

基于DNA条形码ITS2序列对阿魏属药用植物的鉴别研究[△]

刘冲^{1,2*}, 杨伟俊^{1#}, 何江¹, 程波¹, 地力努尔·吐尔逊江¹(1.石河子大学药学院, 新疆石河子 832003; 2.新疆维吾尔自治区药物研究所/新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0878-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.04

摘要 目的: 建立一种快速、准确和标准化的中药材阿魏属植物DNA条形码鉴别方法。方法: 提取新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen)和阜康阿魏(*Ferula fukanensis* K. M. Shen)基因组DNA, 扩增ITS2序列并测序; 运用分析相似性搜索法, 下载GenBank数据库中阿魏属植物13个物种26个样本基因ITS2序列并进行比对分析, 计算种间种内遗传距离并构建系统进化树进行聚类分析。结果: 通过计算, 15个物种遗传距离分布范围为0.009~0.230, 平均遗传距离为0.018; 聚类分析结果显示DNA条形码ITS2序列能够将阿魏属32种植物聚为不同的类。结论: 建立的阿魏药材DNA条形码ITS2序列鉴别方法可准确、快速地鉴别出阿魏属药材的正品和混淆品。

关键词 阿魏属; DNA条形码; ITS2序列; 药材; 鉴别

Study on the Identification of Ferulic Medicinal Plants Based on DNA Barcode ITS2 Sequence

LIU Chong^{1,2}, YANG Weijun¹, HE Jiang¹, CHENG Bo¹, DILINUER·Tuerxunjiang¹(1.School of Pharmacy, Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832003, China; 2.Xinjiang Institute of Materia Medica/Key Laboratory of Xinjiang Uygur Medicine, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a rapid, accurate and standardized DNA barcode identification method for the ferulic medicinal plants. METHODS: Genomic DNA was extracted from *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen and *Ferula fukanensis* K. M. Shen, ITS2 sequences were amplified and sequenced, analytical similarity search method was conducted, 13 species 26 samples gene ITS2 sequences of ferulic medicinal plants in GenBank database were downloaded and comparatively analyzed; interspecies and intraspecies genetic distances were calculated, and phylogenetic tree was developed for cluster analysis. RESULTS: According to calculation, species genetic distances of the 15 species ranged 0.009-0.230, average genetic distance was 0.018; results of cluster analysis showed DNA barcode ITS2 sequences can cluster the 32 kinds of ferulic medicinal plants into different classes. CONCLUSIONS: The established DNA barcode ITS2 sequences identification method can accurately and rapidly identify the genuine and false samples of ferulic species.

KEYWORDS Ferulic species; DNA barcode; ITS2 sequences; Medicinal materials; Identification

阿魏属(*Ferula* L.)植物在全世界约有150余种, 主要分布于地中海、非洲北部、中亚及西伯利亚地区^[1]。我国有26种和1变种, 分布于新疆、西藏、山西、云南和江苏等地, 其中新疆有20种^[2], 分布在伊宁、阜康、托里、塔城及乌恰等地。该属有多种药用植物, 唐代《新修本草》最早记载新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen)和阜康阿魏(*Ferula fukanensis* K. M. Shen), 将其根和树脂作为药物使用。现代研究表明, 新疆阿魏和阜康阿魏的根和树脂具有抗生育、免疫抑制、解热、镇痛、抗炎等广泛的药理活性^[3-4]。该属植物在新疆民间广泛使用。

近年来, 药材需求的增大使阿魏属药材野生资源储量急剧下降, 少数种如新疆阿魏和阜康阿魏等已濒临灭绝, 当地民间行医者和药材市场用多伞阿魏代替新疆阿魏和阜康阿魏已相当普遍, 代用、误用现象屡屡发生, 严

重影响并制约该药的治疗效果^[5]。因此有必要准确鉴别阿魏属药材及其同属密切相关种以确保安全用药。然而, 阿魏属药用植物种类虽多, 但真正有价值的分类性状不多, 对于大多数药材饮片而言, 药材常常在采收、运输和加工中外观形态已被改变且花粉也已损失殆尽, 通用的药材鉴别方法用于阿魏类药材鉴定尚存缺陷。

目前, 运用DNA条形码来作为药材鉴定方法已逐渐成为近年来的热点, 该方法在物种鉴定方面显示出巨大的应用前景^[6-7], 其中DNA条形码ITS2(Internal transcribed spacer 2)序列已成功应用于小茴香^[8]、麻黄^[9]、薄荷^[10]等及其混淆品的鉴定。由于植物DNA条形码研究进展相对缓慢, 越来越多的科学研究试图寻找某个DNA片段以实现对所有的植物物种进行准确鉴定。在“第三届国际条形码大会”上, 我国科学家陈士林等^[6]提出DNA条形码ITS2序列的鉴定能力优于DNA条形码rbcl和matK组合, 建议将ITS2作为药用植物通用的条形码序列。本研究即应用ITS2条形码对阿魏属药用植物进行鉴定研究, 旨在为阿魏属药材的快速、准确鉴定及其分子鉴定提供新的方法和依据。

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81560714)

* 助理研究员, 博士研究生。研究方向: 药用植物资源学。电话: 0991-2320292。E-mail: liu_chong02@163.com

通信作者: 研究员。研究方向: 药用植物资源学。电话: 0991-2320292

1 材料与amp;方法

1.1 标准品与试剂

DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,批号:20151012);琼脂糖(美国 Invitrogen 公司,批号:20140123);核酸分子量标准品 DL2000、DL5000 及 Taq DNA 聚合酶(宝生物工程有限公,批号均为:20140234);乙二胺四乙酸(EDTA,北京鼎国生物技术有限公);氯仿、异丙醇、无水乙醇等试剂均为国产析纯。

1.2 样本

本研究材料共包含来自 15 个物种的 32 个样本,包括试验样品及从 GenBank 下载的序列;样本包括新疆阿魏和阜康阿魏药材样本 2 个基源物种,其余样本为阿魏的同属混滑品种。所研究材料中其余 13 个物种 26 条 ITS2 序列,下载于美国国家生物技术信息中心 DNA 序列数据库(GenBank)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)。上述各材料由新疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员进行鉴定,凭证标本保存于新疆维吾尔自治区药物研究所。样品采集信息及 ITS2 GenBank 登录号见表 1。

表 1 样品采集信息及 ITS2 GenBank 登录号

Tab 1 Sample information and ITS2 GenBank number

种名	拉丁名	GenBank 登录号
臭阿魏	<i>F. teterrima</i>	DQ379452
大果阿魏	<i>F. lehmannii</i>	KF793030
大果阿魏	<i>F. lehmannii</i>	KF793031
大果阿魏	<i>F. lehmannii</i>	KF793032
短柄阿魏	<i>F. karatavica</i>	DQ379410
短柄阿魏	<i>F. karatavica</i>	DQ379411
短柄阿魏	<i>F. karatavica</i>	DQ379412
多伞阿魏	<i>F. feruloides</i>	KF793014
多伞阿魏	<i>F. feruloides</i>	KF793012
多伞阿魏	<i>F. feruloides</i>	KF793013
多石阿魏	<i>F. lehmannii</i>	DQ379418
阜康阿魏	<i>F. m. fukanensis</i>	KF793025
阜康阿魏	<i>F. fukanensis</i>	KF793026
阜康阿魏	<i>F. fukanensis</i>	KF793027
荒地阿魏	<i>F. syreitschikowii</i>	KJ804115
荒地阿魏	<i>F. syreitschikowii</i>	KJ804116
荒地阿魏	<i>F. syreitschikowii</i>	KJ804117
榄绿阿魏	<i>F. olivacea</i>	KJ660802
里海阿魏	<i>F. caspica</i>	KF793036
全裂叶阿魏	<i>F. dissecta</i>	DQ379394
全裂叶阿魏	<i>F. dissecta</i>	JX667753
沙生阿魏	<i>F. dubjanskyi</i>	KF793033
沙生阿魏	<i>F. dubjanskyi</i>	KF793034
沙生阿魏	<i>F. dubjanskyi</i>	DQ379396
山蛇床阿魏	<i>F. kirialovii</i>	DQ379443
托里阿魏	<i>F. tschimganica</i>	DQ379428
新疆阿魏	<i>F. sinkiangensis</i>	KF792993
新疆阿魏	<i>F. sinkiangensis</i>	KF792994
新疆阿魏	<i>F. sinkiangensis</i>	KF792995
准噶尔阿魏	<i>F. songarica</i>	KF792999
准噶尔阿魏	<i>F. songarica</i>	KF793000
准噶尔阿魏	<i>F. songarica</i>	KF793001

1.3 DNA 提取、PCR 扩增和测序

取研究样品新疆阿魏和阜康阿魏约 10 mg,采用液氮冷冻研磨成细粉,用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。聚合酶链反应(PCR)反应体积为 25 μ L,在 PCR 扩增程序(94 $^{\circ}$ C、5 min;94 $^{\circ}$ C、30 s;56 $^{\circ}$ C、30 s;72 $^{\circ}$ C、45 s;40 个循环)条件下对 ITS2 所用通用引物进行扩增(正向引物 S2F:5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3';反向引物 S3R:5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳可见清晰的条带并经纯化后,由北京华大基因公司进行双向测序待用。

1.4 序列处理及数据分析

试验测序共得到了新疆阿魏和阜康阿魏 6 份个体,其余样本来自于 GenBank 的 ITS2 序列,测序得到的序列用 CodonCode Aligner V 3.0 软件(下载于 <http://www.codoncode.com/aligner/new30.htm>)对测序峰图进行校对拼接,去除低质量序列及引物区,获得 ITS2 序列。将基源物种阿魏 ITS2 序列提交至 GenBank 核酸数据库,与其密切相关种序列鉴定运用分析相似性搜索法(BLASTI),在 GenBank 核酸数据库中进行序列比对,对相似度达到 99% 的序列进行下载,利用数据库进行电子化比对 e-PCR(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/epcr/>);e-PCR 是指将所查询序列与数据库中 DNA 序列两端的 PCR 引物序列进行比对,引物为 ITS2,除去两端多余的序列待用。

所得到的序列利用 MEGA 5.0 软件(<http://www.megasoftware.net/home>)进行种内、种间 K2P(Kimura 2-parameter)遗传距离分析。计算序列的种内和种间遗传距离分布;运用上述软件中 K2P 项设置参数计算物种的种间遗传距离、种内遗传距离占物种数量的分布比例(调整参数消除物种样本数量不同造成的误差)。采用 BLASTI、最近距离法(Nearest distance)及构建邻接(NJ)系统聚类树对阿魏属植物进行鉴定分析。

2 结果

2.1 序列分析

新疆阿魏和阜康阿魏样品双向测序结果经比对校正后,所有序列不含点套峰、插入或缺失以及终止密码子为合格(测序结果不应含有套峰、插入或缺失,且 ITS2 序列是非编码基因不应该具有终止密码子)。运用 MEGA 5.0 软件以 BLASTI 法在 GenBank 数据库中比对下载相似度较高的同属植物密切相关种即大果阿魏、多伞阿魏、全裂叶阿魏、榄绿阿魏等的 ITS2 序列,分析比较阿魏属的 15 种原植物的 32 条 ITS2 序列,序列长度在 210~252 bp 之间;序列鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)含量差异较小,平均为 39%;经过分析查找发现新疆阿魏和阜康阿魏的 ITS2 序列均有含有聚胞嘧啶核苷酸(PolyC)和聚鸟嘌呤核苷酸(PolyG)特殊序列结构。

2.2 阿魏属药用植物种间和种内遗传距离

遗传距离见图 1。

对图 1 进行分析表明,阿魏属 15 个物种种内变异较小,物种分布范围为 0.009~0.230,平均遗传距离为 0.018,种间遗传距离分布范围为 0.31~5.10。阿魏属药用植物种内遗传距离较小,因此 DNA 条形码 ITS2 序列适用于

阿魏属植物的物种鉴定。

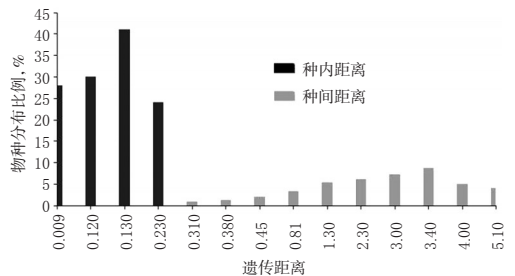


图1 阿魏属种间和种内的遗传距离

Fig 1 Interspecific and intraspecific genetic distances of ferulic plants

2.3 系统发育树鉴定结果

根据参比序列的评价筛选标准,本文对阿魏药材的基源植物新疆阿魏和阜康阿魏进行ITS2序列测定,并在NCBI核酸数据库中注册,注册号分别为新疆阿魏 *F. sinkiangensis* K. M. Shen KF792993、KF792994、KF792995、KC461130;阜康阿魏 *F. fukanensis* K. M. Shen KF793025、KF793026、KF793027。运用MEGA 5.0软件构建NJ系统聚类树,见图2。

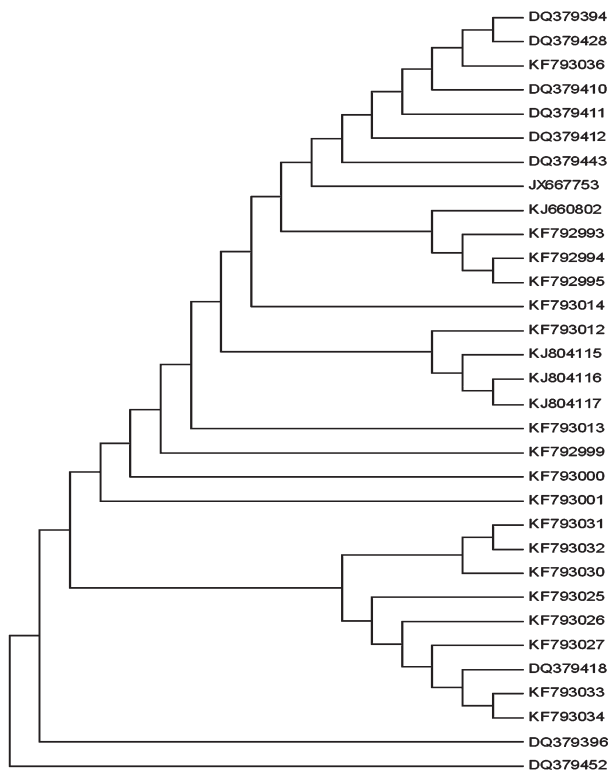


图2 基于邻接法构建ITS2序列的阿魏属植物进化树
Fig 2 Establishing ferulic species phylogenetic tree of ITS2 sequences based on adjacency method

对图2的鉴定分析结果表明,阿魏属药用植物ITS2序列能够将该属每种植物聚为一类,例如2015年版《中国药典》中收录的新疆阿魏和阜康阿魏的ITS2序列各自单独聚为一类,区分出了与其亲缘关系较近的相关种。基于此,DNA条形码ITS2适用于阿魏属植物的鉴定。

3 讨论

阿魏属药用植物具有很高的药用价值,近年来,随着对中药材需求量的增大,如新疆阿魏、阜康阿魏等,市面上药材品种混乱,使得药材品质不一,代用、误用现象时有发生。本研究通过阿魏属的药用植物DNA条形码鉴定,发现新疆阿魏和阜康阿魏同属植物ITS2序列NJ遗传临近距离远大于密切相关种多伞阿魏、全裂叶阿魏、橄榄阿魏等,用此方法能明显区分各种;建立的新疆阿魏、阜康阿魏和混淆品的系统进化树,可为新疆阿魏和阜康阿魏的鉴别提供分子水平的鉴定依据。

ITS2是rDNA基因中5.8S rDNA和28S rDNA基因间隔序列,常用于对真菌的不同生物型、菌株、种、属进行分类鉴定^[6]。运用DNA条形码ITS2鉴定物种开启了新的研究热点^[11],对于分类学中难以区分的类群,采用ITS2序列区分鉴定,可以抛开形态相似的假象,从基因水平上提供一种分类依据。因此,本研究运用DNA条形码ITS2序列成功进行了鉴别阿魏属药用植物复杂分类的有益尝试,为当地物种阿魏药材研究提供了信息化的分类学标准,具有重要的意义。为了使物种鉴定更加快捷,笔者基于上述研究拟提出快速鉴别物种的方法如下:选取鉴定物种的新鲜组织提取其DNA,对DNA进行ITS2序列PCR扩增,将物种的ITS2序列在GenBank中进行物种比对,即可完成物种鉴定。

参考文献

- [1] 单人驿,余孟兰.中国植物志:第四卷[M].北京:科学出版社,1992,55(3):85-117.
- [2] 安争西,魏岩.新疆植物志:第五卷[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:153-178.
- [3] 盛萍.新疆一枝蒿体外抗肿瘤物质基础及制备工艺研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2008.
- [4] 刘勇民.维吾尔药志:上册[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:1-2.
- [5] 刘冲,杨伟俊,顾政一,等.维吾尔药材易混品种整理及分子生物学应用的研究进展[J].西北药学杂志,2013,28(4):440-442.
- [6] Yao H, Song JY, Liu C, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals[J]. PLoS ONE, 2010,5(10):e13102.
- [7] 刘冲,杨伟俊,顾政一,等.基于GenBank核酸数据库ITS2序列鉴定一枝蒿与其混淆品种[J].中国药房,2014,25(3):278-280.
- [8] 刘义梅,罗混,陈科力,等. ITS2序列鉴定小茴香及其常见混伪品[J].环球中医药,2011,4(4):260-263.
- [9] 庞晓慧,宋经元,徐海滨,等.应用ITS2条形码鉴定中药材麻黄[J].中国中药杂志,2012,37(8):1118-1121.
- [10] 庞晓慧,徐海滨,韩建萍,等.中药材薄荷的DNA条形码鉴定研究[J].中国中药杂志,2012,37(8):1114-1116.
- [11] Gao T, Yao H, Song JY, et al. Identification of medicinal plants in the family fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(1):116-121.

(收稿日期:2016-08-19 修回日期:2016-11-19)
(编辑:刘 萍)