

旋覆花属 8 种药用植物 ITS2 序列分析

刘义梅¹, 喻珊¹, 罗焜², 姚辉², 陈科力^{3*}

1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065

2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 为旋覆花属 8 种药用植物的分子鉴定提供依据。方法 本研究对 4 种旋覆花属药用植物的 8 个样本 ITS2 序列进行 PCR 扩增和测序, 同时从 GenBank 下载 13 个样本。用 MEGA5.0 计算其种间、种内的 K2P 距离, 各序列变异位点并进行聚类分析。结果 旋覆花属 8 种药用植物 ITS2 的长度为 210~212 bp, 变异位点为 60 个; 旋覆花药材 2 种不同来源药用植物有 3 个变异位点, 与其他同属 6 种植物有 13~43 个变异位点; 构建的系统发育树显示旋覆花药材的不同基原样本各聚为一支, 能很好与其他 6 种植物区分; 旋覆花 *Inula japonica*、欧亚旋覆花 *I. britannica*、总状土木香 *I. racemosa*、土木香 *I. helenium* 4 个物种的遗传距离值远小于与羊耳菊 *I. cappa*、赤茎羊耳菊 *I. rubricaulis*、显脉旋覆花 *I. nervosa*、泽兰羊耳菊 *I. eupatoerioides* 4 个物种的遗传距离值。结论 ITS2 序列能够为旋覆花属 8 种药用植物的鉴定和 Flora of China 对羊耳菊、赤茎羊耳菊、显脉旋覆花、泽兰羊耳菊分类修订提供一定的分子证据。

关键词: 旋覆花属; 变异位点; ITS2 序列; 遗传距离; 分子鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)03-0-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.

ITS2 sequence analysis of eight medicinal plants in *Inula* L.

LIU Yi-mei¹, YU Shan¹, LUO Kun², YAO Hui², CHEN Ke-li¹

1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To provide evidence for the molecular identification of eight medicinal plants in *Inula* L. **Methods** Eight ITS2 sequence samples of four species in *Inula* L. were PCR amplified and sequenced, and 13 samples from the GenBank were downloaded. The intra-specific and inter-specific K-2P distances were calculated, and cluster analysis was constructed by MEGA 5.0. **Results** The length of ITS2 region varied from 210—212 bp with 60 variable sites. *Inulae flos* from two different sources have three variable sites, and its sibling species had 13 to 43 mutations; Different samples of *Inula japonica* and *I. britannica* were gathered together and could be distinguished from its sibling species by UPGMA tree. The genetic distances of four species between *I. japonica*, *I. britannica*, *I. helenium*, and *I. racemosa* were far less than those of four other species between *I. cappa*, *I. rubricaulis*, *I. nervosa*, and *I. eupatoerioides*. **Conclusion** The ITS2 sequence provides molecular evidence for the identification of eight species of medicinal plants in *Inula* L. and taxonomic revision of *I. cappa*, *I. rubricaulis*, *I. nervosa*, and *I. eupatoerioides*.

Key words: *Inula* L.; variable site; ITS2 sequence; genetic distance; molecular identification

旋覆花属 *Inula* L. 植物为菊科 (Compositae) 多年生草本, 我国有 20 余种和多数变种^[1]。本属多种植物常供药用, 如旋覆花 *Inula japonica* Thunb.、欧亚旋覆花 *I. britannica* L. 的干燥头状花序具有降气、消痰、行水、止呕等功效^[2]; 土木香 *I. helenium*

L. 和总状土木香 *I. racemosa* Hook. F. 的根可健脾和胃、行气止痛、安胎^[2-3]; 显脉旋覆花 *I. nervosa* Wall. 在民间主要用于跌打损伤, 能祛风寒、通经络、消积止痛^[4]; 羊耳菊 *I. cappa* (Buch.-Ham.) DC. 的干燥全草具有散寒解表、祛风除湿、行气止痛、清

收稿日期: 2013-10-16

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (2011BAI07B08)

作者简介: 刘义梅 (1971—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源与开发研究。Tel: (027)68896238 E-mail: liuyimei1971@126.com

*通信作者 陈科力, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药资源与开发研究。Tel: (027)68890106 E-mail: kelichen@126.com

热解毒之功^[5]。旋覆花属药材因历史上各地用药习惯不同,市售品混淆现象时有发生。ITS2 片段在物种水平的变异较快,在中药材的物种鉴定方面具有一定的研究价值^[6-12]。本研究运用 ITS2 序列鉴定旋覆花药材不同来源及其同属的药用植物,为旋覆花属药材的物种快速和准确鉴定提供分子依据。

1 材料

实验采集旋覆、欧亚旋覆花、土木香、羊耳菊 4 个物种 8 个样本,材料经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定,凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所,其余 13 个样本来源于 GenBank。样本来源见表 1。

2 方法

样品的 DNA 提取、PCR 扩增及测序的方法均参

照 Chen 等^[13-14]的研究方法。实验所得 8 条序列与 GenBank 上下载的 13 条 TS2 序列采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法获得 ITS2 间隔区序列^[15]。通过 MEGA5.0 软件计算 K2P (Kimura-2-parameter) 距离,比较 8 个物种 21 条序列间的差异性,并基于 K2P 模型进行遗传距离分析,构建 UPGMA 系统聚类树^[16]。

3 结果与分析

3.1 旋覆花正品不同基原植物与其混伪品植物 ITS2 序列种内种间比较

8 个物种 21 个样本的旋覆花属植物序列长度为 210~212 bp, GC 量为 48.6%~54.3%。根据 K2P 参数遗传距离模型计算得到的序列间遗传距离(表 2):旋覆花药材来源旋覆花与欧亚旋覆花的 K2P 距

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

编号	样品	拉丁名	采集地	标本号	Genbank 号
1	旋覆花	<i>Inula japonica</i> Thunb.	中国医学科学院药用植物研究所	PS0698MT01	JF421506
2	旋覆花		中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0698MT04	GU724329
3	旋覆花		中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0698MT05	GU724330
4	欧亚旋覆花	<i>Inula britannica</i> L.	GenBank	GenBank	AF228394
5	欧亚旋覆花		中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0670MT01	GQ434511
6	欧亚旋覆花		中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0670MT02	GU724293
7	欧亚旋覆花		中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0670MT03	GU724294
8	总状土木香	<i>Inula racemosa</i> Hook. f	GenBank	GenBank	EU257426
9	总状土木香		GenBank	GenBank	EU257425
10	土木香	<i>Inula helenium</i> L.	中国医学科学院药用植物研究所	PS0689MT01	GQ434528
11	土木香		GenBank	GenBank	EU239683
12	土木香		GenBank	GenBank	EU239682
13	土木香		GenBank	GenBank	EU257424
14	土木香		GenBank	GenBank	EU257423
15	羊耳菊	<i>Inula cappa</i> (Buch.-Ham.) DC	GenBank	GenBank	JF733771
16	羊耳菊		GenBank	GenBank	EF210973
17	羊耳菊		GenBank	GenBank	EF210951
18	羊耳菊		中国医学科学院药用植物研究所云南分所	PS0701MT01	GQ434532
19	赤茎羊耳菊	<i>Inula rubricaulis</i> (DC.) Benth. et Hook. f.	GenBank	GenBank	FM995372
20	显脉旋覆花	<i>Inula nervosa</i> Wall.	GenBank	GenBank	EF210932
21	泽兰羊耳菊	<i>Inula eupatoerioides</i> DC.	GenBank	GenBank	EF210961

表 2 ITS2 序列的 K2P 遗传距离

Table 2 K2P genetic distances of ITS2 sequences

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	0.000 0																			
3	0.000 0	0.000 0																		
4	0.014 4	0.014 4	0.014 4																	
5	0.014 4	0.014 4	0.014 4	0.009 6																
6	0.014 4	0.014 4	0.014 4	0.009 6	0.000 0															
7	0.014 4	0.014 4	0.014 4	0.009 6	0.000 0	0.000 0														
8	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.075 1	0.075 2	0.075 2	0.075 2													
9	0.064 7	0.064 7	0.064 7	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.004 8												
10	0.064 7	0.064 7	0.064 7	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.004 8	0.000 0											
11	0.064 7	0.064 7	0.064 7	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.004 8	0.000 0	0.000 0										
12	0.064 7	0.064 7	0.064 7	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.004 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0									
13	0.064 7	0.064 7	0.064 7	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.004 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0								
14	0.064 7	0.064 7	0.064 7	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.069 9	0.004 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0							
15	0.178 5	0.178 5	0.178 5	0.184 4	0.184 9	0.184 9	0.184 9	0.153 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3						
16	0.178 5	0.178 5	0.178 5	0.184 4	0.184 9	0.184 9	0.184 9	0.153 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.000 0				
17	0.178 5	0.178 5	0.178 5	0.184 4	0.184 9	0.184 9	0.184 9	0.153 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.000 0	0.000 0			
18	0.178 5	0.178 5	0.178 5	0.184 4	0.184 9	0.184 9	0.184 9	0.153 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.000 0	0.000 0	0.000 0		
19	0.225 0	0.225 0	0.225 0	0.231 3	0.232 0	0.232 0	0.232 0	0.216 5	0.209 8	0.209 8	0.209 8	0.209 8	0.209 8	0.209 8	0.204 9	0.204 9	0.204 9	0.204 9		
20	0.216 9	0.216 9	0.216 9	0.223 2	0.223 8	0.223 8	0.223 8	0.190 3	0.184 0	0.184 0	0.184 0	0.184 0	0.184 0	0.184 0	0.165 9	0.165 9	0.165 9	0.165 9	0.038 9	
21	0.178 5	0.178 5	0.178 5	0.184 4	0.184 9	0.184 9	0.184 9	0.153 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.147 3	0.004 7	0.004 7	0.004 7	0.004 7	0.204 9	0.165 9

离为 0.014 4, 旋覆花种内 K2P 距离为 0, 欧亚旋覆花种内 K2P 距离为 0~0.009 6; 旋覆花、欧亚旋覆花、总状土木香、土木香 4 个物种的遗传距离值为 0~0.075 2, 其 4 个物种与羊耳菊、赤茎羊耳菊、显脉旋覆花、泽兰羊耳菊 4 个物种的遗传距离值 0.147 5~0.232 0。

3.2 旋覆花与其近缘种的变异位点分析

旋覆花属 8 个物种的种间序列共有 60 个位点变异。其中旋覆花种内 3 条序列完全相同, 欧亚旋覆花种内有 2 个变异位点, 即 155 bp (C-G 颠换)、164 bp (T-C 转换); 旋覆花与欧亚旋覆花有 3 处碱基不同, 即 28 bp (G-T 颠换)、164 bp (T-C 转换)、202 bp (G-C 颠换)。旋覆花、欧亚旋覆花、总状土木香、土木香 4 个物种的变异位点为 0~14 个, 远少于与羊耳菊、赤茎羊耳菊、显脉旋覆花、泽兰羊耳菊 4 个物种的变异位点。(图 1)

3.3 聚类分析

基于 ITS2 序列, 通过非加权配对算术平均法构建的 UPGMA 系统聚类树 (图 2) 可以看出, 旋覆

花 3 个样本和欧亚旋覆花 4 个样本各聚为 1 枝, 2 个物种 7 个样本再聚为 1 枝, 支持率为 99%, 明显与同属其他药用植物分开。旋覆花、欧亚旋覆花、总状土木香、土木香 4 个物种 14 个样本聚为 1 大枝, 支持率为 99%。

4 讨论

《中国药典》2010 版记载旋覆花 *Inulae Flos* 来源于菊科植物旋覆花或欧亚旋覆花的干燥头状花序, 来源于两种植物的药材其性状、显微、理化鉴别方法完全相同^[2]。本实验结果显示旋覆花和欧亚旋覆花 ITS2 序列种内最大 K2P 距离小于与其他 6 个物种的种间最小距离; 同时, 从基于 ITS2 序列构建的 UPGMA 聚类树可以看出, ITS2 序列能很好的区分旋覆花药材 *Inulae Flos* 不同基原植物及同属其他药用植物。

《中国植物志》中文版把泽兰羊耳菊、羊耳菊、赤茎羊耳菊划分为旋覆花属羊耳菊组, 显脉旋覆花与旋覆花、欧亚旋覆花、总状土木香、土木香同划分为旋覆花属旋覆花组, 由表 2 和图 1 可以看出,

	111122233	3445566777	8990000012	3445556666	6666777889	9990000111
旋覆花 (JF421506)	6034513816	8051389015	1051248959	0040580234	5689079253	4692589123
旋覆花 (GU724329)	CAGTGCTGGC	AGATCAACGC	GGCT-AATGA	CATCGCTCTT	GTAGCCCAGA	CCCGAACCGG
旋覆花 (GU724330)	-.....
欧亚旋覆花 (AF228394)T..	-.....C.....C.....
欧亚旋覆花 (GQ434511)T..	-.....C.....C.....
欧亚旋覆花 (GU724293)T..	-.....C.....C.....
欧亚旋覆花 (GU724294)T..	-.....C.....C.....
总状土木香 (EU257426)	.TA...C... .A...T...-..C..G...CT	GT.C..TA..	
总状土木香 (EU257425)	.TA...C... .A...T...-..C..G...CT	GT.C...A..	
土木香 (GQ434528)	.TA...C... .A...T...-..C..G...CT	GT.C...A..	
土木香 (EU239683)	.TA...C... .A...T...-..C..G...CT	GT.C...A..	
土木香 (EU239682)	.TA...C... .A...T...-..C..G...CT	GT.C...A..	
土木香 (EU257424)	.TA...C... .A...T...-..C..G...CT	GT.C...A..	
土木香 (EU257423)	.TA...C... .A...T...-..C..G...CT	GT.C...A..	
羊耳菊 (JF733771)	..A..TC..T TAGG.T.T.T	.TT.TGGC..	.C.T..GAA.	AAT.GT...	.T.CGT.ATA	
羊耳菊 (EF210973)	..A..TC..T TAGG.T.T.T	.TT.TGGC..	.C.T..GAA.	AAT.GT...	.T.CGT.ATA	
羊耳菊 (EF210951)	..A..TC..T TAGG.T.T.T	.TT.TGGC..	.C.T..GAA.	AAT.GT...	.T.CGT.ATA	
羊耳菊 (GQ434532)	..A..TC..T TAGG.T.T.T	.TT.TGGC..	.C.T..GAA.	AAT.GT...	.T.CGT.ATA	
泽兰羊耳菊 (EF210961)	..A..TC..T TAGG.T.T.T	.TT.TGGC..	.C.T..GAA.	AAT.GT...	.T.CGT.ATA	
赤茎羊耳菊 (FM995372)	T.AAA...AT TAG.T.TTT.	TC.CG..CAG	TTGT.TGGA.	..CAGTTG..	TTTCG..A.T	
显脉旋覆花 (EF210932)	..AAT.C.AT TAGCTTTT.	TC..G..C.G	TTGT.TGGA.	..CAGTTG..	TTTCG..A.T	

“-”表示该位点碱基缺失

图 1 8 种旋覆花属药用植物的变异位点图

Fig. 1 Variable sites of ITS2 sequence of samples

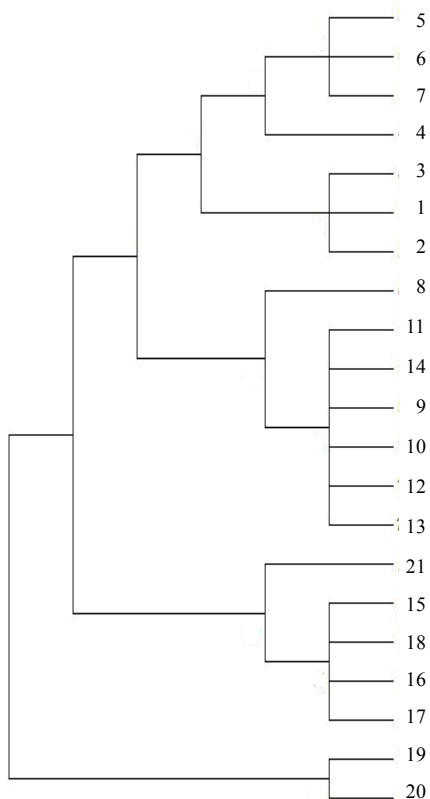


图 2 基于 ITS2 序列构建的 21 个样本的 UPGMA 树
Fig. 2 UPGMA dendrogram of 21 species based on ITS2 sequences

旋覆花、欧亚旋覆花、总状土木香、土木香 4 个物种之间的遗传距离值远小于与羊耳菊、赤茎羊耳菊、显脉旋覆花、泽兰羊耳菊 4 个物种的遗传距离值，旋覆花、欧亚旋覆花、总状土木香、土木香 4 个物种之间的变异位点远少于与羊耳菊、赤茎羊耳菊、显脉旋覆花、泽兰羊耳菊 4 个物种之间的变异位点，ITS2 序列为《中国植物志》英文修订版《Flora of China》把羊耳菊、泽兰羊耳菊、赤茎羊耳菊、显脉旋覆花四种植物修订为 *Duhaldea* 属，而旋覆花、欧亚旋覆花、总状土木香、土木香仍为 *Inula* 属提供了一定的分子依据。

本研究使用 DNA 条形码技术对旋覆花药材 2 种不同来源药用植物及同属其他 6 种药用植物进行分子鉴定，为旋覆花属药用植物的 DNA 条形码鉴定提供分子证据。

参考文献

[1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. (第 75 卷). 北京: 科学出版社, 1979.
[2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[3] 张 婷, 陈若芸. 藏木香的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(15): 1159-1162.
[4] 文惠玲. 显脉旋覆花的生药学研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2009, 6: 27-29.

- [5] 姚 波, 杨树德, 梁晓原. 羊耳菊的生药学研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(9): 39-41.
- [6] 李 妮, 陈士林, 刘义梅, 等. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1396-1401.
- [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, 43(15): 2150-2153.
- [8] 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, 43(13): 1814-1818.
- [9] Yao H, Song JY, Liu C, *et al.* Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE*, 2010 5(10): e13102.
- [10] Chen SL, Yao H, Han JP, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [11] 陈士林, 宋经元, 姚 辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. 中国天然药物, 2009, (5): 322-327.
- [12] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定 [J]. 世界科学技术, 2007, 9(3): 7-12.
- [13] 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): 116-21.
- [14] 朱英杰, 陈士林, 宋经元, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [15] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5. 8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50-57.
- [16] Schultz J, Müller T, Achtziger M, *et al.* The internal transcribed spacer 2 database-a web server for (not only) low level phylogenetic analyses [J]. *Nucleic Acids Res. Suppl*, 2006, 34: 704-707.