

DNA 条形码序列对 9 种蒿属药用植物的鉴定

刘美子^{1,2}, 宋经元¹, 罗焜¹, 林余霖¹, 刘萍^{2*}, 姚辉^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要:目的 采用 DNA 条形码序列对 9 种常见的蒿属药用植物进行鉴定, 为常见蒿属药用植物的鉴定提供分子依据。方法 对 9 种常见蒿属药用植物的 4 条候选 DNA 条形码序列 (ITS2、*rbcL*、*matK*、*psbA-trnH*) 进行 PCR 扩增和测序, 比较各序列的扩增和测序效率, 应用 BLAST1、Distance 方法来评估各序列的鉴定效率。此外, 基于 MEGA5 分析 9 种常见蒿属药用植物 ITS2 序列种间 K2P 遗传距离并构建 NJ 树。结果 除 *matK* 外, 其余 3 条片段的 PCR 扩增和测序效率均为 100%, ITS2 序列对 9 种蒿属药用植物的物种水平鉴定成功率最高, 为 100%, 而 *psbA-trnH*、*rbcL*、*matK*、*matK+rbcL* 的鉴定成功率 (BLAST1 法) 分别为 83.3%、66.7%、54.5%、75%。通过 ITS2 序列的种间 K2P 遗传距离及 NJ 树均能将不同物种全部区分。结论 ITS2 序列可以作为鉴定蒿属药用植物的潜在条形码。

关键词: 蒿属; DNA 条形码; ITS2; PCR 扩增; 遗传距离

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1393-05

Identification of nine common medicinal plants from *Artemisia* L. by DNA barcoding sequences

LIU Mei-zi^{1,2}, SONG Jing-yuan¹, LUO Kun¹, LIN Yu-lin¹, LIU Ping², YAO Hui¹

1. National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To test DNA barcoding sequences in identification of nine common medicinal plants from *Artemisia* L. and provide molecular basis for the identification of plants in *Artemisia* L. **Methods** The nine species of *Artemisia* L. were amplified and sequenced using four candidate sequences (ITS2, *rbcL*, *matK*, and *psbA-trnH*). The PCR amplification and sequencing efficiencies were compared and the identification efficiency was assessed using BLAST1 and Distance methods. The genetic distances of ITS2 region in the nine medicinal plants were analyzed and NJ tree was constructed by MEGA5. **Results** Except *matK*, the amplification and sequencing efficiencies of the other three sequences were all 100%. The highest identification success rate (BLAST1) of ITS2 at the species level of the nine medicinal plants was 100%, while 83.3%, 66.7%, 54.5%, and 75% for *psbA-trnH*, *rbcL*, *matK*, and *matK+rbcL*, respectively. The nine species in *Artemisia* L. could be distinguished by ITS2 region using inter-specific K2P genetic distance and NJ tree. **Conclusion** ITS2 could be used as a potential DNA barcode to correctly identify the medicinal plants in *Artemisia* L.

Key words: *Artemisia* L.; DNA barcoding; ITS2; PCR amplification; genetic distance

蒿属 *Artemisia* L. 是菊科春黄菊族菊亚族的 1 个属, 该属植物多分布在北半球, 且多集中在亚欧大陆^[1], 种类繁多, 分化复杂, 全世界有 344 种, 我国有 187 种 46 变种, 许多种类具有药用、食用及防

风固沙等用途^[2], 并为《中国药典》2010 版收载。依据功效及使用情况常将该属药用植物分为 5 类^[3]: 青蒿类, 如黄花蒿 *Artemisia annua* L. 因含有青蒿素而成为疗效迅速的国际抗疟中药^[3-6]; 茵陈蒿类, 如

收稿日期: 2012-03-10

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题 (20091106120011)

作者简介: 刘美子 (1986—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药分子鉴定。E-mail: zimeiliu99@163.com

*通讯作者 姚辉 Tel: (010)57833194 E-mail: scauyaoh@sina.com

刘萍 Tel: (010)66936427 E-mail: liuping0707@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-05-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120516.1411.002.html>

茵陈蒿 *A. capillaries* Thunb. 全草入药, 具有清热利湿、利胆退黄的功效; 白莲蒿 *A. sacrorum* Ledeb. 为地方习用品; 艾蒿类, 如艾蒿 *A. argyi* Lévl. et Vant. 又称为灸草, 针灸疗法中的灸就是将艾叶加工成“艾绒”, 点燃后熏灼穴位, 艾叶不仅是止血要药, 具有抗菌、抗病毒、增强免疫功能等作用, 而且在食品行业有广泛的用途。另有野艾蒿 *A. lavandulaefolia* DC.、歧茎蒿 *A. igniaria* Maxim. 也作为艾叶的资源植物; 刘寄奴类: 如白苞蒿 *A. lactiflora* Wall. ex DC. 等; 还有牡蒿类等种类。蒿属的药用植物由于外部形态非常相似, 不易识别, 经常在药材市场及临床应用中发生混淆使用的情况, 如某些地方用茵陈蒿代替黄花蒿使用^[7], 直接影响到临床用药的安全有效, 另有大籽蒿 *A. sieversiana* Ehrhart ex Willd. 全国范围内均有分布, 易被混淆。因此, 找到快速准确的方法鉴定蒿属药用植物是非常必要的。有关蒿属植物鉴定的方法有扫描电镜等形态学鉴定方法^[1], 随着分子生物学的发展, 已有用叶绿体 *psbA-trnH* 片段特异性 DNA 信息位点区分黄花蒿和同属植物茵陈蒿及青蒿^[8], 还有用叶绿体 *trnL-trnF* 片段分析蒿属植物系统发育, 但效果不理想^[9]。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是用一段短的标准序列对物种进行鉴定的新方法^[10-13], 具有快速、准确、可重复性的特点, 为形态相近的物种的鉴定开拓了新的思路。2003 年加拿大动物学家 Hebert 等^[11]发现线粒体中的 CO1 序列成功用于对动物物种的鉴定。而在植物中, 研究学者提出各种候选序列或序列的不同组合作为植物候选条

形码^[14-17]。国际条形码协会植物工作组提出 *matK* + *rbcL* 作为植物的核心条形码^[18], 随后在第三届国际条形码大会上, 进化速率较快的 *psbA-trnH* 和 ITS/ITS2 序列被提出来进一步进行考察。Gao 等^[19]基于实验样本和 GenBank 数据分析, 提出 ITS2 可作为菊科鉴定的 DNA 条形码序列, ITS2 对蒿属 74 个物种的 91 份样品的鉴定效率为 59.3% (BLAST1), 其中包含 4 种蒿属药用植物的 ITS2 序列, 另有部分为国外种及不常见种。本研究选取 9 种常见蒿属药用植物, 其中 5 种在 Gao 等^[19]研究中未包括, 对其 4 条 DNA 条形码 *psbA-trnH*、ITS2、*matK*、*rbcL* 序列的 PCR 扩增效率、测序效率和鉴定效率进行考察比较, 为 9 种常见蒿属药用植物提供快速有效的鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

9 种共 12 份蒿属药用植物新鲜叶片采自北京、广西、重庆、吉林等地, 样品硅胶干燥保存, 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, 具体凭证号及 GenBank 登录号详见表 1。

1.2 方法

取硅胶干燥的叶子 0.03 g, 研磨 2 min, 采用植物 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., 中国) 提取 DNA。ITS2、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL* 序列的 PCR 扩增、产物纯化及测序方法均参考 Chen 等^[15]和 Gao 等^[19]的研究, 将每条序列的双向测序峰图用 CodonCode Aligner V3.7.1 校对拼接, 去除引物区及

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	种名	采集地	凭证号	GenBank 登陆号			
				<i>psbA-trnH</i>	ITS2	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
1	黄花蒿 <i>A. annua</i>	北京东灵山	PS0633MT04	GQ435090	GQ434492	JQ173387	JQ173392
2	黄花蒿 <i>A. annua</i>	广西南宁	PS0633MT05	JQ173374	GQ434493	HM989753	JQ173393
3	黄花蒿 <i>A. annua</i>	重庆	PS0633MT08	GQ435091	GQ434494	HM989754	JQ173394
4	艾蒿 <i>A. argyi</i>	广西南宁	PS0590MT04	GQ435067	GQ434469	HM989726	GQ436428
5	茵陈蒿 <i>A. capillaris</i>	北京东灵山	PS0712MT01	JQ173375	JQ173381	JQ173388	JQ173395
6	细裂叶莲蒿 <i>A. gmelinii</i>	北京东灵山	PS0594MT01	GQ435070	GQ434472	GQ434109	GQ436432
7	歧茎蒿 <i>A. igniaria</i>	北京东灵山	PS0675MT01	JQ173376	JQ173382	JQ173389	JQ173396
8	白花蒿 <i>A. lactiflora</i>	广西南宁	PS0592MT01	JQ173377	JQ173383	HM989727	GU724217
9	白花蒿 <i>A. lactiflora</i>	广西南宁	PS0592MT02	JQ173378	JQ173384	HM989728	GU724218
10	野艾蒿 <i>A. lavandulaefolia</i>	北京东灵山	PS0703MT01	GQ435131	GQ434533	—	GQ436484
11	白莲蒿 <i>A. sacrorum</i>	吉林通化	PS2605MT01	JQ173379	JQ173385	JQ173390	JQ173397
12	大籽蒿 <i>A. sieversiana</i>	北京东灵山	PS0616MT01	JQ173380	JQ173386	JQ173391	JQ173398

低质量区。ITS2 序列用 HMMer 注释法切除 5.8 S 和 26 S 端, 保留 ITS2 的全长。用 CLUSTAL W1.83 进行序列对比, 用 MEGA5 计算 K2P 遗传距离, 应用 BLAST1、Distance 和构建 NJ 树方法对 9 种蒿属药用植物进行鉴定分析。

2 结果

2.1 序列分析

4 条片段的 PCR 扩增效率和测序效率均较高, 除 *matK* 的扩增效率为 91.7%, 其他片段的扩增和测

序效率均为 100%。片段长度方面, ITS2 的长度最短, 为 222~225 bp, 其次是 *psbA-trnH*, 为 456~465 bp, *rbcL* 和 *matK* 较长, 分别为 703 bp 和 834~843 bp。各片段的 GC 量以 *psbA-trnH* 最低, 为 27.2%, ITS2 最高, 为 55.6%。ITS2 有 30 个变异位点, *psbA-trnH* 和 *rbcL* 分别有 20 和 19 个变异位点, 而 *matK* 的变异位点最少, 只有 5 个, CBOL 推荐的 *matK+rbcL* 组合的变异位点有 24 个, *psbA-trnH* 和 *matK* 均有 9 bp 的插入/缺失, 各片段统计结果见表 2。

表 2 各候选条形码的序列特征

Table 2 Sequences characteristics of candidate DNA barcoding

基因片段	GC 量 / %	PCR 扩增 效率 / %	测序成功 率 / %	变异位点 数 / 个	插入或缺 失 / bp	鉴定成功率 / %	
						Distance	BLAST1
<i>psbA-trnH</i>	27.2	100	100	20	9	75	83.3
ITS2	55.6	100	100	30	2	100	100
<i>matK</i>	35.5	91.7	100	5	9	45.5	54.5
<i>rbcL</i>	41.4	100	100	19	0	66.7	66.7
<i>matK+rbcL</i>				24	9	75	75

2.2 鉴定效率分析

采用 Distance 和 BLAST1 的方法分析不同 DNA 条形码序列对 9 种常见蒿属药用植物的鉴定效果, 结果见表 2, 应用两种方法 ITS2 的鉴定成功率均最高, 为 100%, 其次是 *psbA-trnH*, 鉴定成功率为 75% (Distance) 和 83.3% (BLAST1), 而 *rbcL* 和 *matK* 的鉴定效率较低, 分别为 66.7% 和 54.5% (BLAST1), CBOL 推荐的 *matK+rbcL* 的鉴定效率为 75%。

2.3 9 种常见蒿属药用植物的 ITS2 序列分析

2.3.1 K2P 遗传距离 黄花蒿和白花蒿不同产地样本种内 K2P 遗传距离均为 0。9 种常见蒿属药用植物 ITS2 序列的种间 K2P 遗传距离最小的是细裂叶莲蒿和白莲蒿, 为 0.004; 种间 K2P 遗传距离最大

的是艾蒿和茵陈蒿, 及茵陈蒿和野艾蒿之间, 为 0.096; 9 种蒿属药用植物种间平均 K2P 遗传距离为 0.041。黄花蒿与其他蒿属药用植物的 K2P 遗传距离为 0.018~0.085, 艾蒿为 0.014~0.096, 而茵陈蒿与其他种的 K2P 遗传距离较大, 为 0.075~0.096。9 种蒿属药用植物两两物种间 K2P 遗传距离见表 3。

2.3.2 Neighbor-Joining (NJ) 树 基于 ITS2 序列构建 9 种常见蒿属药用植物 NJ 树, 结果如图 1 所示, 不同来源的黄花蒿聚为一支, 艾蒿与歧茎蒿聚为一支, 亲缘关系较近, 2 个白花蒿样品先聚为一支, 后又与大籽蒿聚为一支。茵陈蒿独立为一支, 与其他蒿属药用植物亲缘关系较远。从 NJ 树图可以看出, 9 种常见蒿属药用植物均可以互相区分。

表 3 ITS2 序列的种间 K2P 遗传距离

Table 3 K2P genetic distance of inter-specific ITS2 sequence

样 本	黄花蒿	艾 蒿	茵陈蒿	细裂叶莲蒿	歧茎蒿	白花蒿	野艾蒿	白莲蒿
艾蒿	0.046							
茵陈蒿	0.085	0.096						
细裂叶莲蒿	0.018	0.056	0.091					
歧茎蒿	0.051	0.014	0.081	0.061				
白花蒿	0.023	0.023	0.075	0.032	0.027			
野艾蒿	0.041	0.027	0.096	0.051	0.032	0.018		
白莲蒿	0.023	0.051	0.085	0.004	0.056	0.027	0.046	
大籽蒿	0.036	0.037	0.085	0.046	0.041	0.013	0.032	0.041

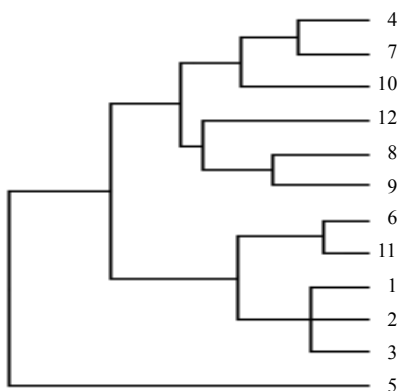


图 1 基于 ITS2 序列构建的 NJ 树

Fig. 1 NJ tree based on ITS2 sequence

3 讨论

蒿属是菊科的一个大属,其种类繁多,有很多具有药用价值,尤其是从黄花蒿中提取出具有抗疟活性的青蒿素后,其需求量剧增,由于同属植物外部形态极其相近,在药材市场上经常混用,威胁到了临床用药的安全。DNA 条形码依靠 DNA 片段上承载的序列信息的不同可以对物种进行快速、准确的鉴定,在本研究中 CBOL 推荐的 *rbcL* 序列较保守, *matK* 序列种内种间的重叠较大,两者均不适用于 9 种常见蒿属药用植物的鉴定, *matK+rbcL* 的鉴定效率也仅为 75%。 *psbA-trnH* 是进化速率较快的基因间隔区之一,两端具有较为保守的 *psbA* 和 *trnH*,该序列的显著特点是存在较多的插入/缺失,刘涛等^[8]用 *psbA-trnH* 序列上的信息位点成功鉴定黄花蒿、茵陈蒿和青蒿。在本研究中黄花蒿有 9 个碱基 (TTCATAAAT) 的缺失,其他蒿属植物均无。9 种常见蒿属药用植物 *psbA-trnH* 的种间变异小于 ITS2 序列,鉴定成功率也小于 ITS2。ITS2 是位于 nrITS 序列上 5.8 S~26 S 核糖体 DNA 的内转录间隔区,具备了 5.8 S 和 26 S 两端的保守区设计通用引物,该序列最早被应用于系统发育和物种的分类研究中^[20-22],包含丰富的变异位点和信息位点,可以用于对物种进行鉴定。Gao 等^[19]对菊科 2 315 个种 3 490 个样品分析后提出 ITS2 可用于菊科鉴定的条形码,但对蒿属 74 个物种 91 份样本的鉴定效率仅为 59.3%,本研究中 ITS2 在 9 种常见蒿属药用植物的 PCR 扩增和测序效率均为 100%,基于 BLAST1 和 Distance 方法的鉴定效率均为 100%,通过分析 9 种常见蒿属药用植物 ITS2 种间 K2P 遗传距离和 NJ 树可以看出,ITS2 序列均可准确鉴定黄花蒿等 9 种

常见蒿属药用植物。

药用植物 DNA 条形码鉴定研究为中药的真伪鉴定指出了新的发展方向,是中药鉴定方法的创新^[23],陈士林等^[24]提出以 ITS2 为主体的药用植物 DNA 条形码鉴定体系,在本研究中,ITS2 能很好地鉴定 9 种常见蒿属药用植物,由于样品量有限,几种蒿属药用植物 ITS2 序列种内变异尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 祝东立,贺学礼,石 硕. 河北小五台山 18 种蒿属植物果皮微形态学研究 [J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(6): 57-62.
- [2] 林有润. 中国植物志 (第 76 卷, 第 2 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [3] 刘硕谦,田 娜,李 娟. 青蒿素组合生物合成的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 1425-1431.
- [4] 杨瑞仪,卢元媛,杨雪芹,等. 低温诱导黄花蒿中青蒿素的生物合成及其机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 350-354.
- [5] 张祖荣,廖志华,彭梅芳. 黄花蒿 HDS 基因的克隆与功能分析 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 148-154.
- [6] Korenromp E L, Williams B G, Gouws E, et al. Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress to toward targets based on verbal autopsy [J]. *Lancet Infect Dis*, 2003, 3: 349-358.
- [7] 孙会忠,宋月芹,赵春玲,等. 蒿属两种药用植物的形态学鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2733-2734.
- [8] 刘 涛,纪运恒. 蒿属药用植物叶绿体上的 *psbA-trnH* 序列分析 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(12): 46-49.
- [9] 王铁娟,韩国栋,柴兆芳. 蒿属叶绿体 DNA *trnL-trnF* 的序列分析与系统发育的意义 [J]. 内蒙古大学学报, 2007, 6: 665-671.
- [10] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identification through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [11] Hebert P D, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 14812-14817.
- [12] 陈士林,苏钢强,邹健强,等. 中国中药资源可持续发展体系构建 [J]. 中国中药杂志, 2005, 15(3): 1141-1146.
- [13] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8369-8374.
- [14] 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.
- [15] 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: e8613.
- [16] Chinese Plant BOL Group. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 19641-19646.
- [17] Li D Z, Liu J Q, Chen Z D, *et al.* Plant DNA barcoding in China [J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3), 165-168.
- [18] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12794-12797.
- [19] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 324.
- [20] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S—28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50-57.
- [21] Müller T, Philippi N, Dandekar T, *et al.* Distinguishing species [J]. *RNA*, 2007, 13: 1469-1472.
- [22] Miao M, Warren A, Song W, *et al.* Analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of scuticociliates and related taxa (Ciliophora: Oligohymenophorea) to infer their evolution and phylogeny [J]. *Protist*, 2008, 159: 519-533.
- [23] 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—中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.
- [24] 陈士林, 庞晓慧, 姚 辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(6): 747-754.