

远志属 7 种药用植物 ITS1 和 ITS2 序列分析

樊 杰, 白 妍, 束明月

山西中医学院, 山西 太原 030024

摘要: 目的 采用 ITS 序列进行远志属 7 种药用植物的分子鉴定。方法 通过测定远志 *Polygala tenuifolia*、卵叶远志 *P. sibirica*、瓜子金 *P. japonica*、华南远志 *P. glomerata*、蓼叶远志 *P. persicariifolia*、肾果小扁豆 *P. furcata* 和小花远志 *P. arvensis* 的 ITS1、ITS2 序列, 借助 ClustalX、MEGA 3.1 软件比较和分析 ITS1、ITS2 的序列特征。结果 远志属 7 种药用植物 ITS1 长度为 279~291 bp, ITS2 的长度为 211~219 bp, 变异位点 232 个, 信息位点 53 个; 远志与卵叶远志的遗传距离最小, 华南远志与肾果小扁豆遗传距离最大, 亲缘关系最远。结论 远志属 7 种药用植物的 ITS1、ITS2 序列可作为分子鉴定的依据。

关键词: 远志属; ITS 序列; DNA 条形码; 物种鉴别; ITS1; ITS2

中图分类号: R931 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)04-0562-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.019

ITS1 and ITS2 sequences analysis of seven medicinal plants in *Polygala* L.

FAN Jie, BAI Yan, SHU Ming-yue

Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

Abstract: Objective To provide the evidence for the molecular identification of seven medicinal plants in *Polygala* L. **Methods** Sequencing of ITS1 and ITS2 genes from *Polygala furcata*, *P. japonica*, *P. tenuifolia*, *P. glomerata*, *P. persicariifolia*, *P. sibirica*, and *P. arvensis* was performed. Sequence features were compared and analyzed using ClustalX and MEGA 3.1 softwares. **Results** In the seven medicinal plants of *Polygala* L., the length of ITS1 and ITS2 varied in 279—291 bp and 211—219 bp separately, with 232 variable sites and 53 parsimony information sites. The smallest genetic distance was observed between *P. tenuifolia* and *P. sibirica*, and the largest existed between *P. furcata* and *P. glomerata* revealing their farthest genetic relationship. **Conclusion** ITS sequences of the seven medicinal plants in *Polygala* L. can be used as the reference for the molecular identification.

Key words: *Polygala* L.; ITS sequences; DNA barcodes; identification of species; ITS1; ITS2

远志属 *Polygala* L. 是一个世界性分布的大属, 尤以热带、亚热带为盛, 约 500 种^[1], 传统分类分为 10 个组^[2]或 12 个亚属^[3]。我国有 3 个亚属, 42 种 8 变种, 全国分布, 以西南和华南地区最多, 3 个亚属分别是黄杨亚属、小扁豆亚属和远志亚属^[1,4]。远志属植物含有丰富的三萜皂苷、吡啶、寡糖酯类成分及其他活性成分, 组成该属植物生理活性的有效物质群, 该属植物有镇咳、祛痰、益智、安定、解毒消肿、补益强壮等作用^[5-6]。在临床和民间常用于心神不安、惊悸失眠健忘、咳痰不爽、疮疡肿毒等^[6]。肾果小扁豆 *Polygala furcata* Royle、瓜子金 *P. japonica* Houtt.、远志 *P. tenuifolia* Willd.、华南远志 *P. glomerata* Lour.、蓼叶远志 *P. persicariifolia*

DC. 卵叶远志 *P. sibirica* L. 及小花远志 *P. arvensis* Willd. 为常见的远志属药用植物, 近年来, 在化学成分、HPLC 指纹图谱、遗传多样性、组织培养和药理作用等方面有一些相关研究^[7-9]。

核糖体 DNA 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列由于长度保守、信息位点丰富、核苷酸变异快, 已被广泛用于植物种间、属间和科内的系统发育与分类研究^[10-12]。近年来, 在药用植物的分子鉴定、遗传多样性、系统分类等方面有大量研究^[9,13-14], 而有关用 ITS 序列鉴定远志属药用植物的研究未见报道。本研究通过测定 ITS1、ITS2 序列, 构建了远志属 7 种植物的系统发育树, 从分子系统学角度探讨它们的亲缘关系, 同时为远志属药

收稿日期: 2014-09-28

基金项目: 山西省自然科学基金项目 (2012011034-2); 山西中医学院博士科研启动基金项目 (2014)

作者简介 樊 杰 (1972—), 女, 讲师, 研究方向为药用植物资源开发。E-mail: fanjie6789@163.com

用植物的分子鉴定提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

远志 *Polygala tenuifolia* (山西孟县和灵丘) 和卵叶远志 *Polygala sibirica* (山西孟县) 由山西中医

学院樊杰讲师鉴定。肾果小扁豆 *Polygala furcata*、华南远志 *Polygala glomerata* 及小花远志 *Polygala arvensis* 的叶片材料取自中国科学院植物所标本馆。从 GenBank 数据库获得另外 3 个种的 ITS 序列 3 条, 材料来源和 GenBank 数据见表 1。

表 1 样品来源
Table 1 Sample sources

种名	来源	GenBank 登录号	
		ITS1	ITS2
肾果小扁豆	中国科学院植物所标本馆	KJ490654	KJ490656
华南远志	中国科学院植物所标本馆	KJ490653	KJ490657
远志-1 (山西灵丘)	山西中医学院	KJ462466	KJ490655
远志-2 (山西孟县)	山西中医学院	KJ755057	KJ755057
小花远志	中国科学院植物所标本馆	KJ755055	KJ755055
卵叶远志-1 (山西孟县)	山西中医学院	KJ755056	KJ755056
卵叶远志-2	—	GQ889020*	GQ889020*
蓼叶远志	—	GQ888998*	GQ888998*
瓜子金	—	GQ888972*	GQ888972*

*GenBank 下载序列

*GenBank download sequence

1.2 基因组 DNA 的提取

DNA 的制备采用改良 CTAB 法, 但无法获得进行后续 PCR 的 DNA, 根据文献报道^[15]对实验环节略作调整, 水浴温度 45 °C, 水浴 5 h, 加异丙醇沉淀 1 h。

1.3 ITS1、ITS2 序列的 PCR 扩增及测序

引物参考文献中的引物^[14], ITS 片段均无法一次完成 PCR 扩增, 所以分为 ITS1 和 ITS2 两段扩增。使用的引物包括 ITS 正向: 5'-CGAGAAGTCCAC-TGAACCTTATC-3' 和 ITS 反向: 5'-TCT TYTCC-TCCGCTTATTGATATGC-3'; ITS internal 反向: 5'-GCGTTCAAAGACTCGATGGTTC-3', ITS internal 正向: 5'-GACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC-3'。PCR 反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行。PCR 总体积为 25 μL, 包括: 12.5 μL Mix (Takara Premix Taq), 10 μm 引物各 0.5 μL, 0.5~1 μL 模板 (10~50 ng), 用灭菌超纯水补足反应体积。扩增程序为: 94 °C、3 min, 33 个循环: 94 °C、1 min, 58 °C、1 min, 72 °C、80 s, 72 °C、6 min。PCR 产物 10 μL 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物送华大基因测序。

1.4 序列提交和分析

序列通过 Sequin 软件提交至 NCBI 数据库, 并获得相应登录号。ClustalX 1.81 软件用于序列比对, 采用 MEGA 3.1 软件计算遗传距离并构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 ITS1、ITS2 序列比较

测序结果表明, 序列中除 ITS1 和 ITS2 的全长外, 还包含 5.8、18、28 S 的部分序列, 远志属 4 种药用植物的 ITS 序列已提交至 NCBI, GenBank 登录号和对应的植物名称见表 1。序列分析结果表明, 远志属 7 种药用植物 ITS1 长度为 279~291 bp, (G+C) 量为 55.6%~62.5%; ITS2 的长度为 211~219 bp, (G+C) 量为 59.3%~65.0%。结果见表 2。

利用 Clustal X 1.81 软件分别对 ITS1 和 ITS2 的 9 个序列进行比对, 结果表明, ITS1 和 ITS2 结果类似, ITS1 序列远志与卵叶远志之间差异最小, 仅存在 1 个碱基的差别, 其余种间差别都很大; ITS2 序列远志与卵叶远志之间差异最小, 仅存在 1 个碱基的差别, 瓜子金与远志有 2 个碱基差异, 与卵叶远志有 3 个碱基的差异; 其余种间差别都很大。

2.2 系统发育分析

利用 MEGA 3.1 软件计算 ITS1 和 ITS2 的变异位点及信息位点, 结果表明, ITS1 含 144 个变异位点和 35 个信息位点, 分别占总位点数的 42.48% 和 10.32%; 而 ITS2 序列中的变异位点和信息位点分别为 88 和 18 个, 占总位点数的 37.93% 和 7.76%。利用 MEGA 3.1 的 Kimura 2-parameter 计算 6 种药用植物之间的遗传距离, 结果表明, 远志的 2

个样品及卵叶远志的 2 个样品之间遗传距离为 0，远志与卵叶远志之间的遗传距离为 0.006，两者的亲缘关系为种间最近；华南远志与肾果小扁豆之间遗传距离最大，达 0.472，两者关系最远（表 3）。

基于 ITS1 和 ITS2 序列，采用 NJ 法构建了

系统发育树，经 1 000 次自举检测，结果（图 1）表明，亲缘关系较近的卵叶远志与远志处于同一分支，并得到 100%支持；瓜子金与小花远志聚为一支，支持率中等（63%）。与它们遗传距离较远的蓼叶远志、华南远志、肾果小扁豆依次各自成一支。

表 2 远志属 7 种药用植物 ITS1、ITS2 序列长度及(G+C)量

Table 2 Length and G + C contents of ITS1 and ITS2 sequences of seven medicinal plants in *Polygala* L.

样品	ITS1		ITS2	
	长度/bp	(G+C)%	长度/bp	(G+C)%
肾果小扁豆	291	55.6	211	59.3
华南远志	285	62.1	219	64.3
远志-1	282	61.7	216	64.4
远志-2	282	61.7	216	64.4
小花远志	284	62.0	215	63.3
卵叶远志-1	282	62.4	217	65.0
卵叶远志-2	282	62.4	217	65.0
蓼叶远志	279	61.2	212	62.3
瓜子金	280	62.5	216	64.4

表 3 远志属 7 种药用植物的遗传距离

Table 3 Genetic distances among seven medicinal plants in *Polygala* L.

样品	远志-2	卵叶远志-1	小花远志	肾果小扁豆	蓼叶远志	远志-1	卵叶远志-2	瓜子金	华南远志
远志-2	1.000								
卵叶远志-1	0.006	1.000							
小花远志	0.057	0.055	1.000						
肾果小扁豆	0.428	0.428	0.432	1.000					
蓼叶远志	0.155	0.149	0.157	0.457	1.000				
远志-1	0.000	0.006	0.059	0.431	0.157	1.000			
卵叶远志-2	0.006	0.000	0.057	0.432	0.152	0.006	1.000		
瓜子金	0.050	0.050	0.051	0.440	0.166	0.053	0.052	1.000	
华南远志	0.171	0.173	0.176	0.472	0.234	0.173	0.176	0.177	1.000

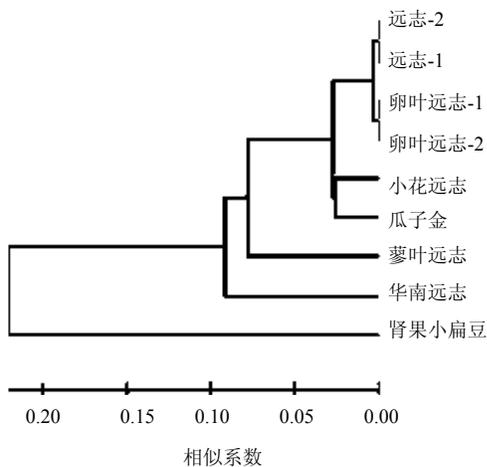


图 1 基于 ITS1 和 ITS2 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on ITS1 and ITS2 sequences

3 讨论

ITS 序列分析技术具有技术简单、结果准确、重复性好等优点，近年来广泛应用于药用植物鉴定，是药学研究中的一种重要分子标记^[16]。其中 ITS2 被认为比 ITS1 具有更多的信息位点，具有更高的鉴定效率^[17-18]。但本研究并不支持这一结论，ITS1 序列中的信息位点占总位点数的 10.32%略高于 ITS2 的 7.76%。

本研究以 7 种远志属药用植物为材料，利用 PCR 技术分离、测定了其中 5 种的 ITS1、ITS2 序列，并提交至 NCBI 数据库，丰富了 GenBank 数据库中远志属植物的序列信息。卵叶远志和远志同为药材远志的基源植物^[19]，两者在形态上十分相似，药材也较难区别，基于 ITS 序列建立的系统发育树

也支持这一观点,二者是7种药用植物中遗传距离最小的。ITS序列可用于植物种间、属间和科内的系统发育与分类,本研究中,远志属植物在ITS序列上存几个到几十个碱基的差异,变异位点和信息位点丰富,ITS序列可作为远志属7种药用植物之间鉴定的分子标记。

参考文献

- [1] 陈书坤,李恒,陈邦余.中国植物志(第43卷,第3分册)[M].北京:科学出版社,1997.
- [2] Chodat R. Monographia Polygalacearum [J]. *Mem Soc Phys Geneve*, 1893, 31: 1-500.
- [3] Paiva J A R. *Polygalarum africanarum* et *madagascariensium* prodomus atque gerontogei generis *Heterosamara* Kuntze, a genere *Polygala* L. segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica [J]. *Fontqueria*, 1998, 50: 1-356.
- [4] 陈书坤.中国远志属植物的分类研究[J].植物分类学报,1991,29(3): 193-229.
- [5] 李文魁,林新,彭勇.中国远志属药用植物资源及传统疗效[J].时珍国药研究,1997,8(6): 481-482.
- [6] 杨学东,张丽杰,梁波.远志科植物中寡糖酯类成分[J].中草药,2002,33(10): 954-958.
- [7] 姜勇,张娜,崔振.远志药材的HPLC指纹图谱[J].药学学报,2006,41(2): 106-109.
- [8] 马菁菁,刘斌,罗跃娥.远志化学成分和药理活性的研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(12): 161-162.
- [9] 李佳,房敏峰,周天华,等.主产区远志种质资源遗传多样性的ISSR分析[J].中草药,2010,41(11): 1881-1885.
- [10] Fan J, Qin H N, Li D Z, *et al.* Molecular phylogeny and biogeography of *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae) based on nuclear ITS, and chloroplast trnL-F and matK [J]. *Taxon*, 2009, 58(3): 849-861.
- [11] Sonnante G, Galasso I, Pignone D. ITS sequence analysis and phylogenetic inference in the genus *Lens* Mill. [J]. *Ann Bot*, 2003, 91(1): 49-54.
- [12] Schmidt G J, Schilling E E. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data [J]. *Am J Bot*, 2000, 87(5): 716-726.
- [13] 蒋玲艳,郭志刚,王翀,等.中国不同地区绞股蓝ITS序列分析[J].中草药,2009,40(7): 1123-1127.
- [14] Abbott J R. Phylogeny of the Polygalaceae and a revision of *Badiera* [D]. Gainesville: University of Florida, 2009.
- [15] Cota-Sánchez J H, Remarchuk K, Ubayasena K. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 24(2): 161-167.
- [16] 于华会,杨志玲,杨旭,等.药用植物种质资源ITS序列研究进展[J].中草药,2010,1(3): 491-496.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 中国药典[S].一部.2010.