

• 药材与资源 •

基于 ITS 序列对独活 17 个种的分子鉴定

彭 禄, 余 岩, 王志新, 赵丽华, 何兴金*

四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610064

摘 要: 目的 通过对 17 个种共 26 个独活样本的 ITS 序列分析, 为国内中药市场上的常见独活的分子鉴定提供依据, 并探索其科学分类标准。方法 对 26 个样本的 ITS 进行 PCR 扩增和测序。通过 MEGA 5.0 软件比较各序列间的差异性, 计算 K2P 遗传距离; 采用邻接法构建 NJ 系统树并应用 Network 4.2.0.1 软件进行中间连接网法分析构建单倍型网状图。结果 NJ 系统树和单倍型网状图显示, 26 个样本聚集为 5 大族群, 综合分析后将 17 种独活归为 4 大类: 重齿毛当归 *Angelica pubescens* 的 ITS 序列具有特征碱基片段, 可明显区别于其他样本; 除牛尾独活类中 3 个样本不能通过 ITS 序列鉴定到种以外, 其他样本均可以通过 ITS 序列鉴定到种。结论 ITS 序列可为药用独活的鉴定和分类提供有力证据, 四带芹类可以作为独活的首选替补品, 牛尾独活类其次, 九眼独活为最后之选。

关键词: 独活; ITS 序列; 分子鉴定; PCR 扩增; NJ 系统树; 单倍型网状图

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)12-1648-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.12.025

Identification of 17 species of *Angelicae Pubescentis Radix* based on ITS analysis

PENG Lu, YU Yan, WANG Zhi-xin, ZHAO Li-hua, HE Xing-jin

Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education, School of Life and Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China

Abstract: Objective To provide the evidence for the molecular identification of *Angelicae Pubescentis Radix* (APR) and discuss the scientific classification standard through ITS analysis on 26 samples of APR from 17 species. **Methods** ITS of 26 populations was amplified and sequenced. The differences among the different samples were compared and K2P genetic distances of ITS sequence were calculated. NJ tree was constructed and haplotype network map was obtained by using the Network 4.2.0.1 software. **Results** NJ tree and haplotype network map suggested that 26 populations were clustered into five groups, and the 17 APR could be sorted into four types after comprehensive analysis. *Angelica pubescens* was different from other species due to the distinct base sequence in the ITS sequence. All species were identified by ITS analysis except for the three species in *Heracleum* L. **Conclusion** The ITS sequence is powerful for the identification and classification of medicinal APR. Tetrataenium-type plant could be the first choice as succedaneum and followed by *Heracleum*-type plant, then *Aralia*-type plant be the last candidate as well.

Key words: *Angelicae Pubescentis Radix*; ITS sequence; molecular identification; PCR amplification; NJ tree; haplotype network map

独活为我国传统中药, 收载于《中国药典》2010 年版, 唯一指定原植物物种为伞形科当归属重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan。作为传统中药, 独活具有祛风通络、活血舒筋、宣通百脉、散寒止痛等功效^[1]。现代临床研究表明, 其有抗肿瘤、抗炎、镇痛镇静、抑制血小板聚集和降压作用^[2], 是一味极具研究价值的中药。然而, 在国内中药市场流通的独活来源极为混杂,

饶高雄等^[3]根据独活商品来源、应用习惯等特征, 将独活分为 4 大类, 包括肉独活类 (主要为当归属 *Angelica* L. 植物)、牛尾独活类 (主要为独活属 *Heracleum* L. 植物)、九眼独活类 (主要为楸木属 *Aralia* L. 植物)、其他独活类 (主要为前胡属 *Peucedanum* L.、山芹属 *Ostericum* Hoffm.、羌活属 *Notopterygium* H. Boiss. 等植物), 涉及到 2 科 6 属共计 60 余种植物。如此复杂的药用来源和不科学的

收稿日期: 2012-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31070166); 教育部博士点基金资助项目 (20090181110064); 中国科学院大科学装置开放研究项目 (2009-LSF-GBOWS-01); 科技部科技基础性工作专项重点项目 (2007FY110100)

作者简介: 彭 禄 (1989—), 男, 重庆云阳人, 硕士研究生, 研究方向为伞形科药用植物分子鉴定。Tel: (028)85415006 E-mail: l.peng89@gmail.com

*通信作者 何兴金, 教授, 博士生导师。Tel: (028)85415006 E-mail: xjhe@scu.edu.cn

分类标准, 不便于独活的药材管理, 同时给临床用药带来极大的安全隐患。

由于独活的用药部位为植物的干燥根, 在鉴定过程中, 传统的形态分类学特征表现的极不明显。除前胡属植物具有根颈部短粗、常存留有枯萎叶鞘纤维和环状叶痕等明显特征易于辨别外, 其他科属植物根茎描述为圆柱形、纺锤形、圆锥形等, 均属于模糊特征, 不能用于鉴别。然而, 之前的研究主要集中于各种独活的化学成分分析及临床应用, 对独活的真伪鉴别, 主要集中于形态学、解剖学研究^[4-5]。

DNA 条形码概念 (DNA barcoding) 自 2003 年被 Hebert 等^[6]提出以后, 引起了科学界的广泛关注。它是利用一段短的、标准的 DNA 序列进行物种鉴定的新方法, 该方法不受药材形态所影响, 被广泛用于传统中药道地药材的鉴定中^[7-8]。同时, ITS 序列因为具有核苷酸序列上的高度变异性, 又具有长度上的保守性, 非常适用于解决较低分类阶元上的植物系统发育问题^[9], 被广泛应用于易混淆生药品种及近缘生药品种的鉴定。例如, 何首乌^[10]、巴戟天^[11]、丹参^[12]、钩藤属^[13]等药用植物与其易混品之间的鉴定, 且能够做到准确的鉴别^[14]。

本实验从 60 余种“独活”植物中筛选出之前有过化学成分分析报道或临床应用研究的主要中药来源共 17 种, 隶属于 2 科 5 属植物。因未被广泛使用且从成品药材的外形上就可以甄别的或者有文献指出其形态上可以区分且成分上也不适合作为独活使用的物种, 作为伪品处理。例如, 羌活属植物卵叶羌活 *Notopterygium forbesii* de. Boissieu var. *oviforme* (Shan) H. T. Chang, 其根茎松软, 在成品药材使用中易于辨别且药用价值不高^[15], 所以不列入本研究范围。通过测定并分析其 ITS 序列, 希望能够从分子层面上解决独活的鉴定问题, 保证临床用药安全; 同时希望重新探索独活的分类标准, 以便科学地对独活来源进行归类管理。

1 材料

研究所选样品和材料共涉及 2 科 5 属 17 种共 26 个居群。根据所采集样本的地理分布情况、采集量的多少, 从来自全国 6 省市近 100 份伞形科植物样本中选取 19 份经硅胶快速干燥的叶片, 所有样本及凭证标本存放于四川大学植物标本馆, 鉴定人为何兴金教授及余岩博士。部分序列来源于 GeneBank, 详细信息见表 1。

表 1 材料来源

Table 1 Sources of materials

类群	凭证标本	来源	GeneBank 序列号
重齿毛当归 1	Lcy092702	安徽金寨县	JX022900
重齿毛当归 2	Lcy092803	安徽金寨县	JX022899
白亮独活 0046	XZ0025	西藏江达县	HQ686370
白亮独活 0079	06072202	云南中甸县	HQ686347
白亮独活 0087	XZ0005	西藏芒康县	HQ686410
白亮独活 0094	yy082402	四川康定县	HQ686417
独活 0039	06071802yy	云南中甸县	HQ686363
短毛独活 0068	06072201-2	云南中甸县	HQ686452
短毛独活 0070	06072615	四川康定县	HQ686393
短毛独活 0095	WF09073005	云南德钦县	HQ686458
短毛独活 0117	YC09072927	云南丽江市	HQ686463
尼泊尔独活 0172	yy575	西藏吉隆县	HQ686493
鹤庆独活 0032	yy06071202	云南迪庆州	HQ686356
狭翅独活 0041	yy06072002	云南中甸县	HQ686365
平截独活 0018	yy0725-01	陕西宝鸡市	HQ686342
卧龙独活 0048	dyy080815	四川汶川县	HQ686372
永宁独活 0038	06072608	四川阿坝州	HQ686362
永宁独活 0056	XZ0030	四川德格县	HQ686380
永宁独活 0081	dyy080818-5	四川马尔康	HQ686404
绿花山芹	—	—	GU390413
大齿山芹	—	—	GU390409
华中前胡	—	—	HQ256686
龙眼独活	—	—	U66924
柔毛龙眼独活	—	—	U41672
长白橐吾	—	—	AJ786232
食用土当归	—	—	AJ786236

2 方法

总DNA提取采用改良的CTAB法^[16]。PCR扩增反应体系沿用Yu等^[17]所用的方法。所有测得的序列均已上传GeneBank, 序列号见表1。

所有序列使用DNAStar软件包中的MegAlign进行排序, 进一步使用MEGA 5.0软件手工校正。通过MEGA 5.0软件计算K2P(Kimura-2-parameter)距离, 比较各序列间的差异性。然后, 采用邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统树。同时, 应用软件Network 4.2.0.1对独活26个居群的ITS序列进行基于简约性原则的中间连接网法分析^[18](median-joining networks)构建单倍型网状图。

3 结果

3.1 序列特征、PCR扩增效率和测序成功率

本研究包括了26个居群的ITS基因序列。研究的19条片段PCR扩增效率和测序效率均较高, 分别为100%和92%。ITS序列全长598~608 bp, 排序的长度为618 bp, 含260个变异位点, GC量为53.6%。

3.2 17种独活的ITS序列分析

3.2.1 K2P遗传距离分析 重齿毛当归 *A. pubescens*、白亮独活 *H. candicans* Wall. ex DC.、短

毛独活 *H. moellendorffii* Hance 以及永宁独活 *H. yungningense* Hand. -Mazz. 不同产地样品的K2P遗传距离均为0。17种独活的平均K2P遗传距离为0.183。其中, 鹤庆独活 *H. rapula* Franch. 与狭翅独活 *H. stenopterum* Diels 的遗传距离最小, 仅为0.002; 独活属尼泊尔独活 *H. nepalense* D. Don. 与楤木属龙眼独活 *Aralia fargesii* Franch. 的遗传距离最大, 为0.332。各物种之间的K2P遗传距离详见表2。

3.2.2 NJ树 基于26条ITS序列构建的17种独活的NJ树, 结果见图1。整个NJ系统树包含5个大分支, 分别为五加科楤木属A支, 山芹属的B支, 前胡属和当归属构成的C支, 白亮独活组成的D支以及独活属其他植物构成的E支。各个分支的支持率均在96%以上。

3.2.3 Network单倍型网状分析 Network单倍型网状分析主要是利用分析物种的单倍型来探讨其谱系亲缘关系^[19], 但近年来被探索应用于中药材的分子鉴定研究。本研究单倍型网状图所显示结果主要分为5个区域, 见图2。楤木属主要集中在A区, 山芹属集中在B区, C区为前胡属和当归属植物, D区为白亮独活和尼泊尔独活, 而独活属其他植物

表2 ITS序列的种间K2P遗传距离

Table 2 K2P genetic distances of intra-specific ITS sequences

样本	白亮独活	短毛独活	永宁独活	尼泊尔独活	卧龙独活	平截独活	狭翅独活	鹤庆独活	独活	重齿毛当归	绿花山芹	大齿山芹	华中前胡	柔毛龙眼独活	龙眼独活	食用土当归	长白楤木
白亮独活	1.000																
短毛独活	0.060	1.000															
永宁独活	0.060	0.007	1.000														
尼泊尔独活	0.071	0.071	0.071	1.000													
卧龙独活	0.062	0.009	0.012	0.073	1.000												
平截独活	0.063	0.017	0.017	0.075	0.019	1.000											
狭翅独活	0.058	0.002	0.005	0.069	0.010	0.016	1.000										
鹤庆独活	0.060	0.003	0.007	0.071	0.012	0.017	0.002	1.000									
独活	0.062	0.005	0.009	0.073	0.014	0.019	0.003	0.005	1.000								
重齿毛当归	0.135	0.146	0.146	0.154	0.148	0.143	0.143	0.146	0.148	1.000							
绿花山芹	0.230	0.231	0.226	0.236	0.228	0.228	0.228	0.231	0.233	0.202	1.000						
大齿山芹	0.211	0.207	0.202	0.221	0.204	0.204	0.204	0.207	0.208	0.197	0.032	1.000					
华中前胡	0.135	0.146	0.142	0.161	0.146	0.143	0.143	0.146	0.148	0.060	0.204	0.204	1.000				
柔毛龙眼独活	0.311	0.312	0.306	0.317	0.311	0.311	0.308	0.311	0.314	0.319	0.301	0.293	0.312	1.000			
龙眼独活	0.316	0.321	0.316	0.332	0.321	0.324	0.319	0.321	0.324	0.321	0.306	0.298	0.311	0.032	1.000		
食用土当归	0.302	0.313	0.308	0.321	0.313	0.316	0.311	0.313	0.316	0.315	0.306	0.301	0.309	0.032	0.021	1.000	
长白楤木	0.300	0.306	0.301	0.317	0.306	0.309	0.309	0.306	0.309	0.314	0.294	0.286	0.302	0.025	0.014	0.014	1.000

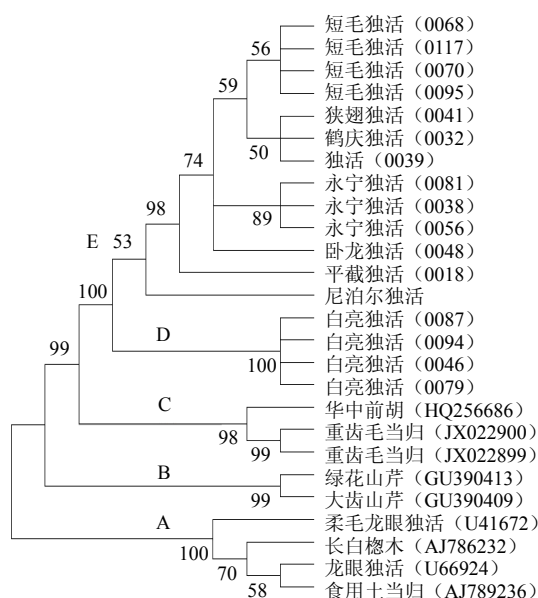


图 1 基于 ITS 序列构建的 NJ 系统树

Fig. 1 NJ tree based on ITS sequences

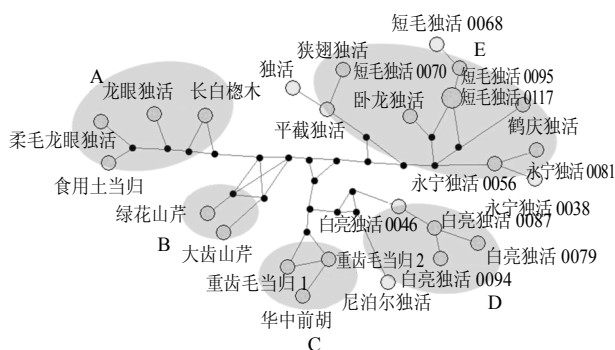


图 2 药用独活 26 个 ITS 单倍型构建的中间连接网状图

Fig. 2 Median-joining network of ITS haplotypes for 26 APR

共同组成 E 区。从图可见，D 区与 E 区之间间隔较远，A 区与 B 区相隔较近。

4 讨论

4.1 独活的分类问题

在本研究中无论是 NJ 树，还是网状分析图都共同指出 5 个大的分支（网状分析图为 5 个大的分布区）。其中，华中前胡和重齿毛当归构成 C 支（区），山芹属独立构成 B 支（区），说明当归属与前胡属亲缘关系很近，而与山芹属关系较远。本研究结果与薛华杰等^[20]的研究一致。白亮独活和尼泊尔独活构成 D 支（区），与独活属其他植物 E 支（区）分开，与 Yu 等^[17]的研究结果一致。研究认为白亮独活、尼泊尔独活等应从独活属划分到四带芹属 *Tetrataenium* (DC.) Manden. 中，本研究结果的 NJ

树中白亮独活和尼泊尔独活构成 D 支，在网状分析图中白亮独活和尼泊尔独活构成 D 分布区，支持 Yu 等^[17]的观点，并为其补充了网状分析和分布上的证据。

饶高雄等^[3]的分类标准，虽然能够涵盖到所有的独活来源，但将山芹属、前胡属及羌活属等植物归为 4 大类中的“其他类”，有待商榷。笔者收集前人针对独活药用化学成分的比较分析资料 and 结果来看，本研究中的独活属^[21]、四带芹属^[22-23]、当归属^[24]和前胡属^[25]样本的化学成分以香豆素类化合物为主。在楸木属中，其化学成分主要以皂苷类、黄酮类为主，仅发现其含有少量的香豆素类化合物^[26-27]。虽然绿花山芹、大齿山芹在中国部分省份作为独活药用^[15]，但其根所含化学成分却以脂肪酸和甾醇为主，不具有独活的药用价值。同时，NJ 系统树以及网状分析图中，山芹属都构成独立的分支（区）。所以，建议将山芹属植物作为伪品处理，从独活的 4 大类中剔除。

本研究在饶高雄等^[3]的分类方法基础上，将化学成分与 ITS 序列整合分析后，建议将独活的分类做以下处理，以达到对独活来源的个科学分类管控。详细分类为肉独活类（包括伞形科当归属、前胡属），牛尾独活类（伞形科独活属），龙眼独活类（五加科楸木属），四带芹类（伞形科四带芹属）。

4.2 基于 ITS 序列对独活的分子鉴定问题及可行性分析

ITS 序列作为核糖体 DNA 中的具有高度保守性的序列，近些年被广泛用于药用植物的分子鉴定，并取得较为理想的效果^[7-14]。通过对比来源于 2 科 5 属的共 17 种 26 个居群（样品）的独活 ITS 碱基序列，发现重齿毛当归在 219~224 bp 的碱基为 AATACG，413~415 bp 为 GAT，429~435 bp 为 GTACGGA，567~569 bp 为 CGT，具有明显的分子标记，可区别于其他所有样品。因此，用 ITS 分子标记来鉴定《中国药典》2010 年版中的正品独活（即重齿毛当归）是可行的，因为重齿毛当归具有非常明显的 ITS 特征碱基片段。

同时，NJ 系统树所表现的支持率均较高。除了 E 分支内的狭翅独活、鹤庆独活以及独活以平行支出现以外，其他物种都能做到单独分支（即基本上可以鉴定到种）。K2P 遗传距离图也显示除牛尾独活类植物部分种间距离较小以外，其他物种都能做到单独分支。所以鉴定牛尾独活类到种一级程度还需要增添其他证据。但其他种类种间

距离和分支较为明显,可成功鉴定到种。研究表明,ITS 序列可以作为独活的分子鉴定主力证据,应用于国内中药市场上,去伪存真、辨真识劣,保证临床用药品质和安全。而牛尾独活类植物如果要准确鉴定到种,则需要增加分子标记的片段,可能需要增加叶绿体 DNA 片段作为辅助的联合分子标记片段才能有效准确鉴定到种^[17]。

4.3 独活的化学成分与 NJ 树联合分析问题探讨

《中国药典》2010 年版中指定的独活的原植物为 1 个种,即重齿毛当归。就传统中药独活根的药用效果而言,具有治疗效果的是独活的化学成分,前人通过对重齿毛当归和牛尾独活类植物的化学成分进行研究,结果表明具有治疗效果的是独活根的药用成分——香豆素类化合物^[21-25]。作为独活的重齿毛当归和牛尾独活类植物,或者说整个独活属植物,都表现出紧密的亲缘关系。从分子系统树(NJ 树)上看来,当归属、独活属以及前胡属组成了一个更为广泛的大类群,系统支持率高达 99%,而山芹属和橐吾属与重齿毛当归相隔较远。因此,从分子标记分析结果看来,山芹属和五加科的橐吾属不应该纳入独活的范围。前人的化学成分研究显示,山芹属和五加科的橐吾属的药用植物根中主要化学成分不是香豆素类化合物^[25-26]。而独活属的成员,尤其是白亮独活和牛尾独活类植物,其根部含有大量起药用治疗效果的独活化学成分,因此,结合分子标记和药用化学成分分析结果,认为四带芹类和牛尾独活类可以作为独活的首选替代品使用。

4.4 独活分子鉴定的单倍型网状分析

本实验除了应用分子标记 ITS 的常规分析方法对 2 科 5 属 17 种 26 个样本进行研究,还尝试运用网状分析方法,通过分析对其单倍型,推演其祖先筑巢和分布区扩散的方法,分析重齿毛当归和独活属植物的分布区和扩散分布等进化历程。从图 2 来看,重齿毛当归与整个独活属植物具有较紧密的亲缘关系,尤其与华中前胡和四带芹类非常接近。从进化历程来讲,牛尾独活类、四带芹类与肉独活类具有共同的祖先。结合 17 种独活化学成分分析以及分子证据,认为四带芹类作为独活的首选替代品,牛尾独活类其次,九眼独活类为最后之选。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 林 黎, 钱晓萍, 刘宝瑞. 中药独活的化学成分及其抗肿瘤活性的研究进展 [J]. 现代肿瘤研究, 2011, 19(2): 373-376.
- [3] 饶高雄, 杨 祺, 戴万生. 中药独活、羌活的本草沿革和植物来源 [J]. 云南中医学院学报, 1994, 17(4): 11-16.
- [4] 李建雄, 袁桂香. 药用独活的资源与鉴定 [J]. 基层中药杂志, 1998, 12(2): 5-6.
- [5] 赵 颖, 何兴金, 张桥英, 等. 独活属药用部位的解剖学研究 [J]. 西华师范大学学报, 2004, 25(1): 63-67.
- [6] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [7] 朱英杰, 陈士林, 姚 辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [8] 刘美子, 宋经元, 罗 焜, 等. DNA 条形码序列对 9 种蒿属药用植物的鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1393-1397.
- [9] 田 欣, 李德铎. DNA 序列在植物系统学研究中的应用 [J]. 云南植物研究, 2002, 24(2): 170-184.
- [10] 张宏意, 石祥刚. 不同产地何首乌的 ITS 序列研究 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 911-914.
- [11] 丁 平, 方 琴. 巴戟天与常见混伪品的 rDNA-ITS 序列分析及其分子鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 908-911.
- [12] 汪 红, 王 强. 丹参及鼠尾草属植物的 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1381-1385.
- [13] 陶 刚, 刘 涛, 朱 英, 等. 贵州中药材钩藤属植物的分子鉴定 [J]. 中药材, 2008, 31(6): 825-828.
- [14] 于华会, 杨志玲, 杨 旭, 等. 药用植物种植资源 ITS 序列研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 491-496.
- [15] 单人骅, 余孟兰, 王铁僧, 等. 中国植物志 (第 55 卷第 1 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [16] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [17] Yu Y, Stephen R D, He X J, *et al.* Phylogeny and biogeography of Chinese *Heracleum* (Apicaceae tribe Tordylieae) with comments on their fruit morphology [J]. *Plant Syst Evol*, 2011, 296: 179-203.
- [18] Bandelt H J, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16: 37-48.
- [19] 王晓雄, 乐霁培, 孙 航, 等. 青藏高原高山流石滩特有植物绵参的谱系地理学研究 [J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(6): 605-614.

- [20] 薛华杰, 闫茂华, 陆长梅, 等. 基于 ITS 序列的东亚当归属植物的分类学研究 [J]. 植物分类学报, 2007, 45(6): 783-795.
- [21] 饶高雄, 杨 祺, 蔡 锋, 等. 牛尾独活的化学成分 [J]. 云南中医学院学报, 1994, 17(3): 4-7.
- [22] 林中文, 高 岚, 陈一平, 等. 白亮独活的香豆素成分 [J]. 云南植物研究, 1993, 15(3): 313-314.
- [23] 孙汉董, 林中文, 钮芳娣. 伞形科中药的研究 II、尼泊尔独活根的化学成分研究 [J]. 云南植物研究, 1980, 2(2): 224-227.
- [24] 柳江华, 谭 严, 陈玉萍, 等. 重齿毛当归化学成分的研究 [J]. 中草药, 1994, 25(6): 288-291.
- [25] 张雪梅. 前胡属植物的系统学研究进展 [J]. 黑龙江农业科学, 2012(8): 156-158.
- [26] 宁德利. 长白楸木大庆地区的引种及药效成分分析 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.
- [27] 黄蕾蕾, 熊世平, 周 治, 等. 食用土当归挥发油化学成分的研究 [J]. 中药材, 2001, 24(4): 274-275.