

• 药材与资源 •

野豌豆属蒙药药用植物的 rDNA-ITS 序列分析

李 晓, 赵 龙, 王 佩, 鞠爱华*

内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110

摘 要: **目的** 比较研究野豌豆属中入蒙药的 8 种药用植物山野豌豆 *Vicia amoena*、北野豌豆 *V. ramuliflora*、广布野豌豆 *V. cracca*、多茎野豌豆 *V. multicaulis*、黑龙江野豌豆 *V. amurensis*、东方野豌豆 *V. japonica*、大叶野豌豆 *V. pseudorobus* 和歪头菜 *V. unijuga* 的 rDNA-ITS 序列差异性及其规律, 寻找 8 种植物药之间的分子鉴别方法。**方法** 从野豌豆属蒙药材中提取总 DNA, 用 PCR 法扩增 ITS, 运用 Clustal X、MEGA 等软件比较和分析 ITS 的序列特征。**结果** 野豌豆属入蒙药的 8 种药用植物 ITS 序列长度为 598~611 bp, 具变异位点 40 个, 其中信息位点 33 个, 特异性鉴别位点 29 个。序列已提交至 NCBI 数据库, 登录号为 JQ309787~JQ309794, KJ417905~KJ417931。其中 5 种野豌豆的 ITS 序列为国际首次获得, 分别为黑龙江野豌豆 (JQ309789)、东方野豌豆 (JQ309792)、多茎野豌豆 (JQ309791)、大叶野豌豆 (JQ309788) 和北野豌豆 (JQ309793)。**结论** ITS 序列对野豌豆属入蒙药的 8 种药用植物具有较好的分辨性, 为野豌豆属蒙药药用植物分子鉴别提供了参考。

关键词: 野豌豆属; 蒙药; ITS 序列; 山野豌豆; 北野豌豆; 广布野豌豆; 多茎野豌豆; 黑龙江野豌豆; 东方野豌豆; 大叶野豌豆; 歪头菜

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)12-1814-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.12.020

rDNA-ITS Sequence analysis of traditional Mongolian medicinal plants in *Vicia* L.

LI Xiao, ZHAO Long, WANG Pei, JU Ai-hua

Department of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: Objective To find the patterns of the rDNA ITS sequence variation of eight traditional Mongolian medicinal plants in *Vicia* L. (including *V. amoena*, *V. ramuliflora*, *V. cracca*, *V. multicaulis*, *V. amurensis*, *V. japonica*, *V. pseudorobus*, and *V. unijuga*), and establish the molecular biological method for the identification of the eight plants. **Methods** DNA was extracted from the dry leaves, and the ITS gene fragments were PCR amplified and sequenced. The sequence features were compared and analyzed using Clustal X and MEGA softwares. **Results** The length of ITS region varied from 598—611 bp with 40 variable sites, 33 parsimony information sites, and 29 singleton sites among eight traditional mongolian medicinal plants in *Vicia* L. Sequences were submitted to NCBI database with the registry numbers of JQ309787—JQ309794, KJ417905—KJ417931. And ITS sequences of five species among them were first reported in the world, they were *V. amurensis* (JQ309789), *V. japonica* (JQ309792), *V. multicaulis* (JQ309791), *V. pseudorobus* (JQ309788), and *V. ramuliflora* (JQ309793). **Conclusion** ITS sequences could be used to authenticate the eight species in *Vicia* L. and also could provide a reference for molecular identification.

Key words: *Vicia* L.; traditional Mongolian medicinal plants; ITS sequence; *Vicia amoena* Fisch.; *Vicia ramuliflora* (Maxim.) Ohwi.; *Vicia cracca* L.; *Vicia multicaulis* Ledeb.; *Vicia amurensis* Oett.; *Vicia japonica* A. Gray; *Vicia pseudorobus* Fisch. et C. A. Mey.; *Vicia unijuga* R. Br.

野豌豆属 *Vicia* L. 植物为一年、二年或多年生草本, 全世界约 200 种; 我国有 43 种 5 变种, 广布全国各地^[1]; 内蒙古地区有 16 种 3 变种^[2]。本属植物山野豌豆 *Vicia amoena* Fisch. 始载于蒙医药专著《蒙药正典》^[3], 蒙药名萨日德玛, 地上部分入药, 味涩、苦, 性平、涩、轻、稀、和、锐, 有利尿、消肿、愈

伤之功效, 主要用于水肿、创伤。经本草考证^[2-7], 与其同等入药的本属植物还有广布野豌豆 *V. cracca* L.、多茎野豌豆 *V. multicaulis* Ledeb.、大叶野豌豆 *V. pseudorobus* Fisch. et C. A. Mey.、北野豌豆 *V. ramuliflora* (Maxim.) Ohwi.、黑龙江野豌豆 *V. amurensis* Oett.、东方野豌豆 *V. japonica* A. Gray 和歪头

收稿日期: 2015-02-02

基金项目: 内蒙古科技厅科技计划项目 (20080502); 内蒙古医科大学科技百万工程项目 (kjbw2012009)

作者简介: 李 晓 (1978—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 副教授, 主要研究方向为中草药材鉴定及药用植物亲缘学。

*通信作者 鞠爱华 (1955—), 女, 教授。Tel: (0471)6653132 E-mail: lx_leexiao@163.com

菜 *V. unijuga* R. Br. 其中在东北歪头菜与山野豌豆、黑龙江野豌豆、大叶野豌豆作为“透骨草”入药^[8], 其中歪头菜能解热、利尿、理气、止痛, 主治头晕、浮肿、胃痛, 外用治疗毒, 功能主治与山野豌豆又有区别。以上 8 种野豌豆亲缘关系相近, 原植物形态、药材性状及显微特征方面极为相似, 故为了临床用药准确, 对其从分子水平上进行分类鉴别尤为重要。

DNA 分子标记技术用于中药材鉴定和品质评价等方面的研究已有很多报道, 关于植物核糖体 DNA 中的内转录间隔区 (ITS) 序列测定已广泛用于中药材近缘属间、属内以及种内居群间的差异性研究^[9-10]。韩颖^[11]对北野豌豆的基因组 DNA 提取方法进行了研究, 并对不同居群的北野豌豆进行了

RAPD 分析和 ISSR 分析^[12]。但将 ITS 序列用于野豌豆属上述 8 种药用植物的鉴别, 尚未见这方面的报道。本研究测定 8 种野豌豆属药用植物 rDNA ITS 序列, 进行序列分析, 通过构建系统发育树对 8 种药用植物进行鉴定, 为野豌豆属蒙药药用植物鉴定及分子系统生物学研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

于 2009—2011 年药材采收期采集 8 种野豌豆属植物全草, 置于阴凉通风干燥处储存, 本实验采用干燥药材叶片进行 DNA 提取。8 种原植物均经笔者鉴定, 凭证标本保存于内蒙古医科大学药学院药用植物标本室, 材料来源见表 1。

表 1 供试样品来源
Table 1 Source of materials

名称	凭证标本	采集地点	采集时间	NCBI 注册登记号
山野豌豆	SY20090713	呼伦贝尔市大青山避暑山庄	2009-07-13	JQ309794, KJ417905
	SY20100705	呼伦贝尔市大青山避暑山庄	2010-07-05	KJ417906, KJ417907
北野豌豆	B20100818	呼伦贝尔市大兴安岭	2010-08-18	JQ309793, KJ417928, KJ417929
	B20110819	呼伦贝尔市大兴安岭	2011-08-19	KJ417930, KJ417931
广布野豌豆	GB20100719	吉林省安图县长白山	2010-07-15	JQ309787, KJ417908, KJ417909
	GB20100730	辽宁省丹东市凤凰山	2010-08-09	KJ417910, KJ417911
多茎野豌豆	DJ20090828	凉城县蛮汉山	2009-08-28	JQ309791, KJ417912, KJ417913
	DJ20100809	凉城县蛮汉山	2010-08-09	KJ417914, KJ417915
黑龙江野豌豆	HLJ20100719	吉林省安图县长白山	2010-07-27	JQ309789, KJ417925
	HLJ20100726	辽宁省鞍山市千山	2010-07-30	KJ417926, KJ417927
东方野豌豆	DF20100820	呼伦贝尔市大兴安岭	2010-08-20	JQ309792, KJ417920, KJ417921
	DF20110822	呼伦贝尔市大兴安岭	2011-08-22	KJ417922, KJ417923
大叶野豌豆	DY20090828	凉城县蛮汉山	2009-08-28	JQ309788
	DY20100809	凉城县蛮汉山	2010-08-09	KJ417924
歪头菜	WTC20090717	呼和浩特市小井沟	2009-07-17	JQ309790, KJ417916, KJ417917
	WTC20100707	和林县南天门林场	2010-07-07	KJ417918, KJ417919

1.2 总 DNA 提取、纯化

采用改良 CTAB 法^[13]进行药材 DNA 提取, 并做适当改进。产物于 -20 ℃ 保存备用。

1.3 ITS 序列的扩增、纯化、测序

以提取的 DNA 为模板, ITS 的扩增引物参照陈晓颖等^[14]和 Takaiwa 等^[15]的引物设计, ITS1: 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'; ITS4: 5'-TTCTCCGCTTATTGATATGC-3' (均由大连宝生物公司合成)。PCR 扩增体系总体积为 20 μL, 包括 10× 缓冲液 2 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL,

10 μmol/L 正向引物和逆向引物各 1 μL, Taq 聚合酶 (5 U/μL) 0.1 μL, DNA 模板 (适宜浓度) 2 μL, 灭菌三蒸水 (3dH₂O) 13.4 μL。PCR 扩增 ITS 序列的程序为 94 ℃ 预变性 4 min, 94 ℃、1 min, 50 ℃、2 min, 72 ℃、2 min, 循环 36 次, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。同时以 3dH₂O 代替模板 DNA 作空白对照。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

将扩增的目的 ITS 序列进行琼脂糖凝胶电泳, 通过 DNA 胶回收试剂盒 (北京康为世纪公司) 对凝胶目的条带进行回收纯化, 将回收纯化产物送上

海英俊公司直接测序,所有序列均进行双向测序。

1.4 数据处理

将测得的序列用 CLC Sequence Viewer 6.3 软件反向互补、对位排序、手工校正,并将序列提交 NCBI 中 GeneBank 数据库。用 Clustal X1.8 软件^[16]进行 DNA 序列比对 (alignment)。用 MEGA 6.06 分别计算各样品 ITS 序列的差异性,以 Kimura-2-Parameter (K2P) 双参数模型计算遗传距离^[17-18],分别采用 Neighbor Joining、Maximum Likelihood、Minimum Evolution 和 UPGMA 法构建系统发育树,并以 bootstrap 作 2000 次可信度分析。

2 结果

2.1 ITS 序列特点

所测 8 种野豌豆属蒙药药用植物 ITS 序列的 GeneBank 序列注册登记号见表 1。其中 5 种野豌豆

的 ITS 序列为国际首次获得,分别为黑龙江野豌豆、东方野豌豆、多茎野豌豆、大叶野豌豆和北野豌豆,首次获得序列的登录号分别为 JQ309789、JQ309792、JQ309791、JQ309788、JQ309793。依据基因库中野豌豆属已报道的广布野豌豆序列资料 (GeneBank DQ312197)^[19],确定 rDNA 内转录区 ITS1 和 ITS2 与 3 个编码区 18 S、5.8 S、26 S 的界限。8 种蒙药药用植物 ITS 序列长度为 598~611 bp,包括 40 个变异位点,其中信息位点 33 个,特异性鉴别位点 29 个,GC 量为 49%~51%。该片段包括 ITS1、5.8 S 和 ITS2,其中 ITS1 长度为 235~238 bp,GC 量为 52%~54%;ITS2 长度为 196~210 bp,GC 量为 46%~48%;ITS1 序列长于 ITS2 序列。ITS1 序列中 GC 量高于 ITS 序列和 ITS2 序列中的 GC 量 (表 2)。

表 2 ITS 序列长度及其 G+C 量
Table 2 Lengths of ITS and contents of G + C

品种	ITS		ITS1		ITS2	
	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%
山野豌豆	609	50~51	235~236	52	209~210	48
北野豌豆	608~611	50~51	235~238	53	209	48
广布野豌豆	598	49~50	238	52~53	196	46
多茎野豌豆	609	51	236	53	209	48
黑龙江野豌豆	609~610	50	237	53	209	47
东方野豌豆	609	51	236	54	209	48
大叶野豌豆	609	51	236	53~54	209	48
歪头菜	609	51	236	53~54	209	48

2.2 ITS 序列特异性鉴别位点

野豌豆属 8 种蒙药药用植物的 ITS 序列上共有 29 个特异性鉴别位点,样本较多且位点稳定,见表 3。如位点 17 (T/A) 可将北野豌豆与其他 7 种野豌豆区分开,位点 111 (A/G)、117 (C/T)、119 (T/C) 可将山野豌豆与其他野豌豆区分开,位点 50 (A/G)、56 (A/G)、81 (C/T)、101 (A/G)、104 (G/A)、106 (A/T)、123 (G/A)、124 (A/T)、147 (C/T)、165 (A/T)、168 (T/A)、184 (A/T)、240 (A/-/T)、395 (A/G)、439 (T/G)、562 (T/G)、578 (T/C)、595 (T/C) 可将广布野豌豆与其他野豌豆区分开,位点 92 (T/C)、474 (C/T) 可将多茎野豌豆与其他野豌豆区分开,位点 240 (A/-/T)、589 (T/C) 可将黑龙江野豌豆与其他野豌豆区分开。位点 70 (C/A)、436 (T/A)、472 (G/T) 可将东方野豌豆、大叶野豌豆、歪头菜和其他野豌豆区分开,同时又

可将 3 种野豌豆相互区分开。所以说,29 个特异性鉴别位点能够将 8 种野豌豆属药用植物进行区分。

2.3 ITS 序列系统发育树

构建系统发育树是物种鉴定的方法之一。构建系统发育树的目的是为了研究物种间的系统进化关系,而不是为了检验每个物种的单系性,即同一物种的不同个体能否紧密聚在一起^[20]。对 8 种蒙药药用植物的 ITS 序列分别用 Neighbor Joining、Maximum Likelihood、Minimum Evolution 和 UPGMA 法构建系统发育树。其中广布野豌豆的 ITS 序列已有文献报道^[19],因此本研究中将已报道的广布野豌豆 ITS 序列 (DQ312197) 与本研究测得的所有 ITS 序列共同构建系统发育树。通过分析发现 4 种分析方法均取得较为一致的结果 (图 1)。从图 1 中可见,不同居群的 8 种蒙药药用植物均各自聚为一类,分别聚成了 8 个组。通过构建系统发育树进

表 3 野豌豆属蒙药药用植物的特异性鉴别位点
Table 3 ITS sequence singleton sites of eight plant in *Vicia* L.

物种	位点														
	17	50	56	70	81	92	101	104	106	107	111	117	119	123	124
山野豌豆	A	G	G	A	T	C	G	A	T	A	A	C	T	A	T
北野豌豆	T	G	G	A	T	C	G	A	T	G	G	T	C	A	T
广布野豌豆	A	A	A	A	C	C	A	G	A	A	G	T	C	G	A
多茎野豌豆	A	G	G	A	T	T	G	A	T	G	G	T	C	A	T
黑龙江野豌豆	A	G	G	A	T	C	G	A	T	G	G	T	C	A	T
东方野豌豆	A	G	G	C	T	C	G	A	T	G	G	T	C	A	T
大叶野豌豆	A	G	G	C	T	C	G	A	T	G	G	T	C	A	T
歪头菜	A	G	G	C	T	C	G	A	T	G	G	T	C	A	T

物种	位点														
	147	165	168	184	240	395	436	439	472	474	562	578	589	595	
山野豌豆	T	T	A	T	—	G	A	G	T	T	G	C	C	C	
北野豌豆	T	T	A	T	—	G	A	G	T	T	G	C	C	C	
广布野豌豆	C	A	T	A	T	A	A	T	T	T	T	T	C	T	
多茎野豌豆	T	T	A	T	—	G	A	G	T	C	G	C	C	C	
黑龙江野豌豆	T	T	A	T	A	G	A	G	T	T	G	C	T	C	
东方野豌豆	T	T	A	T	—	G	A	G	T	T	G	C	C	C	
大叶野豌豆	T	T	A	T	—	G	A	G	G	T	G	C	C	C	
歪头菜	T	T	A	T	—	G	T	G	G	T	G	C	C	C	

行聚类分析,可将 8 种蒙药药用植物进行鉴定区分。

3 讨论

近年来,分子标记技术和 DNA 特异片段分析技术的迅猛发展及其广泛应用,为揭示药用植物的遗传差异和鉴定中药材的真伪优劣提供了新的方法和手段^[21-24],其中核糖体 DNA (nrDNA) ITS 区(包括 ITS1、5.8 S 和 ITS2)序列已被广泛用于植物属内、近缘属间及同一物种不同居群间的系统发育分析等。ITS 序列等分子标记直接根据生物 DNA 的多态特征,通过序列比对分析得到相当稳定的信息位点,结果更为客观和准确。通过序列比对与同源性分析相结合,可以准确鉴定每一种药用植物。因此建立合理的检测方案对于不同药材尤其是易混药材的鉴别具有重要意义^[25-26]。

本研究以野豌豆属入蒙药的 8 种药用植物为材料,运用 PCR 技术分离并测定了各自的 ITS 序列,将其提交至 NCBI 数据库,登录号为 JQ309787~JQ309794、KJ417905~KJ417931。其中 5 种野豌豆的 ITS 序列为国际首次获得,分别为黑龙江野豌豆(JQ309789)、东方野豌豆(JQ309792)、多茎野豌豆(JQ309791)、大叶野豌豆(JQ309788)和北野豌豆(JQ309793)。本研究中 8 种蒙药药用植物 ITS 序列长度为 598~609 bp,包括 40 个变异位点,其中信息位点 33 个,特异性鉴别位点 29 个,通过序列特

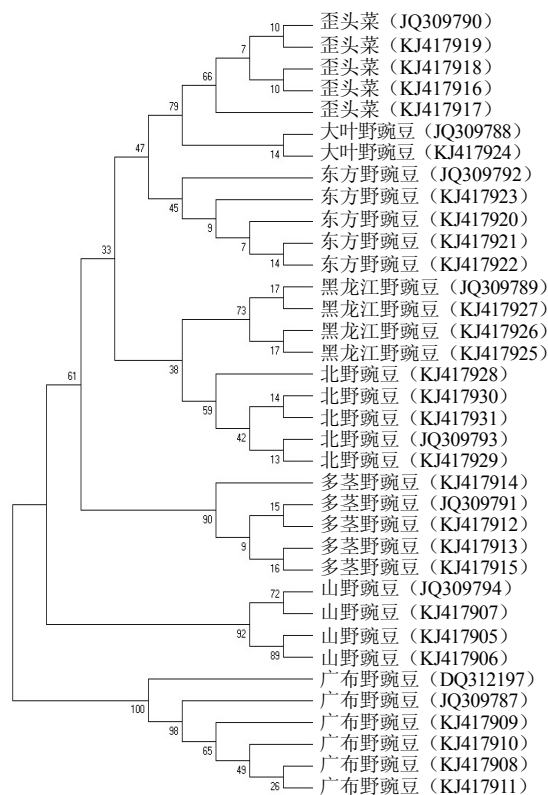


图 1 基于 ITS 序列的野豌豆属蒙药药用植物 NJ 系统树
Fig. 1 NJ phylogenetic tree from ITS of eight species in *Vicia* L.

征及同源性分析, ITS 序列具有丰富的特异性鉴别位点, 可作为 8 种蒙药药用植物之间鉴定的分子标记。同时, 通过基于 ITS 序列遗传距离计算而构建系统发育树, 野豌豆属 8 种药用植物不同居群的植物 rDNA-ITS 序列均能各自聚为一类, 从而能将 8 种药用植物进行鉴别区分。ITS 序列对野豌豆属 8 种药用植物具有较好的分辨性, 为野豌豆属蒙药药用植物鉴别提供了有力的依据。

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 42 卷, 第 2 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- [2] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志 (第 3 卷) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1989.
- [3] 柳白乙拉. 蒙药正典 [M]. 北京: 民族出版社, 2006.
- [4] 白清云. 中国医学百科全书·蒙医学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992.
- [5] 蒙古学百科全书编辑委员会·医学卷编辑委员会编. 蒙古学百科全书·医学卷 (蒙古文版) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2002.
- [6] 罗布桑. 蒙药学 (蒙古文版) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2006.
- [7] 内蒙古植物药志编辑委员会. 内蒙古植物药志 (第 2 卷) [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2000.
- [8] 康廷国. 中药鉴定学专论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [9] 罗 艳, 杨亲二. 川乌与草乌的 ITS 序列分析 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(11): 820-823.
- [10] 赵 欢, 吴 卫, 郑有良, 等. 核糖体 DNA ITS 序列分析在药用植物研究中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 959-963.
- [11] 韩 颖. 北野豌豆及其近缘种基因组 DNA 的提取和 RAPD 稳定的反应体系的建立 [J]. 西南科技大学学报, 2009, 24(2): 74-77.
- [12] 韩 颖. 北野豌豆及其近缘种 ISSR 反应条件的优化 [J]. 内江师范学院学报, 2008, 23(2): 51-54.
- [13] 米丽华, 宋 强, 曾 群, 等. 连翘干燥叶片高质量 DNA 的提取方法研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 4(3): 206-208.
- [14] 陈晓颖, 高晓霞, 罗源生, 等. 化橘红 rDNA ITS 序列特征的初步分析 [J]. 中药材, 2007, 30(3): 268-270.
- [15] Takaiwa F, Oono K, Sugiura M. Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from rice rDNA [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 4(6): 355-364.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Pelwniak F, *et al*. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] Kimura M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequence [J]. *J Mol Evol*, 1981, 78(1): 454-458.
- [18] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al*. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [19] Nick W E, Aaron L, Jeffrey J S, *et al*. Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium-Leguminosae*) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39(3): 688-705.
- [20] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [21] 樊从照, 李晓瑾, 朱 军, 等. 维吾尔药材香青兰 DNA 条形码鉴定方法的研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 415-420.
- [22] 夏 至, 高致明, 李贺敏, 等. 鬼针草及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 828-834.
- [23] 范丙友, 张文婷, 徐 杰, 等. 芍药肌动蛋白基因组 DNA 的克隆及分析 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2069-2074.
- [24] 张忠廉, 宋美芳, 李海涛, 等. 千斤拔属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 118-122.
- [25] Stensrud O, Hywel J N L, Schumacher T. Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly [J]. *Mycol Res*, 2005, 109(1): 41-46.
- [26] Wang C Z, Li P, Ding J Y, *et al*. Identification of *Fritillaria pallidiflora* using diagnostic PCR and PCR-RFLP based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences [J]. *Planta Med*, 2005, 71(4): 384-386.