

# 三种荆州半夏的 ITS 序列分析与种属鉴定\*

张文涛<sup>1</sup> 喻 静<sup>1</sup> 刘亦良<sup>1</sup> 张本厚<sup>2</sup> 陈集双<sup>1,2\*\*</sup>

(1 南京工业大学生物与制药工程学院 南京 211816 2 南京工业大学大丰海洋产业研究院 盐城 224100)

**摘要** 通过采集自湖北荆州地区的三种不同表现型的半夏属植物的叶片组织中提取基因组,纯化后经直接 PCR 扩增得到其对应的 ITS 序列并测序。运用 NCBI GenBank 数据库进行序列比对与进化树分析。根据比对与分析结果,结合植物形态学特征显示, HBB-01 为 *Pinellia ternata*, 为《中国药典》中规定的半夏类药材品种; HBD-02 为 *P. tripartita*, 为药用半夏的混淆品; HBF-03 的结果较为复杂, 其不仅与芋属 (*Colocasia*) 天南星属 (*Arisaema*)、半夏属 (*Pinellia*) 等植物 ITS 序列的同源性高达 80% 以上, 而且在进化关系上, 它们也有一定关联。所以推测 HBF-03 可能为天南星科不同属但亲缘关系较近的植物产生的变种, 具体种属来源有待进一步论证。通过三种半夏种属来源及其亲缘关系的分析, 鉴定了荆州地区的半夏人工种植的主要品种, 对其当地药农种植符合《中国药典》规范的半夏药材具有指导意义, 为后续优质半夏资源的保护与选育提供了参考依据。

**关键词** 半夏 种质资源 分子鉴定 亲缘关系

**中图分类号** Q349

半夏 [*Pinellia ternata* (Thunb.) Briet] 隶属天南星科 (*Araceae*), 是我国传统大宗常用中药材, 其块茎入药, 具有止咳、镇吐、抗早孕等功效, 是临床上常用的镇咳祛痰药<sup>[1]</sup>。全球约有 105 属, 3 700 多种<sup>[2]</sup>, 其主要分布在亚洲东南部。在天南星科 105 属中, 处于南星亚科半夏属 (*Pinellia*) 是唯一的东亚分布型, 该属植物目前在中国已报道的有 10 种, 分别为滴水珠 (*P. cordata*)、石蜘蛛 (*P. integrifolia*)、掌叶半夏 (*P. pedatisecta*)、盾叶半夏 (*P. peltata*)、半夏 (*P. ternata*)、大半夏 (*P. polyphylla*)、鹞落坪半夏 (*P. yaoluopingensis*)、三裂叶半夏 (*P. tripartita*)、姉归半夏 (*P. ziguiensis*) 及五叶半夏 (*P. ternate*)<sup>[3]</sup>。

近年来, 半夏作为一类药用植物, 泛指三叶半夏 [*Pinellia ternata* (Thunb.) Briet], 还包括掌叶半夏、盾叶半夏、水半夏 [*Typhonium flagelliforme*. (Lodd.) Blume] 等, 它们都有类似半夏的功效。但药典中关于

半夏药材及饮片的描述特指三叶半夏, 其他都是在市场上和药用中的伪品。同时, 半夏种群内部变异明显, 如叶形有心形叶、柳叶形、桃叶形的区别; 块茎的圆形与椭圆形区别; 珠芽数量的区别; 染色体倍数变化的区别等。造成这些变化的主要原因是地域差异和不同生态环境导致其生态型的多样性。本研究主要利用 PCR 技术扩增植物 rDNA 基因转录本的 ITS 保守序列, 通过 NCBI GenBank 数据库进行序列相似性进行比对分析, 进而了解三种荆州半夏在分类学上的地位及其种属来源与亲缘关系, 为指导湖北荆州地区栽培种植符合药典规定的半夏药材和选育优质半夏资源提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用样品于 2013 年 5 月同期采自湖北省荆州地区半夏种植基地田间, 三种半夏属植物分别标记为 HBB-01、HBD-02、HBF-03, 如图 1, 形态特征描述见表 1。

### 1.2 仪器与试剂

所需主要实验仪器为 PCR 仪 T100 (美国, Bio-Rad); 台式离心机 SL16R (德国, Thermo); 数显恒温水

收稿日期: 2014-10-15 修回日期: 2014-11-21

\* 江苏省科技支撑计划 (BE2014408), 江苏省自然科学基金 (BK20141265) 资助项目

\*\* 通讯作者, 电子信箱: biochenjs@njtech.edu.cn



图 1 三种半夏属植物形态特征

Fig.1 Characteristics of three cultivars of Pinellia

表 1 三种半夏属植物的形态描述

Table 1 Description of three cultivars of Pinellia

序号	样品	形态描述
1	HBB-01	株高约 14cm;三裂叶,椭圆形;叶柄长 9cm,顶部与基部均有 3~5mm 单株芽产生;地下块茎长圆形,直径约 0.8cm,土黄色。
2	HBD-02	株高约 19cm;三裂叶,椭圆形;叶柄长 13cm,顶端双珠芽,根部单珠芽,平均直径 4~6mm;地下块茎近圆形,直径约 2cm,土黄色。
3	HBF-03	株高约 13cm;三裂叶,少数四裂叶,柳叶形;叶柄长 8cm,基部有 5~8mm 单株芽或双株芽;地下块茎形状不规则,附生小块茎,最大处直径约 7cm,黄褐色。

清,重复步骤 3。5)取上清,氯仿:异戊醇(24:1)抽提 1 次。6)上清液中加等体积异丙醇沉淀。7)12 000r/min 离心 10min,去上清,75% 乙醇洗沉淀。8)沉淀溶于 100μl RTE 中,37℃ 恒温 30min。9)取 3μl 进行 1% 琼脂糖电泳检测。

1.3.2 ITS 序列扩增及测序 ITS 序列 PCR 扩增引物: ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'扩增体系如表 2<sup>[4]</sup>。

1.3.3 PCR 产物的纯化回收 使用 Axyprep DNA 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收,具体步骤参见使用说明书。

1.3.4 ITS 序列分析 在 NCBI 的 GenBank 数据库中下载用于比对和进化树分析的天南星科半夏属及其相关近亲缘属植物的 ITS 序列,运用 MEGA 5.1 等软件对三种荆半夏的 ITS 序列和网上报道的序列进行比对分析,从而判断其进化关系与种属地位。

浴锅 HH-8(8 孔)(中国,常州国华)。

实验所用主要试剂为乙二胺四乙酸(EDTA)、二甲亚砜(DMSO)、十二烷基磺酸钠(SDS)、甲酰胺(Formamide)、三羟甲基氨基甲烷(Trise-base)、DNA polymerase、随机引物(Random primer)、dNTP、PCR Cleanup Kit、50 bp DNA Ladder Marker、DNasecure plant kit、Cy5-dCTP 等。

1.3 实验方法

1.3.1 植物基因组提取 1)取 0.2~0.5g 半夏属植物叶片用液氮研磨至粉末状,加入 750μl CTAB 提取液,混匀后,转移至 1.5ml 离心管中。2)65℃ 水浴 1h,每 20min 上下颠倒一次。3)加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀,12 000r/min 离心 10min。4)取上

表 2 PCR 反应体系(50 μl)与扩增程序

Table 2 PCR system (50 μl) and amplification program

组分		体积(共 50μl)
模板(基因组 1:100 稀释后)		1 μl
引物 ITS4(20 μmol/L)		1 μl
引物 ITS5(20 μmol/L)		1 μl
DNA 合成酶 rTaq		0.5 μl
dNTP(10 mmol/L)		1 μl
10 × Buffer		5 μl
ddH <sub>2</sub> O		40.5 μl
步骤		温度/时间
35 cycles	预变性	94℃ 3 min
	变性	94℃ 30 s
	退火	55℃ 30 s
	延伸	72℃ 2 min
	延伸	72℃ 10 min

2 结果与分析

2.1 基因组提取及其对应 PCR 结果

三种荆半夏叶片组织中 DNA 提取纯化,经直接 PCR 扩增后得到 ITS 序列片段。基因组 DNA 及其 PCR 产物经 1% 琼脂糖胶电泳检测后,结果如图 2 和图 3 所示。

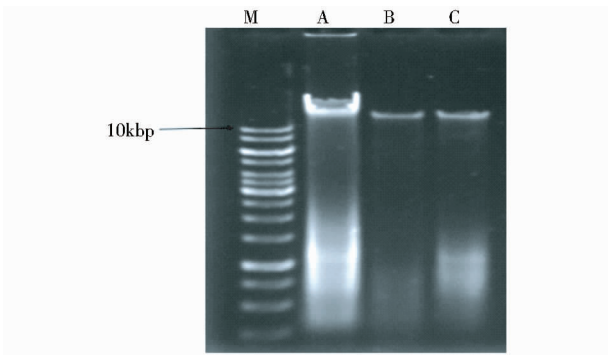


图 2 三种半夏属植物基因组电泳检测图  
Fig.2 Electrophoresis result of the genomic DNA from three cultivars of *Pinellia*  
M: DNA Marker; A: HBB-01; B: HBD-02; C: HBF-03

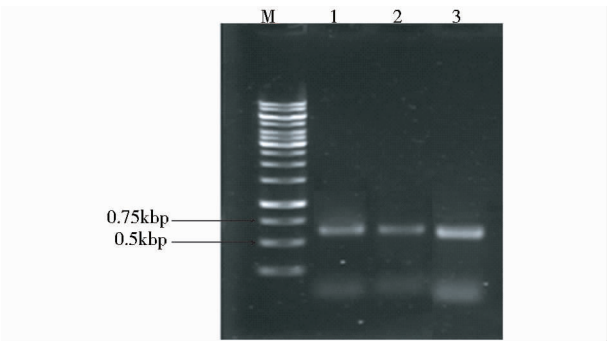


图 3 三种半夏属植物 PCR 产物电泳检测图  
Fig.3 Electrophoresis result of PCR produces from three cultivars of *Pinellia*  
M: DNA Marker; 1: HBB-01; 2: HBD-02; 3: HBF-03

2.2 ITS 序列长度及分析

本研究利用通用引物共测定三种荆半夏的 ITS (包括 ITS-1, 5.8S rDNA 和 ITS-2) 序列。经序列比对分析,每个样品的 ITS 长度及 G + C 含量见于表 3。其中 ITS-1 长度约为 244bp, 5.8S 约为 164bp, ITS-2 约为 211bp。ITS-1 区 G + C 含量约为 50% ~ 60%, 5.8S 区为 45% ~ 55%, ITS-2 区为 45% ~ 50%。

表 3 三种半夏属植物 ITS-1、5.8S 和 ITS-2 区的序列长度及 G + C 含量  
Table 3 The length of the sequences and the contents of G + C from ITS-1, 5.8S and ITS-2 based on three cultivars of *Pinellia*

样 品	ITS-1		5.8S		ITS-2		ITS 序列总长
	片段大小 (bp)	% (G + C)	片段大小 (bp)	% (G + C)	片段大小 (bp)	% (G + C)	
HBB-01	271	53	165	51	215	47	651
HBD-02	244	55	168	50	212	47	624
HBF-03	216	57	159	46	207	48	582

2.3 基于 ITS 序列的种属鉴定

将所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 检索,根据比对结果显示, HBB-01 与报道的 *Pinellia ternata* (Accession: AF469036.1)、*Pinellia yaoluopingensis* (Accession: AF469038.1) 同源性为 95% 以上; HBD-02 与报道的 *Pinellia tripartita* (Accession: AF469037.1) 同源性为 92%; HBF-03 与报道的 *Colocasia esculenta* (Accession: AY081000.1)、*Arisaema flavum* (Accession: JF975900.1)、*Pinellia pedatisecta* (Accession: AF469404.1) 等同源性均超过 80%。

将本研究报道的 ITS 序列中的部分 18S 和 28S 序列剔除,形成用于分析的完整 ITS 序列,将该 ITS 序列与 8 种半夏属 (*Pinellia*) 植物,同时加入 2 种芋属

(*Colocasia*) 和 2 种天南星属 (*Arisaema*) 植物作为外族,共 12 个 ITS 序列进行 NJ 法构建系统树,如图 4。

从图中可以看出, HBB-01 和 *Pinellia ternata* 的亲缘关系最近,且结合二者生物学形态,可确定该半夏品种为 *Pinellia ternata*; HBD-02 与 *Pinellia tripartita* 合为一支,获得 100% 的支持率,结合植物的形态描述,可确定该半夏品种为 *Pinellia tripartita*; HBF-03 与 2 种芋属 (*Colocasia*) 植物进化关系较近,属于同一分支,但是 HBF-03 与天南星属 (*Arisaema*)、半夏属 (*Pinellia*) 植物的 ITS 序列同源性也在 80% 以上,推测可能出现了种间变异,况且 HBF-03 植株的叶形与块茎形状也较为奇特,因此, HBF-03 样品的具体种属分类地位有必要重新论证。

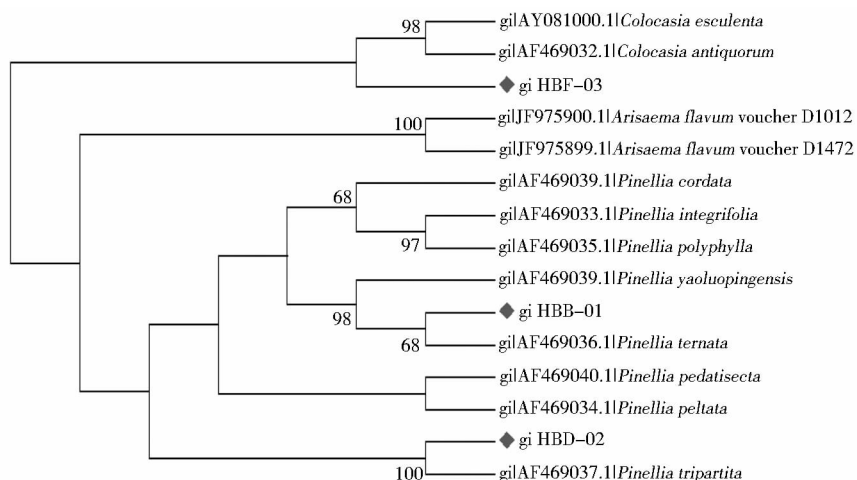


图4 ITS序列构建的NJ系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of ITS sequences based on N-J method

Bootstrap values are indicated at the branches and hidden lower than 50%

### 3 小结与讨论

本研究通过采自湖北荆州种植基地田间的三种半夏属植物的叶片组织中提取基因组,纯化后经直接PCR扩增得到其对应的ITS序列并测序。运用NCBI GenBank数据库进行序列比对与进化树分析。根据比对与分析结果,结合植物形态学特征显示,HBB-01为*Pinellia ternata*为《中国药典》中规定的半夏类药材品种;HBD-02为*P. tripartita*,为药用半夏的混淆品;HBF-03的结果较为复杂,其不仅与芋属(*Colocasia*)、天南星属(*Arisaema*)、半夏属(*Pinellia*)等植物ITS序列的同源性高达80%以上,而且在进化关系上,它们也有一定关联。所以推测HBF-03可能为天南星科不同属但亲缘关系较近的植物产生的变种,具体种属来源有待进一步论证。通过研究三种荆半夏的种属来源及其亲缘关系分析,鉴定了湖北荆州地区半夏人工种植的主要品种,对其当地药农种植符合《中国药典》规范的药用半夏具有指导意义,同时为后续优良半夏种质资源的保护与交流提供参考依据。

### 参考文献

- [1] 吴皓,李伟,张科卫,等. 半夏药材鉴别成分的研究. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 836-839.  
Wu H, Li W, Zhang K W, et al. Study chemical constituents ilex kudingcha. China Journal of Chinese Materia Medica, 2003, 28(9): 836-839.
- [2] 王意成. 观叶植物养护与欣赏. 南京: 江苏科学技术出版社, 2002.  
Wang Y C. Foliage Plant Maintenance and Appreciation. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press, 2002.
- [3] 王伟, 赵南先. 中国天南星科花粉形态的研究. 植物分类学报, 2002, 40(6): 517-529.  
Wang W, Zhao N X. Pollen morphology of the Araceae from China. Acta Phytotaxonomica Sinica, 2002, 40(6): 517-529.
- [4] 赵杰. ITS序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用. 陕西农业科学, 2004(4): 35-37.  
Zhao J. The ITS sequence analysis and ITS application in molecular detection of fungal diseases. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2004(4): 35-37.

## Analysis of ITS Sequences and Identification of Germplasm Resources about Three Cultivars of *Pinellia* from Jingzhou, Hubei Province

ZHANG Wen-tao<sup>1</sup> YU Jing<sup>1</sup> LIU Yi-liang<sup>1</sup> ZHANG Ben-hou<sup>2</sup> CHEN Ji-shuang<sup>1,2</sup>

(1 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

(2 Institute of Marine Industry, Nanjing Tech University, Yancheng 224110, China)

**Abstract** The genomic DNA were extracted from leaf tissue collected three cultivars of *Pinellia*, different phenotypes, collected from the field samples in Jingzhou, Hubei Province, which its corresponding the internal transcribed spacer (ITS) sequences were obtained using Polymerase Chain Reaction (PCR) directly and sequenced. The sequence alignment and phylogenetic tree analysis based on NCBI GenBank database, combined with the morphological characteristics of plants, indicated that HBB-01 belonged to *Pinellia ternata*, which is the “Regulations” from China Pharmacopoeia of *Pinellia* herbs, and HBD-02 belonged to *P. tripartita*, which is adulterants medicinal of *Pinellia ternata*. Notably, the result of HBF-03 is complex that its ITS sequence homology is up to more than 80%, which with the *Colocasia*, *Arisaema*, *Pinellia*. In the evolutionary relationship, they also have some connection. It suggested that HBF-03 may belong to varieties from *Araceae*. different genera but close kinship plants. The deduction needs further argument. In this paper, through the analysis of germplasm origins and phylogenetic relationships about the three cultivars of *Pinellia*, identified the main varieties, which is artificial cultivation in Jingzhou, Hubei Province. The result has guided significance for the local medicinal, who have planting to meet “Chinese Pharmacopoeia” specification of *P. Ternata*. In addition, it has provided a reference basis for protection and breeding of high quality *Pinellia* resources.

**Key words** *Pinellia* Germplasm resources Molecular identification Phylogenetic relationship