构和化学指纹图谱等鉴定方法, 在中药材鉴定和评价其质量研究中发挥了重要作用。随着分子生物学技术的快速发展, 中药材 DNA 分子鉴定技术及基因芯片技术等也被广泛应用于中药鉴定, Sucher 和 Yip 等^[32, 33]对此做了详细的比较。在中药材中 DNA 序列鉴定以 rDNA ITS 序列的应用最为广泛, 但不同物种的鉴定所采用的引物不具有通用性, 不同物种鉴定结果无可比性, 使其鉴定受到制约。DNA 条形码以一段短的基因片段作为通用序列进行鉴定, 能够在大的分类类群中形成统一的标准, 因此具有高通量、自动化、可靠性高等特点。陈士林等^[34]对药用植物及近缘种的 4 800 个物种 6 600 个样本进行研究, 发现 ITS2 序列在物种水平的鉴定成功率超过 90%, 证明 ITS2 在药用植物鉴定中将发挥关键作用。DNA 条形码技术在药材鉴定方面可以准确鉴定药材, 判明药材真伪, 尤其对于药材饮片和粉末, 可以不受性状限制, 对少量样品进行测试即可判定药材。通过对重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究, 将为药用植物鉴定、濒危物种保护以及资源评价等提供新的思路。

References

- [1] Liang SY, Soukup VG. 2000 *Paris L.* In: Wu ZY, Raven PH eds. *Flora of China Vol 24* [M]. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2002: 88–95.
- [2] Ji Y, Fritsch PW, Li H, et al. Phylogeny and classification of *Paris* (Melanthiaceae) inferred from DNA sequence data [J]. *Ann Bot*, 2006, 98: 245–256.
- [3] He J, Zhang S, Wang H. Advances in studies on and uses of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Trilliaceae) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2006, 28: 271–276.
- [4] Tang RH, Wang L, Tang XW, et al. Genetic diversity analysis of *Paris* by RAPD Markers [J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Ed)* (四川大学学报(自然科学版)), 2003, 40: 778–782.
- [5] Zhang R, Tang MX, Weng Z, et al. Application of AFLP technique on the genetic diversity of *Paris* [J]. *J Sichuan Univ (Nat Sci Ed)* (四川大学学报 自然科学版), 2006, 43: 1105–1109.
- [6] Chen SL, Song JY, Yao H, et al. Strategy and key technique of identification of Chinese herbal medicine using DNA barcoding [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2009, 7: 322–327.
- [7] Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: S96–99.
- [8] Gregory TR. DNA barcoding does not compete with taxonomy [J]. *Nature*, 2005, 434: 1067.
- [9] Ning SP, Yan HF, Gang H, et al. Current advances of DNA barcoding study in plants [J]. *Biodiv Sci* (生物多样性), 2008, 16: 417–425.
- [10] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12794–12797.
- [11] Schultz J, Müller T, Achtziger M, et al. The internal transcribed spacer 2 database — a web server for (not only) low level phylogenetic analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: W704–707.
- [12] Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8369–8374.
- [13] Yao H, Song JY, Ma XY, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 667–669.
- [14] Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2: e508.
- [15] Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, et al. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, 2007, 56: 295–299.
- [16] Song Z, Wang X, Liang G. Molecular evolution and phylogenetic utility of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) in Calypttratae (Diptera: Brachycera) [J]. *J Mol Evol*, 2008, 67: 448–464.
- [17] Lahaye R, Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 2923–2928.

- [18] Song JY, Yao H, Li Y, et al. Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124: 434–439.
- [19] Sass C, Little DP, Stevenson DW, et al. DNA barcoding in the cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads [J]. *PLoS One*, 2007, 2: e1154.
- [20] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50–57.
- [21] Ross HA, Murugan S, Li WL. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation [J]. *Syst Biol*, 2008, 57: 216–230.
- [22] Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J]. *PloS Biol*, 2005, 3: e422.
- [23] Hollingsworth ML, Clark A, Forrest LL, et al. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, 9: 439–457.
- [24] Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. *PLoS One*, 2008, 3: e2802.
- [25] Thomas C. Plant barcode soon to become reality [J]. *Science*, 2009, 325: 526.
- [26] Pennisi E. Taxonomy. Wanted: a barcode for plants [J]. *Science*, 2007, 318: 190–191.
- [27] Selig C, Wolf M, Müller T, et al. The ITS2 database II: homology modeling RNA structure for molecular systematic [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 36: D377–D380.
- [28] Dassanayake RS, Gunawardene YI, Silva BD. ITS-2 secondary structures and phylogeny of *Anopheles culicifacies* species [J]. *Bioinformatics*, 2008, 2: 456–460.
- [29] Müller T, Philippi N, Dandekar T, et al. Distinguishing species [J]. *RNA*, 2007, 13: 1469–1472.
- [30] Moniz MB, Kaczmarska I. Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited [J]. *Protist*, 2010, 161: 7–34.
- [31] Chiou SJ, Yen JH, Fang CL, et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers [J]. *Planta Med*, 2007, 73: 1421–1426.
- [32] Sucher NJ, Carles MC. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants [J]. *Planta Med*, 2008, 74: 603–623.
- [33] Yip PY, Chau CF, Mak CY, et al. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials [J]. *Chin Med*, 2007, 2: 9.
- [34] 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: e8613.