

DNA 条形码鉴定洋金花及其伪品

韩建萍¹, 李美妮^{1,2}, 罗焜¹, 刘美子¹, 陈晓辰¹, 陈士林^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193;
2. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为建立有毒中药洋金花及其伪品 DNA 条形码鉴定方法, 采用国际通用的条形码序列 ITS2、*psbA-trnH*、*matK* 和 *rbcL* 对洋金花原植物白花曼陀罗及其伪品毛曼陀罗、曼陀罗和木本曼陀罗 4 个种共计 20 份材料进行了比较研究。PCR 及测序成功率分别为 ITS2 (100%)、*matK* (100%)、*psbA-trnH* (90%)、*rbcL* (85%)。采用 CodonCode Aligner 进行序列拼接, 采用 MEGA 4.1 计算白花曼陀罗及其伪品的种内、种间的 K2P 距离, 并基于 K2P 模型构建 NJ 树。结果显示 ITS2 序列共有 30 个单核苷酸多态性 (SNPs) 位点、*psbA-trnH* 序列有 33 个单碱基的插入和缺失。ITS2 和 *psbA-trnH* 序列种间遗传距离大于种内, *matK* 和 *rbcL* 种内和种间没有明显 “Barcoding Gap”。4 个条形码序列及其组合获得的分子系统树 (ITS2、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL*、*matK+rbcL*) 均分成了两大支, 木本曼陀罗单聚为一支, 该分子证据支持将 *Brugmansia* 提升为属水平。实验结果表明 ITS2 及 *psbA-trnH* 序列可以作为洋金花及其伪品鉴定用的条形码序列。

关键词: 曼陀罗属; DNA 条形码; 分子鉴定

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1408-05

Identification of Daturae Flos and its adulterants based on DNA barcoding technique

HAN Jian-ping¹, LI Mei-ni^{1,2}, LUO Kun¹, LIU Mei-zi¹, CHEN Xiao-chen¹, CHEN Shi-lin^{1*}

(1. The Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education of PRC, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: To identify the original plant of Daturae Flos from its adulterants by DNA barcoding, the sequences of ITS2, *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL* of four species including *Datura metel*, *Datura innoxia*, *Datura stramonium* and *Brugmansia arborea* were compared and analyzed. The PCR and sequencing success rate of the four regions (ITS2, *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*) was 100%, 90%, 100% and 85%, respectively. Sequences were assembled with CodonCode Aligner. K2P distances were calculated and NJ tree was performed by MEGA 4.1. Thirty SNPs were found among ITS2 sequences, and 33 insert/deletes were found among *psbA-trnH* intergenic regions. The interspecific K2P distance of ITS2 and *psbA-trnH* was obviously higher than that of the intraspecific one. As to *matK* and *rbcL*, there was no “Barcoding Gap” existing between inter- and intra-specific distances. The NJ trees of the four regions/combinations were built separately. Samples of *Brugmansia arborea* were clustered into one clade, and the other species of *Datura* L. formed another clade. The results showed that either ITS2 or *psbA-trnH* was useful to identify Daturae Flos from its adulterants.

Key words: *Datura metel*; DNA barcoding; molecular identification

收稿日期: 2011-07-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001608).

*通讯作者 Tel: 86-10-62899727, E-mail: slchen@implad.ac.cn

洋金花为茄科植物白花曼陀罗 (*Datura metel* L.) 的干燥花。最早收载于《本草纲目》, 洋金花的主要化学成分为东莨菪碱、阿托品等莨菪类生物碱^[1], 具有平喘止咳、镇痛、解痉的功效, 主要用于哮喘、咳嗽、脘腹冷痛、风湿痹痛、外科麻醉等。洋金花鉴定非常困难^[2], 东莨菪类生物碱对细胞核内物质有损伤作用, 即能诱发染色体严重损伤。商品洋金花多掺混有曼陀罗 (*D. stramonium* L.) 的花。曼陀罗花含东莨菪碱较少, 故不宜作正品洋金花用。曼陀罗花和种子均有剧毒, 国家将其列为毒性中药管理品种。该属分类比较混乱, 同物异名, 异物同名现象屡见不鲜^[2]。如毛曼陀罗 (*D. innoxia* Mill) 和白花曼陀罗 (*D. metel* L.) 是两个独立的种, 毛曼陀罗的花 (北洋金花) 一般认为品质较差, 两种花形态相似, 误认的情况常有发生^[2, 3]。木本曼陀罗 (*Brugmansia arborea* L.) 含东莨菪碱且产量较高, 也常被误用做洋金花使用^[4]。四者种子形态相近不易区分^[5]。前人曾利用形态和显微特征对洋金花及其伪品的种子和花进行鉴定^[4, 6, 7]。但是有关曼陀罗种子分类特征的描述很少, 依据种子分类特征仅能作为该属进行鉴定的参考依据^[4]。

DNA 条形码技术是利用一段短的、标准的 DNA 序列进行物种鉴定的新方法, 该方法不受物种发育阶段 (叶片、种子、花、果实等) 和药材形态 (原药

材或粉末) 的限制, 具有较强的通用性, 目前已被广泛应用于药用植物及原药材的鉴定^[8-11]。第三届条形码大会国际植物条形码组织 (CBOL) 提出 *matK* 和 *rbcL* 序列作为国际通用的条形码序列, ITS/ITS2 序列和 *psbA-trnH* 作为补充序列。因此, 本研究利用 *matK*、*rbcL*、ITS2、*psbA-trnH* 这 4 条通用的条形码对洋金花及其易混品进行鉴定, 为临床安全用药提供依据。

材料与方法

采样信息见表 1, 实验材料样品由中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定。叶片经硅胶干燥后保存备用。标本保存在中国医学科学院药用植物研究所标本馆。采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiagen Biotech Co., China) 提取 DNA。

引物及反应条件见表 2, 扩增在 Bio-Rad PCR 仪上进行。从琼脂糖凝胶上切下扩增的目的 DNA 片段, 用天根胶回收试剂盒 (Tiagen Biotech Co., China) 对目的片段进行回收, 经纯化后作为测序反应的模板。采用 PCR 产物直接测序, 测序引物为 PCR 反应的引物, 用 ABI3730XL 进行测序。获得的实验测序峰图利用 CodonCode Aligner (CodonCode Co., USA) 校对拼接, 去除引物区。用 MEGA 4.1 计算 K2P 种间和种内遗传距离, 构建 NJ 系统树^[12]。

Table 1 Plant samples used in this study. *IMPLAD: Institute of Medicinal Plant Development

Species name	Voucher number	Location	GenBank Acc. No.			
			<i>psbA-trnH</i>	ITS2	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
<i>Datura stramonium</i>	PS1145MT01	Nanning, Guangxi	JN244368	JN244318	JN244349	JN244351
<i>Datura stramonium</i>	PS1145MT02	Nanning, Guangxi	JN244369	JN244319	JN244350	JN244352
<i>Datura stramonium</i>	PS1145MT03	Nanning, Guangxi	JN244370	JN244320	JN244334	JN244353
<i>Datura stramonium</i>	PS1145MT04	Nanning, Guangxi	JN244371	JN244321	JN244335	JN244354
<i>Datura stramonium</i>	PS1145MT05	Nanning, Guangxi	JN244372	JN244322	JN244336	JN244355
<i>Datura stramonium</i>	PS1145MT06	Nanning, Guangxi	JN244373	JN244323	JN244337	JN244356
<i>Datura stramonium</i>	PS1145MT07	Nanning, Guangxi	JN244374	JN244324	JN244338	JN244357
<i>Datura innoxia</i>	PS1146MT01	Nanning, Guangxi	JN244375	JN244325	JN244339	JN244358
<i>Datura innoxia</i>	PS1146MT02	Nanning, Guangxi	JN244376	JN244326	JN244340	JN244359
<i>Datura innoxia</i>	PS1146MT03	Nanning, Guangxi	JN244377	JN244327	JN244341	JN244360
<i>Datura innoxia</i>	PS1146MT04	Herbarium (IMPLAD)*, Beijing	GQ435286	GQ434669	GQ434218	—
<i>Brugmansia arborea</i>	PS1147MT01	Chendu, Sichuan	—	GQ434670	JN244342	—
<i>Brugmansia arborea</i>	PS1147MT02	Nanning, Guangxi	JN244378	JN244328	JN244343	JN244361
<i>Brugmansia arborea</i>	PS1147MT03	Nanning, Guangxi	JN244379	JN244329	JN244344	JN244362
<i>Brugmansia arborea</i>	PS1147MT04	Nanning, Guangxi	JN244380	JN244330	JN244345	JN244363
<i>Datura metel</i>	PS1152MT01	Herbarium (IMPLAD), Beijing	GQ435287	GQ434671	GQ434220	JN244364
<i>Datura metel</i>	PS1152MT02	Putian, Fujian	—	GQ434672	GQ434221	—
<i>Datura metel</i>	PS1152MT03	Nanning, Guangxi	JN244381	JN244331	JN244346	JN244365
<i>Datura metel</i>	PS1152MT04	Nanning, Guangxi	JN244382	JN244332	JN244347	JN244366
<i>Datura metel</i>	PS1152MT05	Nanning, Guangxi	JN244383	JN244333	JN244348	JN244367

Table 2 Primers and reaction conditions used in this study^[13-15]

Gene	Primer	5'-3'	Conditions
ITS2	ITS2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 °C 5 min, 40 cycles (94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s),
	ITS3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	72 °C 10 min
<i>psbA-trnH</i>	PA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	94 °C 5 min, 30 cycles (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min),
	TH	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	72 °C 7 min
<i>matK</i>	3F-KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	94 °C 4 min, 40 cycles (94 °C 30 s, 53 °C 40 s, 72 °C 40 s),
	IR-KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	72 °C 7 min
<i>rbcL</i>	RL1	ATGTCACCACAAACAGAAAC	95 °C 2 min, 30 cycles (94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min),
	RL2	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	72 °C 7 min

结果与讨论

1 种内与种间变异分析

4个物种20份样本的PCR及测序成功率分别为ITS2(100%)、*matK*(100%)、*psbA-trnH*(90%)和*rbcL*(85%)(表3)。4个物种的ITS2、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL*序列长度分别为230~233 bp、419~445 bp、731 bp和662~663 bp。*psbA-trnH*序列长度变异较大,共有33个碱基的插入和缺失变异,白花曼陀罗和毛曼陀罗的*psbA-trnH*序列间存在两处大片段的插入和缺失变异,分别在128 bp处7个碱基的插入和281 bp处20个碱基的缺失,两个物种间存在3个SNP,分别为13 bp 'A-G'、274 bp 'C-T'和448 bp 'T-G'突变。利用MEGA 4.1软件计算种内和种间的遗传距离,ITS2种间序列变异较大,有30个单碱基突变,种间遗传变异(0.018~0.115)大于种内遗传变异(0~0.013)。*psbA-trnH*序列种间遗传变异(0.005~0.022)亦大于种内遗传变异(0~0.001),因此,ITS2和*psbA-trnH*序列可用作洋金花的分子鉴定。*matK*种间(0.001~0.014)和种内(0~0.004)遗传距离有重叠区,*rbcL*各物种种内变异为0,种间距离也较小(0~0.009),因此*matK*和*rbcL*不能用作洋金花的鉴定。

2 曼陀罗属NJ树鉴定

为了更直观的显示鉴定结果,本文应用MEGA 4.1软件分别构建ITS2、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL*、*matK+rbcL*的NJ树(图1),4条条形码序列及其组合获得的分子系统树均分成了两大支,*Brugmansia arborea*各样本单独成一支,*Datura*属3个种形成另一分支,各序列两支间靴带支持率都在95%以上。从NJ树(图1A、1B)可以看出,ITS2序列可将4个种区分开,其中白花曼陀罗与毛曼陀罗的亲缘关系最近,这两个物种不同个体间分成两个独立支,靴带支持率为96%。各样品ITS2序列变异具地域性,如白花曼陀罗广西与福建样品的遗传距离较远;木本曼陀罗华西与广西的样品距离较远。应用*psbA-trnH*序列亦可有效区分各物种。在*matK*、*rbcL*以及*matK+rbcL*序列构建的NJ树(图1C~1E)上,白花曼陀罗和毛曼陀罗各样品聚在不同的进化枝,因此这两个序列及其组合不能有效区分洋金花及其伪品。

3 讨论

在第三届DNA条形码大会上国际植物条形码工作组提出将*matK*和*rbcL*作为通用的条形码序列,ITS/ITS2和*psbA-trnH*序列作为补充序列继续进行研究。本文利用这4条候选的条形码对洋金花及其伪

Table 3 Sequence characteristics and nucleotide sequence divergence of ITS2, *psbA-trnH*, *matK* and *rbcL* across *Datura* species

	ITS2	<i>psbA-trnH</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
PCR and sequencing	20 (20)	18 (20)	20 (20)	17 (20)
Number of nucleotides /bp	230-233	419-445	731	662-663
Number of informative characters	30	11	15	6
Number of indels	5	33	0	1
Percentage of interspecific sequence divergence	0.018-0.115	0.005-0.022	0.001-0.014	0-0.009
Percentage of intraspecific sequence divergence				
<i>Datura stramonium</i>	0	0.001	0	0
<i>Datura innoxia</i>	0	0	0.001	0
<i>Datura metel</i>	0.003	0	0	0
<i>Brugmansia arborea</i>	0.013	0	0.004	0

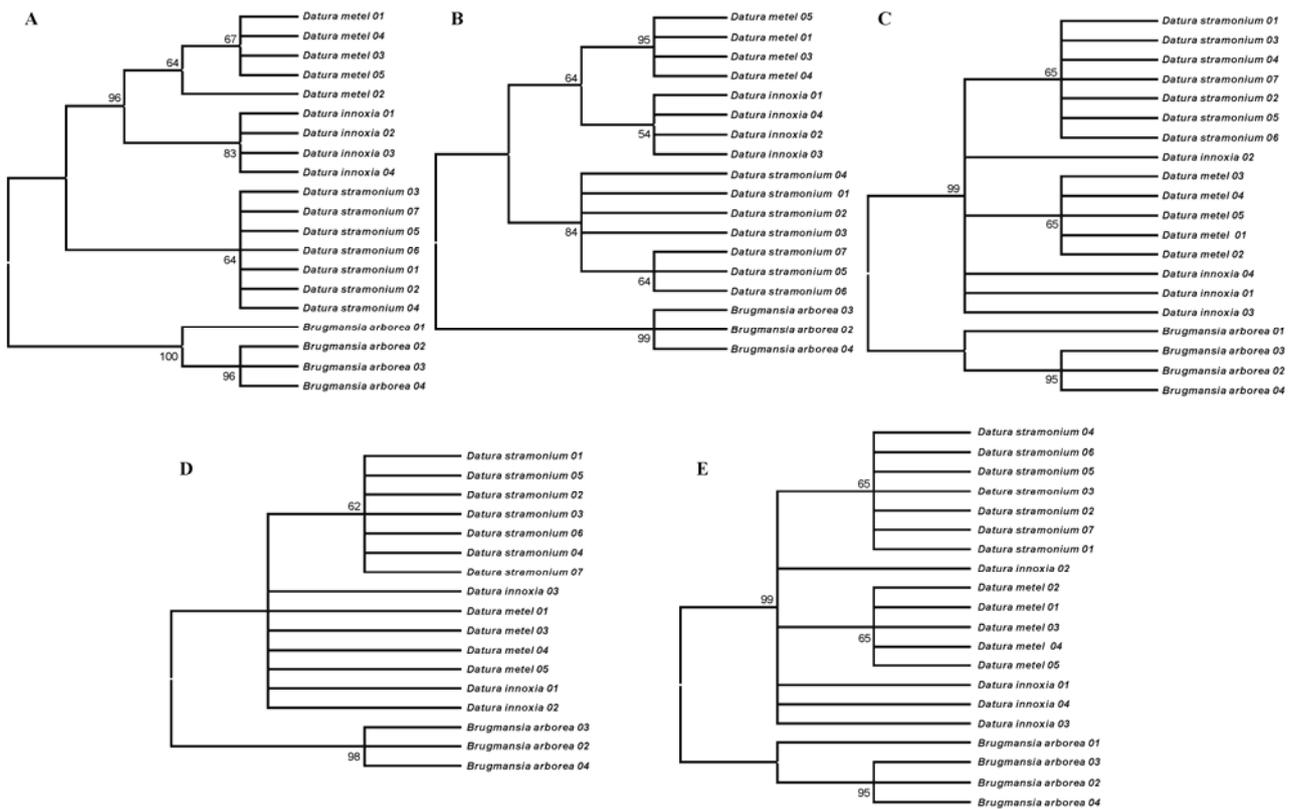


Figure 1 Phylogenetic tree constructed using NJ method. Bootstrap values (>50%) are shown above the relevant branches. A: ITS2; B: *psbA-trnH*; C: *matK*; D: *rbcL*; E: *matK+rbcL*

品进行鉴定, 种内和种间遗传距离比较和 NJ 树分析结果表明, ITS2 和 *psbA-trnH* 序列种间变异大于种内变异, 可以作为洋金花鉴定用的条形码序列。*matK*、*rbcL* 属于叶绿体基因组序列, 通过母性单亲遗传, 由此构建的分支关系往往不能真正反映种内进化方向, 双亲遗传的核基因 ITS2 序列变异与植物的地理分布相关, 白花曼陀罗和木本曼陀罗种内分化具有地域性, 地理位置相近的样品首先聚在一起。

关于木本曼陀罗的归属一直存在争议, 1805 年 Persson 将木本曼陀罗组 (Sect. *Brugmansia*) 作为一个独立的属, 命名为 *Brugmansia*^[16]。而中国植物志第 67 卷根据木本曼陀罗的果实俯垂、不规则开裂、表面光滑及其组织肉质等特征仍将其放在曼陀罗属下。新版《Flora of China》则报道曼陀罗属仅有 3 种, 即白花曼陀罗 (*D. metel*)、曼陀罗 (*D. stramonium*) 和毛曼陀罗 (*D. innoxia*)。本研究首次利用 DNA 条形码对洋金花及其伪品进行鉴定, 确立了鉴定用的条形码序列, 并为该属植物系统关系研究提供可靠依据。从 4 条序列 NJ 树分析结果表明: 木本曼陀罗与其他 3 个物种形成两大分支, 靴带支持率均在 95% 以上, 结果支持将该种从曼陀罗属中移出来, 提升为

属级水平, 即 *Brugmansia* 属, 这与 Persson 等根据 *Brugmansia* 属木本的性状将 *Brugmansia* 单独作为茄科的一个属的结果一致, 分子证据进一步支持将木本曼陀罗提升为属的处理意见。

References

- [1] Institute of Medicinal Plant Development of Chinese Academy of Medical Sciences. Chinese Materia Medica (中药志) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994: 268-273.
- [2] Cheng JR, Fang JF. The taxonomic identification of *Daturae Flos* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1955, 3: 89-94.
- [3] Zhou TY, Xu GJ, Pei J, et al. A systematic and pharmacognostical study on five species of *datura* in China [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1955, 3: 149-177.
- [4] Huang SX, Li SY, Fang ZJ. Study on taxonomic identification of *Datura arborea* and *Datura metel* [J]. Acad J Guangdong Coll Pharm (广东药学院学报), 2005, 21: 17-20.
- [5] Yin LP, Xu Y, Fu JG, et al. Identification characteristics of the harmful weeds of *Datura* and their seeds [J]. Plant Quarantine (植物检疫), 2008, 22: 97-99.
- [6] Kang QG, Ji JY, Wang JP, et al. Microscopic identification of four species of *Daturae Flos* [J]. Bull Chin Mate Med (中药

- 通报), 1987, 12: 12-15.
- [7] Zhou LB, Nie FT. Identification of the seeds of *Datura innoxia* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2003, 26: 858-860.
- [8] Han JP, Li MN, Shi LC, et al. Identification of *Amomi fructus* and its adulterants based on ITS2 sequences [J]. Global Tradit Chin Med (环球中医药), 2011, 4: 99-102.
- [9] Han JP, Shi LC, Chen SL, et al. Authentication of *Ajuga ciliate* and its close species using ITS2 sequence [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med (世界科学技术-中医药现代化), 2008, 10: 86-89.
- [10] Zhu YJ, Chen SL, Song JY, et al. DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 376-382.
- [11] Han JP, Song JY, Liu CH, et al. Identification of *Cistanche* species (Orobanchaceae) based on sequences of the plastid *psbA-trnH* intergenic region [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 126-130.
- [12] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1596-1599.
- [13] 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.
- [14] Gao T, Yao H, Song JY, et al. Evaluating the feasibility of using candidate DNA Barcodes in discriminating species of the large *Asteraceae* family [J]. BMC Evol Biol, 2010, 10: 324.
- [15] Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, et al. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in *panama* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 18621.
- [16] The Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol 67. Beijing: Science Press, 1978.

《中国药学杂志》2012 年征订启事

《中国药学杂志》是我国药学界创刊最早、发行量较大、反映我国药学各学科进展和动态的最具权威性和影响的综合性学术核心期刊之一。读者群为高、中级药学工作者以及其他医药卫生人员。内容包括药理学各学科, 辟有院士笔谈、专家笔谈、综述、论著 (内容包括: 重大新药创制、生物技术、中药及天然药物、药理、药剂、临床药学、药品质量及检验、药物化学)、药物与临床、新药述评、药学史、药学人物、药事管理、学术讨论、科研简报等栏目。创刊 58 年来在医药卫生界享有很高声誉。连续三次荣获国家期刊奖, 三次荣获中国科协优秀科技期刊一等奖。2007 年获“百种杰出学术期刊”称号。2006~2011 年连续六年被评为“中国科协精品期刊工程项目资助期刊”。被美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)、《国际药学文摘》(IPA) 收录, 加入中国学术期刊光盘版, 进入北大中文科技期刊目录 (核心版, 排名第 2)。欢迎广大医药工作者积极订阅。

地址: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1803 室, 100022。半月刊。

电话: 010-58699280/75/76/78/79, 传真: 010-58699295, 网址: www.zgyxzz.com.cn

电子信箱: zgyxzz@cpa.org.cn, 邮发代号: 2-232, 定价: 每期 30 元, 全年 720 元。