

基于 ITS2 序列的滨海白首乌及其近缘种 DNA 分子鉴定

刘 琪¹, 谷 巍^{1*}, 杨 兵³, 祁乃喜^{2*}, 王小浩¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中医院, 江苏 南京 210029

3. 滨海县卫生监督所, 江苏 盐城 224500

摘要: **目的** 采用 ITS2 条形码鉴定滨海白首乌及其近缘种药用植物。**方法** 采集滨海白首乌 *Cynanchum auriculatum* 及其近缘种植物样品共 54 份, 分别提取基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 ITS2 序列并进行双向测序, 测序结果提交至 GenBank; 从 GenBank 下载萝藦科植物 16 种 47 条序列, 并通过 ITS2 数据库注释出 ITS2 序列; 对提交与下载的 101 条序列, 应用 MEGA 5.0 软件进行序列比对, 计算种内和种间距离, 采用相似性搜索法、最近距离法进行鉴定分析, 并构建 neighbor-joining (NJ) 系统进化树直观反映鉴定结果。**结果** 滨海白首乌 ITS2 序列长度均为 249 bp, 是 1 个单倍型, 与萝藦科鹅绒藤属植物距离较近, 与萝藦科其他属近缘种之间遗传距离较远, NJ 树结果显示滨海白首乌及其近缘种药用植物均可明显区分, 表现出良好的单系性, 依据 ITS2 二级结构, 也可以直观地将滨海白首乌与萝藦科近缘种区分。**结论** ITS2 序列作为 DNA 条形码能稳定、准确鉴别滨海白首乌, 为保障安全用药提供了新的技术手段。

关键词: 滨海白首乌; 萝藦科; 近缘种; ITS2; 物种鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)24-5901-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.025

Molecular identification of *Cynanchum auriculatum* and its closely related species based on ITS2 sequence

LIU Qi¹, GU Wei¹, YANG Bing³, QI Nai-xi², WANG Xiao-hao¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, China

3. Binhai County Health Supervision Institute, Yancheng 224500, China

Abstract: **Objective** To identify *Cynanchum auriculatum* and its closely related species using the ITS2 barcode. **Methods** A total of 54 samples of *C. auriculatum* and its related species were collected. Genomic DNAs were extracted from these samples. The ITS2 sequences of these samples were amplified and bidirectional sequenced by PCR. The obtained sequences were submitted to the Gen Bank and the ITS2 sequences of 47 samples belonging to 15 species were downloaded from the GenBank, and ITS2 sequences were annotated by ITS2 database. A total of 101 ITS2 sequences were aligned and the intraspecific and interspecific distances were calculated using the MEGA 5.0. Identification analyses were performed using the similarity search method and nearest distance method, and were presented intuitively by constructing neighbor-joining (NJ) tree. **Results** The length of all ITS2 sequences of *C. auriculatum* was 249 bp, which was a haplotype and was close to *Cynanchum*. There was a significant difference between the interspecific and intraspecific genetic distances of the ITS2 sequences. The NJ tree showed that *C. auriculatum* obviously differed from its closely related species, which showed high monophyly. According to the secondary structure of ITS2, it was also possible to distinguish between *C. auriculatum* and Asclepiadaceae related species. **Conclusion** As a DNA barcode, ITS2 sequences can stably and accurately distinguish *C. auriculatum* from its closely related species and also provide a new technique to ensure the clinical safety in utilization of Chinese materia medica.

Key words: *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight; Asclepiadaceae; closely related species; ITS2; species identification

收稿日期: 2018-05-06

作者简介: 刘 琪, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: 1191458472@qq.com

*通信作者 谷 巍, 女, 教授, 博士生导师。Tel: 13951879869 E-mail: guwei9926@126.com

祁乃喜, 男, 主任中药师。Tel: 13851500660 E-mail: 1691649048@qq.com

滨海白首乌为萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的块根，其味甘、苦，性微温，具有安神补血、收敛精气、滋补肝肾、乌须黑发、延年益寿等功效。现代药理实验研究表明，C₂₁ 甾体苷是滨海白首乌中的主要抗肿瘤活性成分，此外滨海白首乌还含有多糖、磷脂、氨基酸等营养成分^[1]。滨海白首乌获注册中国地理标志证明商标、国家地理标志产品保护、国家农产品地理标志保护等国家 3 项地理标志保护的原产地保护产品^[2]，且为典型的耐盐植物，具有良好的药用和经济价值和开发利用前景。

本草考证表明，白首乌始用于晚唐，盛行于宋明，沿用至今，在国内外享有盛誉，被历代医家视为摄身防老珍品，是中国传统的药、食、美容兼用植物^[3]。宋《开宝本草》首乌项下载，“有赤、白二种，赤者雄、白者雌”。结合《本草纲目》《证类本草》等记载，赤者原植物为萝藦科蓼属何首乌。白者即为白首乌，来源有 3 种，为萝藦科（Asclepiadaceae）鹅绒藤属植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight、隔山消 *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl. 及戟叶牛皮消 *C. bungei* Decne. 的块根，而滨海白首乌基原为耳叶牛皮消，由于 3 者的主要化学成分存在区别而造成疗效具有一定的差异，但从外观上与其他 2 种基原及其他同

科近缘种难以区分，容易造成混用。何首乌与白首乌基原分属不同科属，其在形状与功效主治上具有较大差异性，更应区分使用。因此，亟待建立一种快速准确的鉴定方法来区分滨海白首乌及其近缘种以确保滨海白首乌的种质、种源，保障临床安全用药。

DNA 条形码（DNA barcoding）是利用基因组中一段公认的标准短序列进行物种鉴定的分子诊断新技术^[4]。DNA 条形码具有鉴定简单、精确的特点，有明确的判断标准，其鉴定能力在多个科属药用植物的鉴定中得到了验证^[5-13]。迄今，滨海白首乌及其近缘种药用植物的相关研究少有报道。本研究提取滨海白首乌及萝藦科近缘种植物 DNA 并测定其 ITS2 序列进行分子鉴定，旨在为滨海白首乌的快速准确鉴定及开发利用奠定基础。

1 材料

在江苏滨海白首乌主要分布区、河北、山东、贵州等地收集滨海白首乌及其近缘萝藦科药用植物样品 54 份，样品均经南京中医药大学谷巍教授鉴定，凭证样本和数字影像信息保存于南京中医药大学药学院标本馆，实验材料信息及 GenBank 登录号见表 1。从 GenBank 数据库中下载了滨海白首乌及近缘萝藦科植物和何首乌的 ITS2 序列共 47 条，信息见表 2。

表 1 材料产地及其 ITS2 序列信息

Table 1 Habitats of samples used in present study and its ITS2 sequences

编号	植物名	拉丁名	单倍型	序列长度/bp	(G+C)/%	K2P 遗传距离	GenBank 登录号	产地
1	滨海白首乌	<i>C. auriculatum</i>	A1	249	62.2	0	MG907518	滨海振东
2	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907519	滨海振东
3	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907520	滨海振东
4	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907521	滨海港
5	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907522	滨海港
6	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907523	滨海港
7	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907524	滨海港
8	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907525	滨海东坎镇
9	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907526	滨海东坎镇
10	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907527	滨海东坎镇
11	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907528	滨海於尖
12	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907529	滨海於尖
13	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907530	滨海於尖
14	滨海白首乌		A1	249	62.2	0	MG907531	滨海於尖
15	戟叶牛皮消	<i>C. bungei</i>	B1	249	62.6	0.012 2	MG907532	山东沂源

续表 1

编号	植物名	拉丁名	单倍型	序列长度/bp	(G+C)/%	K2P 遗传距离	GenBank 登录号	产地
16	戟叶牛皮消		B1	249	62.6	0.012 2	MG907533	山东沂源
17	隔山消	<i>C. wilfordii</i>	C1	249	62.6	0.016 3	MG907534	贵州金竹镇
18	隔山消		C1	249	62.6	0.016 3	MG907535	贵州金竹镇
19	白薇	<i>Vincetoxicum atratum</i>	D1	247	64.8	0.055 8	MG907536	江苏连云港
20	白薇		D1	247	64.8	0.055 8	MG907537	江苏连云港
21	白薇		D2	246	65.0	0.065 1	MG907538	宜兴乾元
22	鹅绒藤	<i>C. chinense</i>	E1	251	62.2	0.049 8	MG907539	山东平邑
23	鹅绒藤		E1	251	62.2	0.049 8	MG907540	山东平邑
24	鹅绒藤		E2	251	63.0	0.041 3	MG907541	盐城大丰
25	鹅绒藤		E3	251	63.8	0.032 8	MG907542	盐城大丰
26	鹅绒藤		E4	251	62.6	0.045 5	MG907543	盐城大丰
27	鹅绒藤		E1	251	62.2	0.049 8	MG907544	河北巨鹿
28	鹅绒藤		E1	251	62.2	0.049 8	MG907545	河北巨鹿
29	鹅绒藤		E1	251	62.2	0.049 8	MG907546	河北巨鹿
30	鹅绒藤		E1	251	62.2	0.049 8	MG907547	山东济南
31	柳叶白前	<i>C. stauntonii</i>	F1	246	66.3	0.074 4	MG907548	安徽广德
32	柳叶白前		F1	246	66.3	0.074 4	MG907549	安徽广德
33	柳叶白前		F1	246	66.3	0.074 4	MG907550	安徽广德
34	萝藦	<i>Metaplexis japonica</i>	G1	247	65.1	0.068 2	MG907551	山东济南
35	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907552	山东济南
36	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907553	江苏连云港
37	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907554	江苏连云港
38	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907555	泰州戴陈村
39	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907556	泰州戴陈村
40	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907557	江苏常州
41	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907558	常州溧阳
42	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907559	江苏宜兴
43	萝藦		G1	247	65.1	0.068 2	MG907560	南京白云寺
44	地梢瓜	<i>C. thesioides</i>	H1	246	64.7	0.051 0	MG907561	南京白云寺
45	地梢瓜		H1	246	64.7	0.051 0	MG907562	山东鑫诚
46	徐长卿	<i>C. paniculatum</i>	I1	247	64.4	0.060 6	MG907563	江苏宜兴
47	徐长卿		I2	247	65.6	0.069 7	MG907564	江苏宜兴
48	徐长卿		I3	247	64.8	0.056 1	MG907565	南京白云寺
49	七层楼	<i>Tylophora floribunda</i>	J1	244	66.4	0.093 2	MG907566	宜兴茂花村
50	七层楼		J1	244	66.4	0.093 2	MG907567	宜兴茂花村
51	七层楼		J1	244	66.4	0.093 2	MG907568	宜兴茂花村
52	七层楼		J1	244	66.4	0.093 2	MG907569	宜兴茂花村
53	何首乌	<i>Fallopia multiflora</i>	S1	197	75.2	0.766 6	MG907570	南京仙林
54	何首乌		S1	197	75.2	0.766 6	MG907571	南京仙林

K2P 遗传距离是指每一个物种与滨海白首乌 (MG907518) 之间的 K2P 遗传距离

K2P genetic distance refers to K2P genetic distance between each species and *Cynanchum auriculatum* (MG907518)

表 2 GenBank 下载萝藦科植物 ITS2 序列

Table 2 ITS2 sequences of species in family Asclepiadaceae downloaded from Gen Bank

植物名	单倍型	GenBank 登录号	植物名	单倍型	GenBank 登录号
耳叶牛皮消 <i>C. auriculatum</i>	A1	KM279350.1	萝藦 <i>Metaplexis japonica</i>	G1	LC027920.1
耳叶牛皮消	A1	EU580717	球兰 <i>Hoya carnosa</i>	M1	DQ334460.1
耳叶牛皮消	A1	MG818133.1	球兰	M2	DQ334462.1
戟叶牛皮消 <i>C. bungei</i>	B1	GU198970.1	球兰	M2	DQ334461.1
戟叶牛皮消	B2	GU479037.1	白花牛角瓜 <i>Calotropis procera</i>	N1	KR149556.1
隔山消 <i>C. wilfordii</i>	C1	AY548207.1	华北白前 <i>C. mongolicum</i>	O1	FJ980365.1
杠柳 <i>Periploca sepium</i>	K1	KP975389.1	解毒白前 <i>Vincetoxicum stauntonii</i>	P1	KX184259.1
杠柳	K1	FJ980366.1	解毒白前	P1	KX184258.1
白薇 <i>Vincetoxicum atratum</i>	D3	KX670806.1	解毒白前	P1	KX184257.1
白薇	D3	FJ980364.1	解毒白前	P1	KX184256.1
白薇	D3	KX184247.1	解毒白前	P1	KX184255.1
白薇	D3	KX184246.1	解毒白前	P1	KX184254.1
白薇	D3	KX184245.1	解毒白前	P1	KX184253.1
白薇	D3	KX184244.1	解毒白前	P1	KX184252.1
白薇	D3	KX184243.1	解毒白前	P1	KX184251.1
白薇	D3	KX184242.1	解毒白前	P1	KX184250.1
白薇	D3	KX184241.1	鹅绒藤 <i>C. chinense</i>	E1	GU951533.1
白薇	D3	KX184240.1	柳叶白前 <i>C. stauntonii</i>	F2	EU591970.1
白薇	D3	KX184239.1	短尖白前 <i>C. acutum</i>	Q1	FJ572055.1
白薇	D3	KX184238.1	樟叶球兰 <i>Hoya camphorifolia</i>	R1	DQ334475.1
白薇	D3	KX184237.1	何首乌 <i>Fallopia multiflora</i>	S1	AF040055.1
白薇	D3	KX184236.1	何首乌	S2	KM279343.1
白薇	D3	KX184235.1	何首乌	S2	KM279327.1
黄花球兰 <i>Hoya fusca</i>	L1	HE794405.1			

2 方法

2.1 仪器与试剂

Sigma 3~18 K 高速冷冻离心机 (Sigma 公司, 德国); Compact 水平蛋白电泳仪 (Biometra 公司, 德国); Bio-Rad C1000PCR 扩增仪 (Bio-Rad 公司, 美国); Gel DocXR+凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 德国); 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生物有限公司); 引物由上海捷瑞有限公司合成。

2.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

将样品表面使用 70%乙醇擦洗, 取滨海白首乌及其近缘种植物约 0.1 g, 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech 公司, 中国) 提取总 DNA, 正向引物 ITS2F: 5'-ATGCGATACTTG-GTGTGAAT-3', 反向引物 ITS2R: 5'-GACGCT-TCTCCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体积 50.0 μ L,

体系包含 $MgCl_2$ 4.0 μ L (25 mmol/L), dNTP 4.0 μ L (2.5 mmol/L), PCR 缓冲液 5.0 μ L (10 $\times$), 引物各 2.0 μ L (2.5 μ mol/L) (Generay 公司, 中国), rTaq 酶 0.25 μ L, 总 DNA 5.0 μ L (约 50 ng), 用灭菌超纯水补足反应体积。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s (进行 40 个循环), 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

2.3 数据处理

测序后所得峰图采用 Codon Code Aligner V2.06 (Codon Code 公司, 美国) 校对拼接, 去除低质量序列及引物区; 使用基于隐马尔可夫模型的 HMM 注释方法^[14], 去除拼接得到的一致序列的 2 端 5.8 S 和 28 S 区段^[15] (可将序列提交至 <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de> 进行

注释), 获得标准 ITS2 间隔区序列。研究采用 MEGA5.0 软件比对所有序列, 计算种内序列变异和种间序列变异^[16], 不同物种的单倍型为 A1、B1, 同一物种存在变异位点的单倍型为 A1、A2, 分析变异位点的信息确定不同的单倍型, 采用相似性搜索法 (BLAST1) 和最小距离法 (nearest distance)^[17]考察 ITS2 序列的鉴定成功率, 构建 neighbor-joining (NJ) 系统进化树^[8]评估各物种之间的亲缘性。根据 Koetschan 等^[18]建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 二级结构。

3 结果与分析

3.1 滨海白首乌及其近缘种药用植物 PCR 扩增效率及测序成功率

对滨海白首乌及其近缘种药用植物的 54 个样品的 ITS2 序列分析发现, 所有实验样本的 PCR 扩增及测序成功率均为 100%, 序列获得率 (有效序列比例) 亦为 100%, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳得到 PCR 扩增电泳图 (图 1), 扩增效果较好, 条带较亮, 没有拖尾现象, ITS2 序列均在 500 bp 左右。

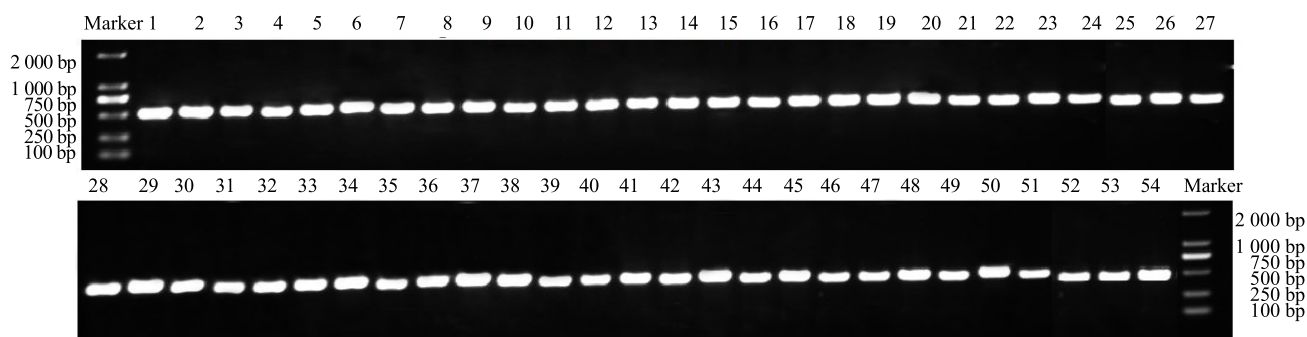


图 1 样本的 ITS2 序列凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of ITS2 sequences of samples

3.2 滨海白首乌与其近缘种的 ITS2 序列差异研究

本实验样品的 ITS2 序列长度范围为 197~251 bp, ITS2 序列的 GC 含量为 62.2%~75.2%, 平均 GC 含量为 64.2%。本文实验中各地采集的滨海白首乌之间无变异位点, 与陕西、太白山等地的耳叶牛皮消也无变异位点, 而与其近缘种之间存在多个变异位点。滨海白首乌种内 K2P 距离为 0.000 0, 滨海白首乌 3 种基原 ITS2 序列种间平均 K2P 距离为 0.010 0, 种间最小 K2P 距离为 0.012 2, 最大 K2P 距离为 0.016 3。滨海白首乌与其近缘种的 K2P 距离为 0.032 8~0.093 2, 平均 K2P 距离为 0.058 7, 何首乌与滨海白首乌的 K2P 距离最大为 0.766 6。滨海白首乌药用植物最大 K2P 距离 (0.016 3) 小于其与近缘种的最小 K2P 距离 (0.032 8), 平均 K2P 距离 (0.010 0) 小于其与近缘种的种间平均 K2P 距离 (0.239 4), 这说明 K2P 距离可很好地区分开滨海白首乌及其近缘种。

实验样品各物种 ITS2 序列、长度、GC 含量及物种 K2P 距离见表 1。将实验数据和 GenBank 数据库下载的萝藦科药用植物数据结合, 在更大样本量下考察滨海白首乌及其近缘种的变异情况。结果表明, 滨海白首乌及其近缘种的种间变

异差异明显, ITS2 可以将其区分开, 滨海白首乌与戟叶牛皮消和隔山消的变异差异也较为明显, 可加以区分。

3.3 滨海白首乌及其近缘种的 ITS2 序列变异位点分析

3.3.1 白首乌药用植物不同来源样品种间变异分析 通过对不同来源的 14 份滨海白首乌样品的 ITS2 序列分析, 发现其 ITS2 序列一致, 并未发现变异位点, 为一个单倍型, 序列类型为 A1。滨海白首乌与戟叶牛皮消 ITS2 序列种间存在 4 个变异位点, 戟叶牛皮消种内有 2 个倍型, 存在 1 个变异位点。滨海白首乌与隔山消 ITS2 序列种间存在 4 个变异位点。滨海白首乌药用植物不同来源样品间共存在 5 个变异位点见表 3。

3.3.2 滨海白首乌与萝藦科近缘种植物种内变异分析 对萝藦科种植物种内不同居群之间进行种内变异统计分析, 变异位点及单倍型统计见表 4。徐长卿种内有 3 个单倍型, 4 个变异位点; 白薇种内有 3 个单倍型, 2 个变异位点; 鹅绒藤种内有 4 个单倍型, 4 个变异位点; 柳叶白前种内有 2 个单倍型, 14 个变异位点; 球兰种内有 2 个单倍型, 2 个变异位点。

表 3 白首乌不同基原药用植物 ITS2 序列种间变异分析

Table 3 Interspecific variable sites in ITS2 sequences of *C. bungei*

GenBan 登录号	单倍型	变异位点				
		20 bp	87 bp	107 bp	157 bp	211 bp
MG907518	A1	A	G	A	T	G
MG907532	B1	T	G	A	G	C
GU479037.1	B2	T	A	A	G	C
MG907534	C1	T	G	T	G	C

表 4 滨海白首乌萝藦科近缘种药用植物种内变异分析

Table 4 Intraspecific variable sites in ITS2 sequences of sibling species of *C. auriculatum* in Asclepiadaceae

植物学名	GenBank 登录号	单倍型	位点/bp	碱基
徐长卿	MG907563	I1	7, 30, 190, 197	T, T, A, T
徐长卿	MG907564	I2	7, 30, 190, 198	A, C, G, C
徐长卿	MG907565	I3	7, 30, 190, 199	T, T, G, T
白薇	MG907536	D1	224, 237	C, T
白薇	MG907538	D2	224, 237	G, C
白薇	KX670806.1	D3	224, 237	C, T
鹅绒藤	MG907540	E1	7, 59, 178, 208	T, T, T, T
鹅绒藤	MG907541	E2	7, 59, 178, 208	G, T, G, T
鹅绒藤	MG907542	E3	7, 59, 178, 208	G, G, G, G
鹅绒藤	MG907543	E4	7, 59, 178, 208	G, T, T, T
柳叶白前	MG907548	F1	16, 29, 34, 60, 62, 63, 86, 90, 106, 193, 201, 208, 232, 252	C, C, C, C, T, G, T, G, T, G, C, C, A, A
柳叶白前	EU591970.1	F2	16, 29, 34, 60, 62, 63, 86, 90, 106, 193, 201, 208, 232, 252	G, A, T, G, G, T, C, T, C, A, T, T, G, G
球兰	DQ334460.1	M1	28, 30	A, C
球兰	DQ334461.1	M2	28, 30	G, G

3.4 滨海白首乌及其近缘种 ITS2 序列分析

采用相似性搜索法 (BLAST1) 和最小距离法对滨海白首乌及其近缘种进行鉴定研究, 2 种方法分析结果均表明 ITS2 序列可以准确地将 3 种滨海白首乌之间及与近缘种鉴别开。为了更直观地反映鉴定结果, 本研究基于相似性搜索法和最近距离法结果构建了 NJ 系统聚类树 (图 2), bootstrap 1 000 次重复。滨海白首乌与戟叶牛皮消及隔山消聚为一支, 且互有区别。滨海白首乌与鹅绒藤属的植物距离较近, 与萝藦科其他物种可以明显区分开。

3.5 滨海白首乌及其近缘种 ITS2 序列二级结构

根据 Koetschan 等^[15]建立的 ITS2 数据库及其网站预测滨海白首乌及其近缘种的 ITS2 二级结构 (图 3), 可以看出, 所有物种的二级结构均为一个中心环 (主环) 及 4 个螺旋区 (Helix) 构成, 每个螺旋上又有大小、或多或少的茎环 (Loop) 结构。通过比较滨海白首乌及其近缘种的 ITS2 二级结构

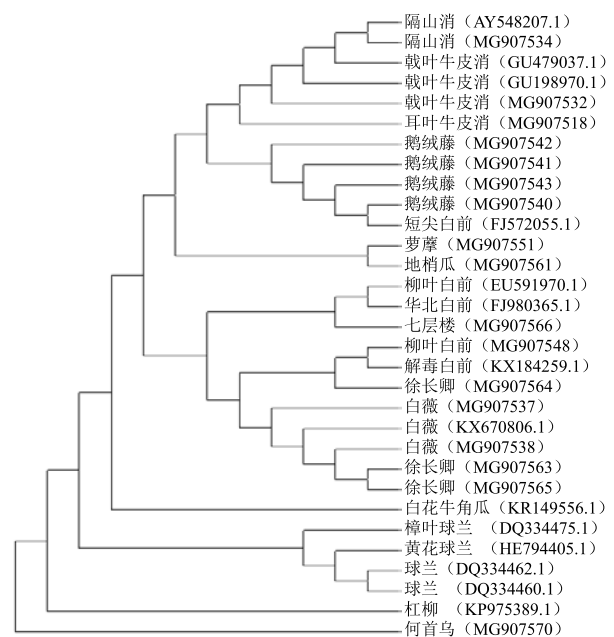


图 2 基于 ITS2 序列构建的滨海白首乌及其近缘种 NJ 树
Fig. 2 NJ tree based on ITS2 sequences from *C. auriculatum* and its closely related species

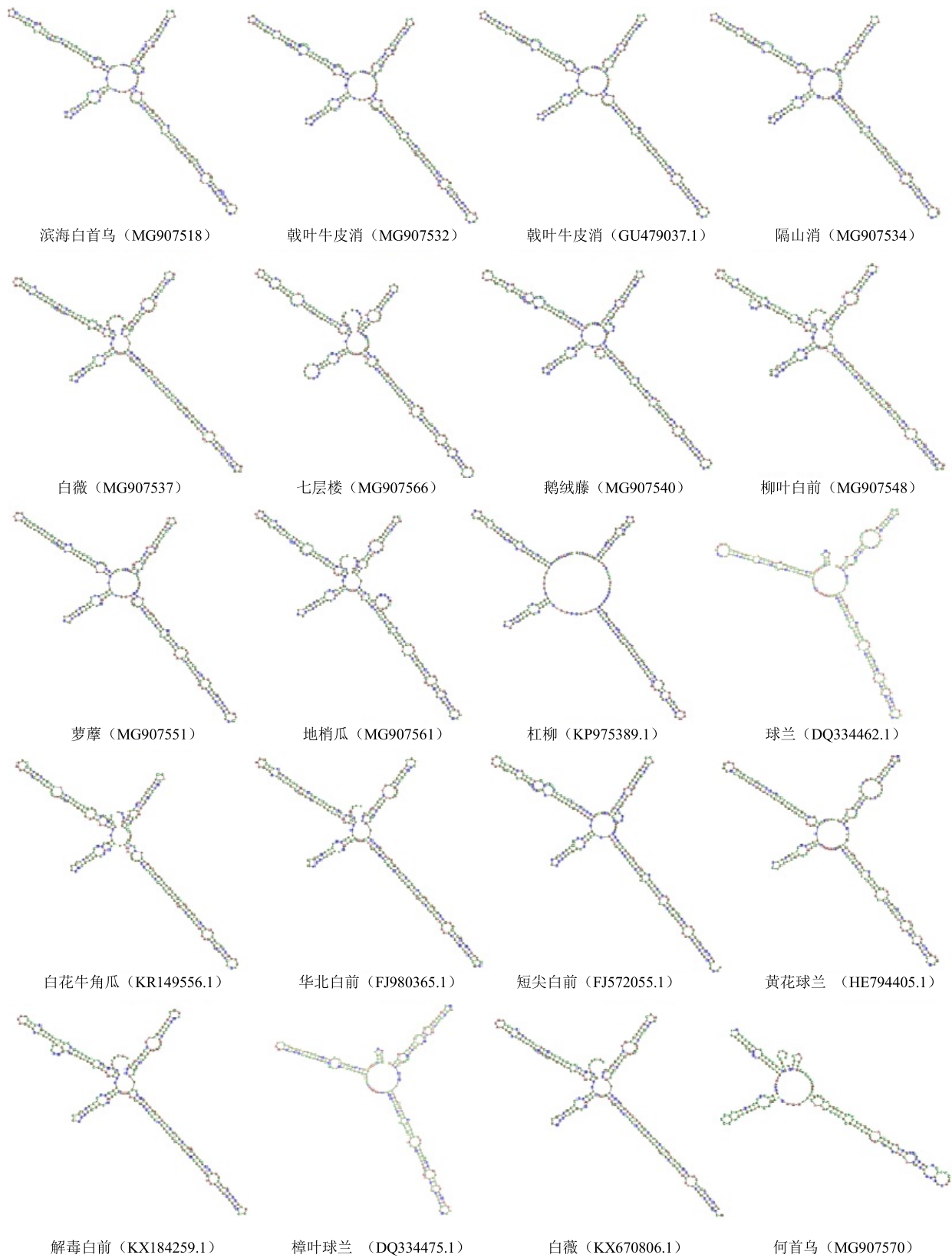


图 3 滨海白首乌及其近缘种药用植物 ITS2 序列的二级结构

Fig. 3 Secondary structures of ITS2 sequences in *C. auriculatum* and its closely related species

发现,各物种在 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度均有明显差异,因此,依据 ITS2 二级结构,可以直观地将滨海白首乌与其近缘种区分。

4 讨论

DNA 条形码技术在物种鉴定以及相关领域的应用研究已成为现代生物学活跃的研究领域和新的热点问题之一,也是未来物种鉴定的发展趋势^[19-20]。基于核酸序列分析的 DNA 条形码鉴定技术是一种新的分子鉴定技术,与传统的物种鉴定方法和基于 PCR 或基于分子杂交的 DNA 分子鉴定技术相比,具有准确性高、效率高^[21]、不受被鉴定对象的环境及个体发育和人为因素影响等优点^[22]。同传统药用植物的形态、显微、理化鉴定方法一样, DNA 条形码鉴定技术的准确性和稳定性也是业内研究的重点问题。所谓稳定性是指不同产地、不同批次的样品均能够稳定获得 DNA 条形码序列^[23]。本实验分析滨海白首乌及其近缘种药用植物样品的 ITS2 序列,结果显示所有实验样本的 PCR 扩增、测序成功率及序列获得率为 100%, PCR 产物均得到电泳检测,并有清晰明亮条带。说明 ITS2 在滨海白首乌的鉴定中是有效的 DNA 区段, ITS2 序列引物及其反应条件针对滨海白首乌药用植物稳定性较好。

本研究基于 ITS2 条形码序列研究滨海白首乌及其近缘种的种内、种间遗传距离,构建 NJ 树以及 ITS2 序列的二级结构,其分析结果均充分表明, ITS2 序列能够准确区分滨海白首乌及其近缘种。因此,作为 DNA 条形码的 ITS2 序列为准确、简便地鉴定滨海白首乌及其萝藦科近缘种药用植物提供了新的分子鉴定方法,保证了滨海白首乌临床选择用药的准确安全。

DNA 条形码技术可以直接从基因水平提供鉴定依据,将有助于非分类学专业工作者对中药用植物进行快速、准确地鉴定,是传统鉴定方法的补充和拓展,具较好的推广和应用价值^[24]。本研究结果分析了 DNA 条形码技术应用于中药用植物鉴定中被广泛关注的问题,证明了 ITS2 序列作为 DNA 条形码能稳定、准确鉴别滨海白首乌药用植物,为保障临床安全用药提供有效手段,也为萝藦科植物分子鉴定和遗传多样性研究奠定了基础。

志谢: 贵阳中医学院药学院孙庆文教授、山东

中医药大学药学院李佳讲师等在实验样品采集过程中提供的帮助。

参考文献

- [1] 彭蕴茹, 丁永芳, 李友宾, 等. 白首乌研究现状 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 370-378.
- [2] 毛广才, 张道国. 搞好区域品牌创建促进首乌产业发展 [J]. 农技服务, 2016, 33(17): 118.
- [3] 孙彦敏, 王 辉, 徐凌川. 近 10 年白首乌研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 27(7): 131-136.
- [4] 俞 超, 梁孝祺, 陈金金, 等. DNA 条形码技术鉴定贝母属植物 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1613-1619.
- [5] Gu W, Song J, Cao Y, *et al.* Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plants of Selaginellaceae in pteridophyta [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67818.
- [6] 叶 方, 柳施一, 胡 培, 等. 武当山区重楼属植物基于 ITS2 的种内鉴别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 550-558.
- [7] 陈贝贝, 宋经元, 姚 辉, 等. 基于 ITS2 条形码的两面针药材及其混伪品的鉴别 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2150-2153.
- [8] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [9] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification [J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 165-170.
- [10] 罗 焜, 陈士林, 陈科力, 等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(4): 3421-3426.
- [11] Sun X Q, Zhu Y J, Guo J L, *et al.* DNA barcoding the Dioscorea in China, a vital group in the evolution of monocotyledon: Use of mat K gene for species discrimination [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32057.
- [12] 李 栎, 肖 憬, 苏振宇, 等. ITS2 条形码序列对茜草科黎药植物的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1814-1818.
- [13] Han J P, Liu C, Li M H, *et al.* Relationship between DNA barcoding and chemical classification of Salvia Medicinal herbs [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 16-29.
- [14] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S r RNA Interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [15] Koetschan C, Hackl T, Muller T, *et al.* ITS2 database IV: interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2012, 63(3): 585-588.

- [16] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 116-121.
- [17] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae [J]. *Planta Med*, 2010, 76(15): 1784-1786.
- [18] Koetschan C, Hackl T, Muller T, *et al.* ITS2 database IV: Interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2012, 63(3): 585-588.
- [19] Kekkonen M, Hebert P D. DNA barcode-based delineation of putative species: Efficient start for taxonomic workflows [J]. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14(4): 706-715.
- [20] Xu C, Dong W, Shi S, *et al.* Accelerating plant DNA bar-code reference library construction using herbarium specimens: improved experimental techniques [J]. *Mol Ecol Resour*, 2015, 15(6): 1366-1374.
- [21] Ankenbrand M, Keller A, Wolf M, *et al.* ITS2 database V: Twice as much [J]. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(11): 3030-3032.
- [22] 陈士林, 庞晓慧, 罗焜, 等. 生物资源的 DNA 条形码技术 [J]. 生命科学, 2013, 25(5): 451-459.
- [23] 辛天怡, 姚辉, 罗焜, 等. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(8): 1098-1105.
- [24] 邵婧, 谷巍, 巢建国, 等. 基于 ITS2 序列的茅苍术及其近缘种 DNA 分子鉴定 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1209-1215.