

## 基于 ITS 序列的 DNA 条形码技术鉴定红豆杉属植物

尹文秀<sup>1</sup>, 张明哲<sup>1</sup>, 楼成杰<sup>1</sup>, 王金砖<sup>2</sup>, 于文涛<sup>3</sup>, 胡美玲<sup>3</sup>, 吴 珊<sup>1</sup>,  
虞惠贞<sup>1</sup>, 许 瑾<sup>4</sup>, 张晓峰<sup>1</sup>, 李明福<sup>4</sup>

(1. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 310016; 2. 南京市产品质量监督检验院, 江苏 南京 210000;  
3. 福州海关, 福建 福州 350001; 4. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

**摘要:** DNA 条形码技术是一种快速、简便、准确的物种鉴定方法。本研究利用 DNA 条形码技术对南方红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *mairei* 样品 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>; 东北红豆杉 *T. cuspidata* 样品 D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 和欧洲红豆杉 *T. baccata* 样品 EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 八个样品的 ITS1-18S 序列进行 PCR 扩增和测序, 将测序结果与 GenBank 中的同源序列进行比对分析。结果表明, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> 与南方红豆杉的序列相似性最高, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 与东北红豆杉 *T. cuspidata* 的序列相似性最高, EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 与欧洲红豆杉 *T. baccata* 的序列相似性最高。用邻接法 (NJ) 构建 ITS1-18S 序列的系统进化树 (bootstrap 1000 次重复), 结果表明, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> 和南方红豆杉聚为一枝; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 与东北红豆杉聚为一枝; EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 与欧洲红豆杉聚为一枝。上述分析结果表明: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> 为南方红豆杉; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 为东北红豆杉; EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 为欧洲红豆杉, 与采集地样品信息完全一致。故可以利用引物 ITS1-18S 从分子水平区分红豆杉属 *Taxus* 植物。

**关键词:** 红豆杉属; DNA 条形码技术; 物种鉴定

**中图分类号:** S718.49 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3776 (2020) 02-0111-05

## Identification of Species of *Taxus* by DNA Barcoding Based on ITS Sequence

YIN Wen-xiu<sup>1</sup>, ZHANG Ming-zhe<sup>1</sup>, LOU Cheng-jie<sup>1</sup>, WANG Jin-zhuan<sup>2</sup>, YU Wen-tao<sup>3</sup>, HU Mei-ling<sup>3</sup>, WU Shan<sup>1</sup>, YU Hui-zhen<sup>1</sup>, XU Jin<sup>4</sup>,  
ZHANG Xiao-feng<sup>1</sup>, LI Ming-fu<sup>4</sup>

(1. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China; 2. Nanjing Institute of Product Quality Inspection of Jiangsu, Nanjing 210000, China; 3. Fuzhou Customs District of Fujian, Fuzhou 350001, China;  
4. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

**Abstract:** Fresh branches of *Taxus* were collected from 8 trees in Shanghai, Zhejiang and Jiangsu in March 2017. They were PCR amplified and sequenced by DNA barcoding, and the results were compared with the homologous sequences in GenBank. The results showed that 4 samples had the highest sequence similarity with *T. wallichiana* var. *mairei*. Two samples had the highest sequence similarity with *T. cuspidata*, and the other 2 samples with *T. baccata*. Phylogenetic tree established by neighbor-joining method based on ITS1-18S sequences indicated that 4 samples gathered with *T. wallichiana* var. *mairei*, 2 samples with *T. cuspidata*, and 2 samples with *T. baccata*. Analysis resulted that 4 samples were *T. wallichiana* var. *mairei*, 2 samples *T. cuspidata* and 2 samples *T. baccata*, which were completely consistent with the actual sampling tree species.

收稿日期: 2019-09-15; 修回日期: 2020-02-20

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2017YFF0210304), 浙江省重点研发计划项目 (2018C02041), 浙江省公益性科研项目 (2017C32045)

作者简介: 尹文秀, 硕士, 农艺师, 从事物种鉴定、木材鉴定和转基因检测工作; E-mail: yinwenxiu\_110@163.com。通信作者: 张明哲, 博士, 研究员, 从事物种鉴定和转基因检测工作; Email: mzzhang429@163.com。

Key words: *Taxus*; DNA barcoding; species identification

红豆杉属 *Taxus* 植物隶属于红豆杉科 Taxaceae, 为常绿乔木或灌木, 是第三纪孑遗植物<sup>[1]</sup>, 含有多种药用成分<sup>[2]</sup>。红豆杉属植物广泛分布于欧洲、北美洲及东亚等北半球地区, 在全世界有 11 种, 分别为球果红豆杉 *T. globosa*, 短叶红豆杉 *T. brevifolia*, 欧洲红豆杉 *T. baccata*, 加拿大红豆杉 *T. canadensis*, 佛罗里达红豆杉 *T. floridana* 和曼地亚红豆杉 *T. × Media*<sup>[2]</sup>。我国有 3 种 2 变种, 即密叶红豆杉 *T. funana*, 东北红豆杉 *T. cuspidata*, 西藏红豆杉 *T. wallichiana*, 红豆杉 *T. wallichiana* var. *chinensis* 和南方红豆杉 *T. wallichiana* var. *maire*<sup>[3-4]</sup>, 均为《国家重点保护野生植物名录(第一批)》中的 I 级重点保护野生植物<sup>[5]</sup>。

近年来, 红豆杉属植物的药用价值得到了广泛关注和深入研究。1971 年, 首次从短叶红豆杉树皮中提取出的紫杉醇, 是迄今为止最成功的抗癌药物之一<sup>[6-7]</sup>, 然而红豆杉属树种耐荫性强, 在天然林中生长缓慢, 分布星散, 野生树木更是日渐减少<sup>[8]</sup>。红豆杉物种有限的自然资源限制了紫杉醇的提取<sup>[9-10]</sup>, 供需矛盾日益突出。为更好地加强对红豆杉属植物的保护和利用, 开展准确鉴定必不可少。DNA 条形码技术(DNA barcoding)是利用标准的一个或多个 DNA 片段进行物种鉴定及探索其亲缘进化关系的方法<sup>[11-13]</sup>, 刘洁等选取了 *rbcl*, *matk*, *trnH-psbA*, *trnL-F* 和 internal transcribed spacer (ITS) 5 对引物对欧洲和亚洲的红豆杉进行鉴别, 结果表明 *trnL-F* 和 ITS 这两对引物可单独使用或者结合起来对欧洲和亚洲红豆杉进行鉴别<sup>[14]</sup>。本研究采用 DNA 条形码技术开展对红豆杉属植物的准确鉴定, 依据刘洁等的实验结果并结合蒋敏捷等的方法<sup>[14-15]</sup>, 选用 ITS1-18S 开展红豆杉属植物的鉴别, 可直接区分南方红豆杉、东北红豆杉和欧洲红豆杉 3 种红豆杉属植物。此研究为口岸快速筛查和鉴定提供了新型的技术方法, 方法便捷可靠, 同时对促进物种资源的保护和利用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于 2017 年 3 月, 先后于上海植物园、杭州植物园、南京植物园和浙江省林业科学研究院进行采样, 每棵树采集一年生新鲜枝条 1 份。于上海植物园采集南方红豆杉样品 1 份, 编号为 H<sub>1</sub>; 采集东北红豆杉样品 1 份, 编号为 D<sub>1</sub>; 采集欧洲红豆杉样品 1 份, 编号为 EU<sub>1</sub>。于杭州植物园采集南方红豆杉样品 1 份, 编号为 H<sub>2</sub>。于南京植物园采集南方红豆杉样品 1 份, 编号为 H<sub>3</sub>, 采集欧洲红豆杉样品 1 份, 编号为 EU<sub>2</sub>。于浙江省林业科学研究院采集南方红豆杉样品 1 份, 编号为 H<sub>4</sub>。于截获入境东北红豆杉盆栽采集样品 1 份, 编号为 D<sub>2</sub>。采集到样品共计 8 份。实验样品从采集的枝条上随机选取叶片, 清洗干净进行实验。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 试剂盒开展 DNA 提取。样品前处理需对供试样品表面进行酒精喷洒消毒, 然后将植物叶片在室温下研磨成粉末状, 后参照试剂盒说明书继续操作。提取之前按照试剂盒的要求, 先将 Qiagen 试剂盒中的 Buffer AP1 置于 65℃ 水浴锅中预热。

1.2.2 PCR 扩增和测序 扩增 ITS1-18S 序列正向引物: 5'-GCGGTAGGATCATTGTCG-3', 反向引物: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR 扩增体系为试剂 20 μL 体系[大连宝生物(TaKaRa Ex Taq)提供], 10 × Ex Taq Buffer 2.0 μL (Mg<sup>2+</sup> plus), dNTPs 1.6 μL (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>), 引物各 0.4 μL (20 μmol·L<sup>-1</sup>), ddH<sub>2</sub>O 13.5 μL, Taq 酶 0.1 μL (5 U·μL<sup>-1</sup>), DNA 模板 2 μL (10 ~ 30 ng·μL<sup>-1</sup>)。扩增程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 1 min, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经纯化后, 送至杭州擎科梓熙生物技术有限公司进行双向测序。

1.2.3 序列比对和系统发育分析 同一采集地样品名称不同的不同株样品其序列相近<sup>[16]</sup>, 所以每个采集地同一物种采集一个样品进行序列比对。样品包括南方红豆杉 4 个, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>; 东北红豆杉 2 个, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>; 欧洲红豆杉 2 个, EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub>。用 DNAMAN (Version 6.0.3.99) 软件对所得序列进行多重比对。同时从 GenBank

中获得的与样品 ITS1-18S 序列同源性高的序列 (见表 1), 对这些序列进行系统发育树分析, 其中, 加入作为外群的红豆杉科白豆杉属 *Pseudotaxus* 植物白豆杉 *P. chienii*。

采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建 ITS1-18S 序列的系统进化树 (bootstrap 1 000 次重复)。

2 结果与分析

2.1 ITS1-18S 序列扩增结果

本文依据刘洁等的实验结果并结合蒋敏捷等的方法<sup>[14-15]</sup>合成通用引物 ITS1-18S (表 1), 选取同一采集地的不同样品 H<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> 和 EU<sub>1</sub> 进行 PCR 扩增, 扩增长度约为 1 100 bp 左右, 如图 1 所示。

2.2 序列比对结果分析

将测序所得样品的 ITS1-18S 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 结果显示, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 和 EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 样品的 ITS1-18S 序列分别与南方红豆杉、东北红豆杉、欧洲红豆杉的 ITS1-18S 序列的最大匹配率达到 99%~100%。

将 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 和 EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 样品的 ITS1-18S 序列与红豆杉属 3 个种的 6 条序列进行同源序列比对, 舍去两端未对应的序列, 共获得 1 009 bp 序列信息, 其中包括 27 个变异位点 (图 2); 序列比对结果发现, 所测未知样品 ITS1-18S 序列分别与红豆杉属序列相似性最高, 达到 99%~100%, 遗传距离最小, 为 0.00~0.01。可以看出, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> 样品与南方红豆杉的关系比较近, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 样品与东北红豆杉的关系比较近, EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 样品与欧洲红豆杉的关系比较近。

2.3 构建系统进化树

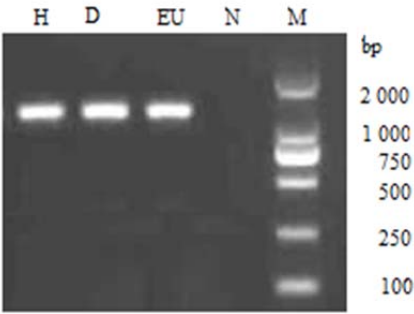
通过 DNAMAN 软件, 采用邻接法构建 ITS1-18S 序列的系统进化树, 经 1 000 次重复抽样检测其置信度。从构建的进化树 (图 3) 可以看出, 同一物种的红豆杉属植物均能聚集在同一分支内, 且均获得较高的支持率 (>90%)。其中, 样品 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> 与南方红豆杉 ITS1-18S 序列聚为一枝, EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 与欧洲红豆杉 ITS1-18S 序列聚为一枝, 其 bootstrap values 分别为 99%和 95%。D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 与东北红豆杉 ITS1-18S 序列聚为一枝; 白豆杉单独一枝。

3 结论与讨论

将不同采集地的 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> 样品, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 样品和 EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 样品分别与南方红豆杉、东北红豆杉和欧洲红豆杉 3 个种的 6 条序列进行同源序列比对, 结果表明, 所测样品的 ITS1-18S 序列分别与红豆杉属的南方红豆杉、东北红豆杉和欧洲红豆杉序列相似性最高, 达到 99%~100%, 遗传距离最小, 为 0~0.01。而且从构建的 ITS1-18S 序列的系统进化树也可以看出, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> 样品和南方红豆杉聚为一枝; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 样品与东北红豆杉聚为一枝; EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 样品与欧洲红豆杉聚为一枝; 白豆杉单独一枝。根据以上实验结果可以判定 H<sub>1</sub>,

表 1 从 GenBank 获取 ITS1-18S 序列物种名称及其登录号  
Table 1 The names and the accessions of ITS1-18S sequences of relative species from GenBank

种名	GenBank 注册登录号
白豆杉 <i>Pseudotaxus chienii</i>	KC847108.1
欧洲红豆杉 <i>T. baccata</i>	AB023995.1, AF259287.1
东北红豆杉 <i>T. cuspidata</i>	AF259290.1, EF660576.1
南方红豆杉 <i>T. wallichiana</i> var. <i>mairei</i>	HM590956.1, HM590960.1



M 为 2 000 bp DNA Ladder Marker;  
N 为阴性对照 (以 ddH<sub>2</sub>O 为模板)。

图 1 H<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> 和 EU<sub>1</sub> 的 PCR 扩增结果  
Figure 1 PCR amplification result of sample H, D and EU

H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> 样品为南方红豆杉; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 样品为东北红豆杉; EU<sub>1</sub>, EU<sub>2</sub> 样品为欧洲红豆杉。实验结果表明, 各

H <sub>1</sub>	GTC CGG CGC GTC TCC TCC CCG CCG GCT CTT GGG GGA GTT CCG ACT GGA GTT CCG GAC GCT TTT CCC TTA GCA ATG CCT CCG GGG TCC CCT CCG C-T
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	GGC TTT CTC TCG GGT GGG CGT TCC GGT CTT CGC AAG TTG TTC TCC TGC GGT TCG GGT TAT TAC --- AAG GGC GAG TGC CAG TGT CGT CTA CAG TGT GGC
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	TAT CGG AGG G-C CTC GTT TTC GGC CGC AGT GGG TGC ACC AGC GAC TCT GTT CGT CTG GCA GTC CTG CTC CTT TGC GGT CGA AG-GGT CCC AGC AAT TTC
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	CAC -CT GCT AGG CGG TTC CTT GCA AAC GGC CGT GGC TGC TTT GCA GAC CGT TGA ACA TTT G-C CGG TCT GCA AAG CAG CTG CAA CCC CCC GAA GTG TGG
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	CCG GGC AGG CA- ATG CGG TAC AGA TTA TTT CGT GGC TTC GGA CGG GTG CAC CTG CGT ACG TCG CCG GGC GGG CGC AAC GTC CAC TGT TTC GGT TCT CAT
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	CTG TTC GGT CTC CGG CCT TTC GAC ACT CCG GGG CGG GGA CAC CCT TTC TCC GAT TTT CCC CCA CGG GGC ATC GGC TCT GGT TGC AGG GGG GGG TGG AGT
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	GGA GGT GGG TGT CAT AAG ACT CAA CGC ATC GGT GCG GAT TGC ACC AAG GAT CTG AT- -A AAT AGC TGT GCG TGC TGC GCG CCA TGC GCG GGT CCG ACT
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	CAC GGC GCC AAT TAA ACA CGA CTC TCG GCA ACG GAT ATC TCG GCT CTC GCC ACG ATG AAG AAT GTA GCG AAA TGC GAT ACT TAG TGT GAA TTG CAG AAT
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	CCC GTG AAT CAT GCA CTC TTT GAA CGC AAG TTG CCG CGC AGG CCT CCG CCG AGG GCA CGT CTG CTT GGG CGT CGC ACT CTA AAA TCG ACT TCC CCC GTT
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	CCT CGG CGG GAG GAT CGG AGA TGG CTG TCC GTG CCC ACC AGC GGC GCG GTC GGC TTA AAT GGG CAC GAG ATT TGT GGC CGA TGT CAC GAT GAG CCG TGG
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...
H <sub>1</sub>	CCA ATG TTG GTC GGC GTT G
H <sub>2</sub>	...
H <sub>3</sub>	...
H <sub>4</sub>	...
南方红豆杉 HM590956.1	...
南方红豆杉 HM590960.1	...
D <sub>1</sub>	...
D <sub>2</sub>	...
东北红豆杉 AF259290.1	...
东北红豆杉 EF660576.1	...
EU <sub>1</sub>	...
EU <sub>2</sub>	...
欧洲红豆杉 AB023995.1	...
欧洲红豆杉 AF259287.1	...

图2 红豆杉属 ITS1-18S 序列比对结果



Figure 2 Sequence alignment of ITS1-18S of *Taxus*

样品的树种与采集地样品的信息完全一致,通过 ITS1-18S 引物可以从分子水平对红豆杉属植物进行区分和鉴定,此方法切实可行。

DNA 条形码技术是传统鉴定方法的有效补充,此方法不受个体形态、大小等特征和完整性的影响,也就避免了形态学鉴定中存在的局限性,能直接从基因水平上提供丰富的鉴别依据,可有效区分种间差异<sup>[11]</sup>。张明哲等设计了南方红豆杉的特异性引物和探针,通过实时荧光 PCR 方法鉴别南方红豆杉,但该引物探针仅能鉴定南方红豆杉和其原始种西藏红豆杉,而无法对红豆杉属其他种进行区分<sup>[17]</sup>。而本研究基于真核生物的核糖体基因 rRNA 的内转录间隔区(ITS)的高保守性选取 ITS 序列进行植物物种的分子鉴定,通过 DNA 条形码技术可对未知植物样品进行筛选,可快速将物种范围锁定至红豆杉属,弥补了南方红豆杉特异性引物探针局限性的缺陷。我国红豆杉属植物大部分位列于濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES)附录 II 中<sup>[18]</sup>。所以此法可建立快速、简便、准确、适合于口岸查验的鉴定方法,有效保护和利用生物资源。后期可进一步研究探索,在初筛结果上结合红豆杉属不同种间的形态学特征进行鉴定或设计红豆杉属不同种的特异性引物探针进行实时荧光 PCR 方法鉴别。



图 3 基于 ITS1-18S 序列构建红豆杉科间的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of Taxaceae by ITS1-18S sequences

#### 参考文献:

- [1] 王鑫,石彩云. 我国境内野生红豆杉的生物学特性及资源现状[J]. 防护林科技, 2012, (6): 82-84.
- [2] 王亚飞,王强,阮晓,等. 红豆杉属植物资源的研究现状与开发利用对策[J]. 林业科学, 2012, 48(5): 116-125.
- [3] 张蕊,周志春,金国庆,等. 南方红豆杉种源遗传多样性和遗传分化[J]. 林业科学, 2009, 45(1): 50-56.
- [4] 郑超,别庆铃,夏冰,等. 4种红豆杉属植物遗传多样性和遗传关系的 RAPD 分析[J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22(3): 58-62.
- [5] 中华人民共和国中央人民政府.国家重点保护野生植物名录(第一批)[EB/OL]. [2018-11-21]. [http://www.gov.cn/gongbao/content/2000/content\\_60072.htm](http://www.gov.cn/gongbao/content/2000/content_60072.htm)
- [6] WANI M C, TAYLOR H L, WALL M E, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1986, 88(16): 2325-2327.
- [7] YU C, GUO H, ZHANG Y, et al. Identification of potential genes that contributed to the variation in the taxoid contents between two *Taxus* species (*Taxus media* and *Taxus mairei*) [J]. Tree Physiology, 2017, 37(12): 1659-1671.
- [8] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 438.
- [9] LI S T, ZHANG P, ZHANG M, et al. Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 295.
- [10] SHEN C, XUE J, SUN T, et al. Succinyl-proteome profiling of a high taxol containing hybrid *Taxus* species (*Taxus×media*) revealed involvement of succinylation in multiple metabolic pathways[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21764.
- [11] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 4.
- [12] 张明哲,徐莉莉,陈曦,等.应用分子生物学方法鉴定马来沉香[J]. 植物检疫, 2015, 3(29): 72-76.
- [13] 张彩云,黄珊珊,颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(11): 2306-2312.
- [14] LIU J, MICHAEL M, GAO L M, et al. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., Taxaceae) and the discovery of cryptic species[J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11(1): 89-100.
- [15] 蒋敏捷,高必达. 通过 DNA 检验鉴定植物种属 1 例[J]. 中国司法鉴定, 2011(3): 105-107.
- [16] LIU J, PROVAN J, GAO L M, et al. Sampling Strategy and Potential Utility of Indels for DNA Barcoding of Closely Related Plant Species: A Case Study in *Taxus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(12): 8740-8751.
- [17] 张明哲,尹文秀,陈哲,等. 应用分子生物学方法鉴定南方红豆杉[J]. 植物检疫, 2018, 32(5): 45-48.
- [18] 中华人民共和国濒危物种科学委员会.濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES 附录植物部分)[EB/OL]. [2019-04-01]. <http://cites.org.cn/article/show.php?itemid=857>