

• 药材与资源 •

ITS 和 *psbA-trnH* 序列鉴别绿绒蒿属藏药植物倪梁红¹, 赵志礼^{1*}, 孟千万¹, 嘎 务², 米 玛²

1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

2. 西藏藏医学院, 西藏 拉萨 850000

摘要:目的 应用核基因 ITS 和叶绿体 *psbA-trnH* 序列对绿绒蒿属 *Meconopsis* Vig. 藏药进行鉴别。方法 采集欧贝(ལུང་པེ།) 3 种基原植物罂粟科绿绒蒿属毛瓣绿绒蒿 *Meconopsis torquata*、红花绿绒蒿 *Meconopsis punicea*、全缘叶绿绒蒿 *Meconopsis integrifolia*, 才温(ཅའ་ཁྲོ།) 2 种基原植物罂粟科绿绒蒿属总状绿绒蒿 *Meconopsis racemosa*、多刺绿绒蒿 *Meconopsis horridula*, 对植物核糖体 DNA 内转录间隔区、叶绿体 *psbA-trnH* 非编码区序列进行测定与分析。结果 ITS 序列分析显示, 总状绿绒蒿与多刺绿绒蒿序列一致, 其余任意两种间具有变异位点; *psbA-trnH* 序列分析显示, 任意两种间均有变异位点; 两者结合可有效对所有 5 种植物进行区分鉴定。结论 ITS 和 *psbA-trnH* 序列相结合可用于绿绒蒿属藏药欧贝和才温的分子鉴定。

关键词: ITS; *psbA-trnH*; 藏药; 绿绒蒿属; 欧贝; 才温; 毛瓣绿绒蒿; 红花绿绒蒿; 全缘叶绿绒蒿; 总状绿绒蒿; 多刺绿绒蒿
中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0541-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.017

Identification of Tibetan medicinal plants of *Meconopsis* Vig. using ITS and *psbA-trnH* sequenceNI Liang-hong¹, ZHAO Zhi-li¹, MENG Qian-wan¹, GAAWE Dorje², MI Ma²

1. Department of Pharmacognosy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201203, China

2. Tibetan Traditional Medical College, Lhasa 850000, China

Abstract: Objective To identify the common Tibetan traditional medicine of *Meconopsis* Vig. using nuclear gene internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast *psbA-trnH* sequence. **Methods** Ethnopharmacological study was carried out, three species of Ou-Bei (*M. torquata*, *M. punicea*, and *M. integrifolia*) and two species of Cai-Wen (*M. racemosa* and *M. horridula*) were collected. The ribosomal DNA ITS and chloroplast *psbA-trnH* noncoding region sequences were determined and analyzed. **Results** The ITS sequences of *M. racemosa* and *M. horridula* were completely the same, while variable site could be detected in each pairwise comparison of ITS sequences in other species; The *psbA-trnH* sequence analysis showed that the variable sites could be detected in each pairwise comparison of the sequences. The combination of them could be used to identify all the five species. **Conclusion** The combination of ITS and *psbA-trnH* sequence could be used to identify the Tibetan traditional medicine Ou-Bei and Cai-Wen in *Meconopsis* Vig.

Key words: ITS; *psbA-trnH*; Tibetan traditional medicine; *Meconopsis* Vig.; Ou-Bei; Cai-Wen; *Meconopsis torquata* Prain; *Meconopsis punicea* Maxim.; *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch.; *Meconopsis racemosa* Maxim.; *Meconopsis horridula* Hook. f. et Thoms.

绿绒蒿属 *Meconopsis* Vig. 是罂粟科 (Papaveraceae) 的第二大属, 我国有 38 种, 集中分布于西南部, 是一类具有较高经济、药用价值的高山植物^[1]。藏医药学是传统医学宝库的重要组成部分, 具有丰富的民族特色, 自古以来就以该属多种

植物入药^[2]。藏药“欧贝”(ལུང་པེ།) 来源于本属多种植物, 可清肝热、肺热, 并能治热邪引起的喉阻塞。根据花色不同, 欧贝又分为不同品种, 其中蓝色花的称为“欧贝完保”, 红色花的称为“欧贝玛保”, 黄色花的称为“欧贝赛保”^[2-3]。藏药“才温”(ཅའ་ཁྲོ།)

收稿日期: 2013-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173654); 上海市教委预算内科研项目(2011JW11)

作者简介: 倪梁红(1980—), 男, 讲师, 主要从事中药资源与品种鉴定工作。E-mail: nlhtcm@126.com

*通信作者 赵志礼, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源与品种鉴定工作。E-mail: zhilzhao@sohu.com

网络出版时间: 2014-01-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.html>

来源于本属植物,可清骨中之热,治头伤、骨折、跌打损伤等症^[2-3]。近年来,本课题组开展了藏药的品种整理及民族植物学调研工作^[4-5]。因本属植物种类较多,不同地区欧贝来源的多样性及传统鉴定方法的局限性,需深入进行整理鉴定工作。

随着分子生物学技术的快速发展,植物 DNA 序列被大量应用于药材品种的分子鉴定,因其能准确、快速鉴定物种,因此对于药材原植物鉴定、解决长久以来原植物辨识错误的现状,具有极为明显的优势^[6-7]。其中植物核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA ITS 区)序列进化速率较快,可提供较为丰富的变异位点和信息位点^[8-10];叶绿体 *psbA-trnH* 非编码序列,因其变异程度相对较高,变异显著且容易扩增,现已被广泛用于分子鉴定^[11-12]。对于亲缘极为相近的物种,单一序列有时无法提供很好的分辨率,通过应用多个基因片段区分,尝试多个分子标记相结合的办法,可提供更全面的信息,使物种间的鉴别效率更高^[6]。

本实验在民族植物学考察、经典分类学鉴定基础上,采集欧贝完保、欧贝玛保、欧贝赛保、才温基原植物,分别测定其 ITS、*psbA-trnH* 序列并分析其差异,以期对藏药欧贝和才温的分子鉴定方法建立提供基础资料。

1 材料

实验材料均为自采,其中毛瓣绿绒蒿从西藏自

治区藏药厂药材库房收集,产地为拉萨市堆龙德庆县,同时取新鲜叶片经硅胶快速干燥,备用。药材凭证标本经上海中医药大学赵志礼教授鉴定,存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室,样品信息见表 1。

2 方法

2.1 序列测定

在 CTAB 法^[13]的基础上略做改进提取总 DNA。ITS、*psbA-trnH* 序列的扩增引物分别参考 Yuan^[14]和 Sang^[11]。ITS 序列引物分别为 YP1: 5'-GGAAGT-AGAAGTCGTAACAAGG-3'; YP4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 条件为 95 °C, 5 min; 95 °C, 1 min, 52 °C, 1 min, 72 °C, 1.5 min, 共 31 个循环; 72 °C, 10 min。*psbA-trnH* 序列引物分别为 PA: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'; TH: 5'-CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3'。PCR 条件为 94 °C, 5 min; 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1.5 min; 30 个循环, 72 °C, 7 min。扩增产物送上海英骏生物技术有限公司纯化并测序(Axygen 胶回收试剂盒, ABI 3730xl 型测序仪)。

2.2 序列数据分析

ITS 及 *psbA-trnH* 序列起止范围参考 GenBank 中罂粟科序列。所得序列输入计算机后,采用 MEGA5.0、MegAlign7.1.0 (44) 软件进行分析。

表 1 样品与凭证标本
Table 1 Samples and voucher specimens

样品	凭证标本号	采集地
毛瓣绿绒蒿 <i>M. torquata</i>	2011XZ003	西藏自治区藏药厂
全缘叶绿绒蒿(居群 1) <i>M. integrifolia</i>	2010LRH02-1	四川若尔盖辖曼乡草坡
	2010LRH02-2	四川若尔盖辖曼乡草坡
全缘叶绿绒蒿(居群 2)	2011XZ228-1	西藏拉萨夺底沟山坡草地
	2011XZ228-2	西藏拉萨夺底沟山坡草地
红花绿绒蒿 <i>M. punicea</i>	2010LRH01-1	四川若尔盖辖曼乡草坡
	2010LRH01-2	四川若尔盖辖曼乡草坡
	2010LRH01-3	四川若尔盖辖曼乡草坡
总状绿绒蒿 <i>M. racemosa</i>	2010LRH03-1	西藏拉萨夺底沟山坡草地
	2010LRH03-2	西藏拉萨夺底沟山坡草地
	2010LRH03-3	西藏拉萨夺底沟山坡草地
多刺绿绒蒿 <i>M. horridula</i>	2011XZ219-1	西藏拉萨夺底沟山坡石缝
	2011XZ219-2	西藏拉萨夺底沟山坡石缝
	2011XZ219-3	西藏拉萨夺底沟山坡石缝

3 结果与分析

3.1 分类位置的确定

经标本的形态学观察与分类学鉴定,并查阅中国科学院西北高原生物研究所标本馆相关标本,确定欧贝完保基原植物为毛瓣绿绒蒿、欧贝玛保基原植物为红花绿绒蒿、欧贝赛保基原植物

为全缘叶绿绒蒿,才温基原植物为总状绿绒蒿、多刺绿绒蒿。

3.2 序列的获得

应用 PCR 产物直接测序的方法,获得各样本的 ITS、*psbA-trnH* 完整序列,各居群内部序列皆一致。各序列长度见表 2。

表 2 ITS 及 *psbA-trnH* 序列长度
Table 2 Sequence lengths of ITS and *psbA-trnH*

物 种	ITS1 / bp	5.8 S / bp	ITS2 / bp	总长 / bp	<i>psbA-trnH</i> / bp
毛瓣绿绒蒿	251	162	252	665	248
全缘叶绿绒蒿 (居群 1)	251	162	250	663	245
全缘叶绿绒蒿 (居群 2)	251	162	249	662	251
红花绿绒蒿	254	162	252	668	242
总状绿绒蒿	252	162	250	664	238
多刺绿绒蒿	252	162	250	664	238

3.3 种间、居群间分辨率的评价

应用 ClustalW 软件对所有 ITS、*psbA-trnH* 序列分别进行对位排列,MEGA 5.0 分析软件计算序列变异值。

ITS 序列分析结果显示,任意 2 组序列比较,除总状绿绒蒿与多刺绿绒蒿无位点差异,其余均有位点变异情况,其中全缘叶绿绒蒿两个居群序列间存在 11 个变异位点。K2P 遗传距离变异幅度为:0 (总状绿绒蒿与多刺绿绒蒿)、0.120 (毛瓣绿绒蒿与红花绿绒蒿) (表 3)。

psbA-trnH 序列分析结果显示,任意 2 组序列比较时,均出现变异情况,其中全缘叶绿绒蒿 2 个居群序列间存在 6 个变异位点。K2P 遗传距离变异幅度为 0.026 (全缘叶绿绒蒿居群 1 与居群 2;总状绿绒蒿与多刺绿绒蒿)、0.109 (毛瓣绿绒蒿与红花绿

绒蒿) (表 4)。

3.4 UPGMA 系统树

从 Genbank 下载罂粟科罂粟属虞美人 *Papaver rhoeas* L. 序列为外类群 (ITS 序列号 DQ912886; *psbA-trnH* 序列号 JN584665), 分别以 ITS 序列、*psbA-trnH* 序列构建 UPGMA 系统树 (Kimura 2-parameter 模型, bootstrap 1 000 次重复)。基于 ITS 序列的系统树显示,外类群首先区分开;其余,全缘叶绿绒蒿 2 个居群聚在一起,多刺绿绒蒿和总状绿绒蒿聚在一起,然后与红花绿绒蒿聚类,毛瓣绿绒蒿单独为一支,见图 1。基于 *psbA-trnH* 序列的系统树显示,外类群首先区分开;其余,全缘叶绿绒蒿两个居群聚在一起,多刺绿绒蒿和总状绿绒蒿聚在一起,然后与红花绿绒蒿聚为一大支,毛瓣绿绒蒿单独为一支,见图 2。

表 3 6 个分类群 ITS 序列成对比较时的位点变异值 (上三角: 变异位点; 下三角: 遗传距离)
Table 3 Numbers of site mutations (above diagonal) and pairwise K2P genetic distance (below diagonal) of six taxa based on ITS sequence

物 种	毛瓣绿绒蒿	全缘叶绿绒蒿 (居群 1)	全缘叶绿绒蒿 (居群 2)	红花绿绒蒿	总状绿绒蒿	多刺绿绒蒿
毛瓣绿绒蒿	—	66	62	72	70	70
全缘叶绿绒蒿 (居群 1)	0.108	—	11	42	41	41
全缘叶绿绒蒿 (居群 2)	0.101	0.017	—	42	42	42
红花绿绒蒿	0.120	0.067	0.067	—	44	44
总状绿绒蒿	0.116	0.065	0.067	0.070	—	0
多刺绿绒蒿	0.116	0.065	0.067	0.070	0	—

表 4 6 个分类群 *psbA-trnH* 序列成对比较时的位点变异值 (上三角: 变异位点; 下三角: 遗传距离)
Table 4 Values of site mutations (above diagonal) and pairwise K2P genetic distance (below diagonal) of six taxa based on *psbA-trnH* sequence

物 种	毛瓣绿绒蒿	全缘叶绿绒蒿 (居群 1)	全缘叶绿绒蒿 (居群 2)	红花绿绒蒿	总状绿绒蒿	多刺绿绒蒿
毛瓣绿绒蒿	—	23	22	24	21	15
全缘叶绿绒蒿 (居群 1)	0.104	—	6	12	14	19
全缘叶绿绒蒿 (居群 2)	0.100	0.026	—	14	14	20
红花绿绒蒿	0.109	0.053	0.062	—	15	21
总状绿绒蒿	0.095	0.062	0.062	0.067	—	6
多刺绿绒蒿	0.067	0.085	0.090	0.095	0.026	—

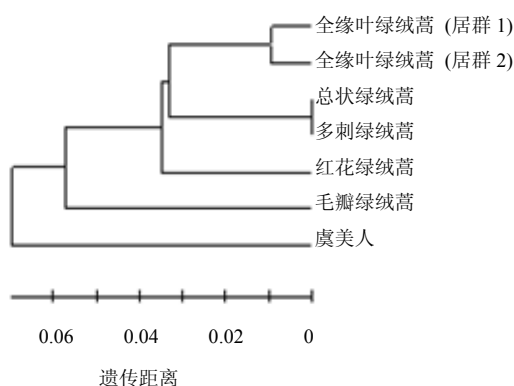


图 1 基于 ITS 序列构建的 UPGMA 系统发育树
Fig. 1 UPGMA systematic tree based on ITS sequences

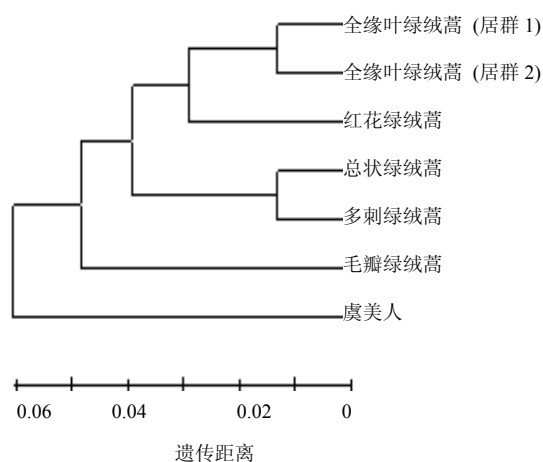


图 2 基于 *psbA-trnH* 序列构建的 UPGMA 系统发育树
Fig. 2 UPGMA systematic tree based on *psbA-trnH* sequences

4 讨论

欧贝和才温类藏药来源于绿绒蒿属多个近缘种, 是重要的藏药品种, 欧贝又分为欧贝完保等不同品种, 其主要治疗的病症各有差异^[3], 因此品种的正确鉴定对于安全用药具有重要的意义。在调研中发现, 实际用药和药厂收购中存在品种错误和混

乱的现象, 因此, 本实验收集不同品种欧贝和才温类药材的 5 种基原植物, 测定并分析其 ITS 和 *psbA-trnH* 序列, 以期为本属藏药植物的分子鉴定提供依据和基础工作。

植物 DNA 序列现被大量应用于药材的分子鉴定, 目前已成为植物分类和鉴定研究的热点^[6]。对于亲缘很近的物种, 单一片段的分析存在局限性, 应用多个片段结合的方法可以获得更全面的信息。本实验中, ITS 区序列分析显示, 不同物种序列间总体存在较多变异位点, 但总状绿绒蒿和多刺绿绒蒿的序列一致, 结合叶绿体 *psbA-trnH* 序列可有效将两者区分。同时, 这两个片段对于全缘叶绿绒蒿不同居群间有区分意义。基于两种序列的系统树均分为两支, 一支为毛瓣绿绒蒿 (具盘绿绒蒿亚属), 其他 4 种 (绿绒蒿亚属) 聚为一支, 与传统分类学观点完全一致。利用多片段相结合, 如双亲遗传的核基因序列和母系遗传的叶绿体基因序列相结合, 可使对物种的鉴别效率更高。

总状绿绒蒿与多刺绿绒蒿的主要区别在于前者具高的茎, 茎除上部外均具叶, 有时有基生花葶混生, 《西藏植物志》将其处理为多刺绿绒蒿的变种 *Meconopsis horridula* Hook. f. et Thoms. var. *racemosa* (Maxim.) Prain^[15]。在野外观察及标本查阅中发现, 多刺绿绒蒿极少, 典型的总状绿绒蒿具单一且高的总状花序, 较易鉴别, 有些个体的总状花序短且混生有大量基生花葶, 与多刺绿绒蒿极为相似。本实验中, 两者的 ITS 区序列完全一致, *psbA-trnH* 序列有差异, 但因两个物种分别采自不同的生境, 不确定是否为环境影响导致位点变异。下一步需加大样本量, 选取更多的序列进行比较分析。

根据文献报道^[2], 欧贝的传统药用部位为花。但调研中发现, 因环境破坏、过量采挖等影响, 绿

绒蒿属资源量日益减少。为满足市场药材需求,现大多采用整个地上部分入药。对这些珍贵的藏药资源,在开发利用的同时,应进行有效保护。

欧贝为典型的多来源藏药,品种较多,来源复杂。根据文献报道^[3],欧贝完保的正品来源为五脉绿绒蒿,毛瓣绿绒蒿作为代用品。根据调研,现拉萨地区欧贝完保的主流品种来源为毛瓣绿绒蒿。因自然、人为等多方面因素影响,现今藏药品种与传统来源存在差异,需结合文献和实际调研进行整理考证。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第32卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [3] 杨永昌, 何廷农, 卢生莲, 等. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [4] Zhao Z L, Dorje G, Wang Z T. Identification of medicinal plants used as Tibetan traditional medicine Jie-Ji [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1): 122-126.
- [5] 赵志礼, 赵汝能. 藏药川布的原植物考订 [J]. 中国药学杂志, 1992, 27(5): 269-270.
- [6] 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.
- [7] Kres 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: 8369-8347.
- [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, 44(13): 1814-1818.
- [9] China Plant BOL Group. Comparative analysis of a large dataset indicates that ITS should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 19641-19646.
- [10] 蒋 明, 李嵘嵘, 管 铭, 等. 悬钩子属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2143-2149.
- [11] Sang T, Crawford D, Stuessy T. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *Am J Bot*, 1997, 84(8): 1120-1136.
- [12] 夏 至, 李贺敏, 张红瑞, 等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1027-1032.
- [13] Stewart C N, Laura E V. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. *Biotechniques*, 1993, 14(5): 748-749.
- [14] Yuan Y M, Küpfer P. Molecular phylogenetics of the subtribe Gentianinae (Gentianaceae) inferred from the sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA [J]. *Plant Syst Evol*, 1995, 196(3/4): 207-226.
- [15] 吴征镒, 关克俭, 王文采, 等. 西藏植物志 (第 2 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1985.