

## • 药材与资源 •

## 基于 ITS 条形码标记对当归属药用植物的鉴别

阎梦颖, 房敏峰<sup>#</sup>, 祝娟, 杨一欣, 王若楠, 董婉琳, 李忠虎\*

西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

**摘要:** 目的 利用 ITS 条形码标记技术对当归属药用植物进行鉴别。方法 选取该属 32 个物种 158 条核糖体内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列进行分子鉴别分析。所得序列运用 MEGA 6.0 软件计算种内和种间遗传距离, 同时分别构建邻接树 (neighbor-joining tree, NJ)、最大似然树 (maximum-likelihood tree, ML) 和最大简约树 (maximum-parsimony tree, MP), 分析 ITS 序列的鉴别能力和当归属药用植物种间的系统发育关系。结果 当归属物种间 ITS 序列最小遗传距离大于种内最大遗传距离, 而且系统发育结果显示, 每个物种的 ITS 基因型序列能较好地聚类为对应于该物种本身的分支, 且具有中到高度的支持率, 说明 ITS 序列能够将当归属物种区分开。结论 ITS 序列可以作为当归属药用植物的 DNA 分子条形码标记, 将在该属物种的分子鉴定方面发挥重要潜力。

**关键词:** 当归属; DNA 条形码; ITS; 系统发育; 分子鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)06-0974-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.020

Identification of medicinal plants in *Angelica* L. based on ITS barcode label

YAN Meng-ying, FANG Min-feng, ZHU Juan, YANG Yi-xin, WANG Ruo-nan, DONG Wan-lin, LI Zhong-hu

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

**Abstract: Objective** DNA molecular identification of medicinal plants in *Angelica* L. was carried out based on the internal transcribed spacer (ITS) of ribosome sequence variation. **Methods** One hundred and fifty-eight individuals of 32 species from *Angelica* L. were selected, and ITS sequences were used to evaluate the differences among these species. Obtained sequences were analyzed using MEGA6.0 program with the kimura-2-parameter (K2P) model. Meanwhile, phylogenetic trees were constructed, included the neighbor-joining (NJ) tree, the maximum-likelihood (ML) tree, and the maximum-parsimony (MP) tree, and we determined the identification ability of ITS sequences and the phylogenetic relationships among the species in *Angelica* L. **Results** The minimum interspecific distance is far greater than the maximum intraspecific distance in ITS region. The phylogenetic analysis showed that the species in *Angelica* L. can be easily differentiated according to their strong bootstrap support and relationships. **Conclusion** ITS region as DNA barcode can distinguish the medicinal plants in *Angelica* L. and would be a foundation for the aid of molecular identification of the species in *Angelica* L.

**Key words:** *Angelica* L.; DNA barcoding; internal transcribed spacer; phylogeny; molecular identification

当归属 *Angelica* L. 是伞形科 (Umbelliferae) 二年生或多年生草本植物, 全世界约有 80 个物种, 大部分产于北温带和新西兰地区。我国有 26 种 5 变种 1 变型, 主要分布于我国的中部、东北部和西南部地区<sup>[1]</sup>。当归属中许多物种具有重要的药用和经济价值, 其中《中国药典》2010 年版一部<sup>[2]</sup>收录的当归属药材有当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels、白芷 *A. dahurica*

(Fischer ex Hoffmann) Benth & J. D. Hooker ex Franchet & Savatier 和独活 *A. pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan. et. Yuan, 它们的干燥根具有解表散寒、祛风止痛、宣通鼻窍等功效。此外, 除了药典收录的上述 3 个物种, 该属的其他物种也具有一定的药用价值, 在我国的部分地区和东南亚国家的一些区域, 该属的一些物种也被作为重要的中药材使用。例如在我

收稿日期: 2015-08-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31470400)

作者简介: 阎梦颖 (1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为药用植物分子生物学。Tel: 15625286721 E-mail: m\_yanmengying@126.com

房敏峰 (1967—), 女, 教授, 主要从事中药资源与炮制研究。Tel: (029)88302411 E-mail: fff885@126.com

\*通信作者 李忠虎 Tel: (029)88302411 E-mail: lizhonghu@nwu.edu.cn

#并列第一作者

国西部的青海和四川的部分地区, 当归属的青海当归 *A. nitida* H. Wolff 和大叶当归 *A. megaphylla* Diels 被作为当归的替代品使用; 在我国东北的吉林延边和日本、朝鲜、韩国等国家, 东当归 *A. acutiloba* (Siebold & Zuccarini) Kitagawa 被大量栽培, 并类似于当归药用<sup>[3-4]</sup>。

然而, 当归属植物种类繁多, 外部形态特征接近, 而且物种间存在着大量的中间过渡性状, 致使该属物种的特征性状难以鉴别, 导致该属物种鉴定困难。而前人从植物来源、外部形状特征、显微特征以及理化性质等方面对当归属药用植物进行了鉴别研究。如潘泽惠等<sup>[5]</sup>研究了当归属及其近缘属 12 种植物的核型关系, 结合其他性质特征, 认为核型关系可以作为该属物种初步鉴别的依据。张巧英等<sup>[6]</sup>调查并整理了中国四川省当归属的植物资源, 为当归属药用植物的道地性研究提出了建议。冯图等<sup>[7]</sup>对中国西南部地区的 12 种当归属植物的叶表皮进行了显微鉴别, 结果表明显微特征也可以作为该属物种的部分鉴别依据。廖晨阳等<sup>[8]</sup>基于形态解剖学特征对当归属植物进行了分类研究, 发现叶柄解剖特征可以作为该属物种进化和系统分类的依据。另外, 姚惠萍<sup>[9]</sup>对当归属药用植物的化学成分进行了系统性的研究综述, 为该属物种的分类鉴定提供了依据。然而, 这些传统的形态鉴别方法主要依赖于专业人员的分类知识和鉴别经验, 而显微鉴别和理化鉴别等方法因受植物生长区域气候、环境和地理条件的限制, 同时受植物生长发育期和储存条件等诸多综合因素的影响, 使得这些方法不能完全准确和快速地鉴定当归属植物。

随着分子生物学技术的快速发展, DNA 条形码的概念被提出并很快应用到生物物种的分子鉴定方面<sup>[10]</sup>。这一技术的发现为药用植物物种的快速鉴定带来新的曙光, 该技术使用一段标准的通用 DNA 条形码序列, 从基因水平上进行物种鉴别, 可以避免药用植物自身的复杂性状和其他外界因素对鉴定结果造成的影响。近几年来, DNA 条形码已成为全球植物分类学新的研究热点方向, 在 *Nature*、*Science*、*PANS*、*PLoS One*、《中草药》等国际国内著名学术刊物上发表了大量的研究报道<sup>[11-17]</sup>。而在 2009 年, 国际生命条形码联盟 (CBOL) 选用 7 个叶绿体 DNA 引物进行实验, 从中确定 *rbcl* 和 *matK* 作为植物物种鉴定的标准条形码<sup>[18]</sup>。2011 年, 中国植物条形码工作组 (China Plant BOL Group) 选用中国种子植物 75 科 1 757 种, 共 6 286 个样品为研

究对象, 分别对叶绿体基因片段 *rbcl*、*matK* 和 *trnH-psbA* 以及核基因 ITS 引物的物种分辨率和序列扩增质量进行比较研究, 发现 ITS 序列的物种分辨率显著高于其他 3 个基因片段, 建议将 ITS 基因纳入种子植物的核心条形码<sup>[19-20]</sup>。

随着 DNA 条形码技术的进一步发展, 这一方法也逐渐应用到当归属药用植物物种的系统进化和分子鉴定研究方面。例如薛华杰等<sup>[21]</sup>选择少量当归属及其近缘属植物, 测定其 ITS 序列, 对当归属药用植物的种间系统发育关系进行了分析, 为当归属的分类提供了一定依据。辛天怡等<sup>[22]</sup>基于 ITS2 条形码序列对当归药材及其混伪品进行鉴定, 构建的 NJ 树能够将当归及其混伪品区分开, 结果表明 ITS2 条形码可作为当归物种有效的鉴别方法。张春等<sup>[23]</sup>通过对当归及其混伪品中药材 ITS 序列的分析, 表明 ITS 序列可作当归药材鉴别的有效分子标记。然而, 以往这些研究主要集中在当归属单一物种当归及其混伪品或者近缘植物物种的中药分子鉴定方面, 或者只是取样当归属一个物种单个体的 DNA 分子序列进行系统发育和种间进化关系研究。本研究将着眼于当归属整个药用植物物种水平, 选取多个当归属物种多个 ITS 的 DNA 分子序列, 基于群体遗传学的方法进行当归属药用植物物种的 DNA 分子鉴定研究, 为该属植物物种的准确和快速鉴定提供理论依据。

## 1 材料

本研究首先在野外采取当归属中青海当归的实验材料, 所有材料由西北大学生命科学学院房敏峰教授鉴定为青海当归 *Angelica nitida* H. Wolff, 凭证标本存放于西北大学植物标本馆。野外采样基本覆盖了该物种整个的自然地理分布区, 材料分别来自青海、四川和甘肃 3 个省区的 5 个采样地点, 每个采样地采集 5 株新鲜健康幼嫩叶片, 立即置于盛有硅胶的密封袋中干燥处理。采样时注意个体和个体之间至少间隔 50 m, 群体之间间隔 50 km 以上。同时, 注意观察每个采样群体的具体生境、土壤和伴生物种等信息, 详细记录每个采样地的海拔和经纬度等信息 (表 1)。

## 2 方法

### 2.1 DNA 提取、PCR 扩增和测序

参考 CTAB 法<sup>[24]</sup>, 对提取方法稍作修改。选取青海当归 5 个群体共 25 份个体提取总 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测所得 DNA 的浓度和纯度。选用 CBOL 推荐的 ITS 序列<sup>[19]</sup>进行扩增, 正向引物 ITS5 为 5'-GGAAGGAGAAGT-

表 1 青海当归的采样信息

Table 1 Sample information of *A. nitida*

采集地	编号	经度	纬度	海拔高度/m
甘肃碌曲	KG1_ZB01072396	E103°04'37.1"	N34°59'30.2"	3 852
青海久治	KO3_ZB01111139	E101°05'59.4"	N33°23'0.1"	4 030
四川红原	KP2_ZB01111140	E102°29'31.3	N32°46'9.1"	3 648
四川阿坝	KN7_ZB01111141	E101°41'20.3"	N32°51'30.3"	3 912
四川阿坝	KM5_ZB01111142	E101°43'50.6"	N32°52'39.8"	3 360

CGTAACAAGG-3', 反向引物 ITS4 为 5'-TCCTCC-GCTTATTGATATGC-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 包含 DNA 模板 20~100 ng, PCR MIX 12.5  $\mu$ L (中国润德公司), 2.5  $\mu$ mol/L 正、反向引物各 0.75  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。反应程序如下: 首先 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 接着 30 个循环: 包括 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s; 然后 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。PCR 扩增产物利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往上海生工生物工程公司, 利用遗传分析仪 ABI 3730 xl 进行测序。

## 2.2 数据分析

测序共得到了青海当归 5 个自然群体 25 份个体的 ITS 序列, 由于同一群体 5 份个体的 ITS 基因型序列完全相同。因此数据分析时, 每个群体只选择一份个体的序列作为代表。同时通过与 GenBank 数据库中的当归属其他物种的 ITS 序列进行对比分析, 最终选择 158 条当归属药用植物物种的 ITS 序列, 共 32 个物种, 一并进行分析 (表 2)。首先对测序获得的原始序列峰图利用软件 Chromas 2.22 进行人工校对。将校对后的实验数据利用软件 Bioedit 7.0.9.0<sup>[25]</sup>进行多序列添加, 使用 MEGA 6.0 软件<sup>[26]</sup>去除所有序列前后两端的低质量区, 只保留共同区段序列, 并基于 Kimura-2-parameter (K2P) 模型计算种内和种间遗传距离, 分别用邻接 (neighbor-joining tree, NJ) 法, 最大似然树 (maximum-likelihood tree, ML) 法和最大简约树 (maximum-parsimony tree, MP) 法构建系统发育树, 并以 Bootstrap 重复 1 000 次, 分析系统发育树各分支的支持率。

## 3 结果

### 3.1 种间和种内遗传距离

序列经比对处理后, 158 条当归属的 ITS 序列总长度为 530 bp, 利用 MEGA 6.0 软件, 基于 K2P

模型计算各物种的种间和种内遗传距离 (图 1)。统计结果显示, 当归属物种间遗传距离的分布范围为 0.29%~12.00%, 其中种间最小遗传距离为 0.29%, 种内遗传距离的分布范围为 0~0.2%, 其中种内最大遗传距离为 0.2%。当归属中各物种种间距离分布大, 种内距离分布小, 且种间最小距离大于种内最大距离, 说明 ITS 序列可以用于当归属药用植物的物种鉴定。

### 3.2 系统发育分析

利用 MEGA 6.0 软件, 分别构建 NJ、ML 和 MP, 结果显示 3 种系统发育树的拓扑结构高度一致 (图 2), 每个物种的 ITS 基因型序列能够较好的聚为对应于该物种本身的分支, 且具有中到高度的支持率, 说明 ITS 序列能将当归属的 32 个物种基本全部区分。例如《中国药典》2010 年版收录的当归与民间药用的其他当归属植物完全分开, 且支持率为 100%, 同时该物种和极细当归具有较近的亲缘关系, 聚为一个较大的分支 (支持率为 99%), 位于系统发育树的最基部, 显示了他们的古老性质。另外, 民间广泛使用的药用植物当归的替代品大叶当归和东当归各自的 ITS 基因型序列也能聚为对应于该物种本身的独立遗传分支。然而, 本研究同时发现, 青海当归的序列没有形成独立的单系分支, 实验中测定的 1 条序列与其他来自 GenBank 数据库中的青海当归的序列聚成一支; 同时, 其余 4 条序列和阿坝当归的 ITS 序列聚为一支, 具有中度的支持率 (59%), 说明这个物种和阿坝当归可能具有较近的亲缘关系。

### 3.3 ITS 条形码分析

ITS 序列经比对排列整齐后, 存在很多变异位点, 这些变异位点可以作为 DNA 分子特征条形码, 为当归属的鉴定提供依据。例如阿坝当归、小叶独活以及日本当归在系统发育树中很明显地聚在不同的分支中, 在其 ITS 序列中寻找各自特有的条形码。

表 2 GenBank 的 ITS 数据  
Table 2 ITS sequences data obtained from GenBank

物种	GenBank 登录号
东当归 <i>A. acutiloba</i>	AB569093, AB697599, AB697600, AB697601, AB697602, DQ278165, AB697591, AB697592, AB697593, AB697594, AB697595, AB697596, AB697597, AB697598, AY548227, AB697603, AB697604, AB697605, AB697606, AB697607, GU395147
阿坝当归 <i>A. apaensis</i>	FJ986045, EU001364, HQ686375, HQ686388, JX022894, JX022895, JX022896, JX022897, JX022898, EU418373, EU418381, GU395150, JN107553
<i>A. arguta</i>	KF619605
<i>A. baizhioides</i>	DQ263588
<i>A. capitellata</i>	KF619735
长鞘当归 <i>A. cartilaginomarginata</i>	JN603207, JN603208, JN603209, GU395177
小叶独活 <i>A. czernaevia</i>	JN603210, JN603211, GU395173
白芷 <i>A. dahurica</i>	AB569095, AJ131292, DQ278167, EU591997, JN603212, JN603213, JN603214, GU395151, GU395152, JX022902, JX022903, JX022904, JX022905, JX022907, JX022908, JX022909, JX022940, EU418374
下延叶古当归 <i>A. decurrens</i>	FJ385033, GU395171
城口当归 <i>A. dielsii</i>	GU395154
毛珠当归 <i>A. genuflexa</i>	DQ263566
朝鲜当归 <i>A. gigas</i>	AJ131290, JN603218, KM051435, DQ263575, DQ263580, GU395156, JX022913
滨当归 <i>A. hirsutiflora</i>	HQ256683
日本当归 <i>A. japonica</i>	DQ278166, AY548214
明日叶 <i>A. keiskei</i>	DQ263561, DQ263562, GU395158
疏叶当归 <i>A. laxifoliata</i>	FJ196890, FJ196891, FJ228466, FJ228468
<i>A. lignescens</i>	HQ202019, HQ202020, HQ202021, HQ202022, HQ202023, HQ202024, HQ202025, HQ202026, HQ202027, HQ202028, HQ202029, HQ202030, HQ202031, JF262140, HQ202015, HQ202016, HQ202017, HQ202018
长序当归 <i>A. longipes</i>	HQ256679
大叶当归 <i>A. megaphylla</i>	DQ263568, EU418377, GU395162, JX022934, JX022935
青海当归 <i>A. nitida</i>	FJ986041, FJ196887, FJ196888, EU418378, FJ228465, FJ228467
峨眉当归 <i>A. omeiensis</i>	DQ26357, DQ263576, GU395164
拐芹 <i>A. polymorpha</i>	JN603224, JN603225, JX022929, GU395165, HQ256680, JN603220, JN603221, JN603222, JN603223
雾灵当归 <i>A. porphyrocaulis</i>	JX022930
<i>A. purpureifolia</i>	AY548229
<i>A. sachalinensis</i>	AF077873, DQ263564
<i>A. shikokiana</i>	AB697610, AB697611
当归 <i>A. sinensis</i>	AF393784, GU289656, GU289657, GU289658, GU395144, JX022936, KF725039, DQ263570, FJ204235, GU289653, GU289654, GU289655
林当归 <i>A. sylvestris</i>	HQ256681
极细当归 <i>A. tenuissima</i>	AF455750, AY548215
天目当归 <i>A. tianmuensis</i>	GU395178, JX022937
秦岭当归 <i>A. tsinlingensis</i>	DQ263572, DQ263577
金山当归 <i>A. valida</i>	DQ263569, GU395169, JX022939

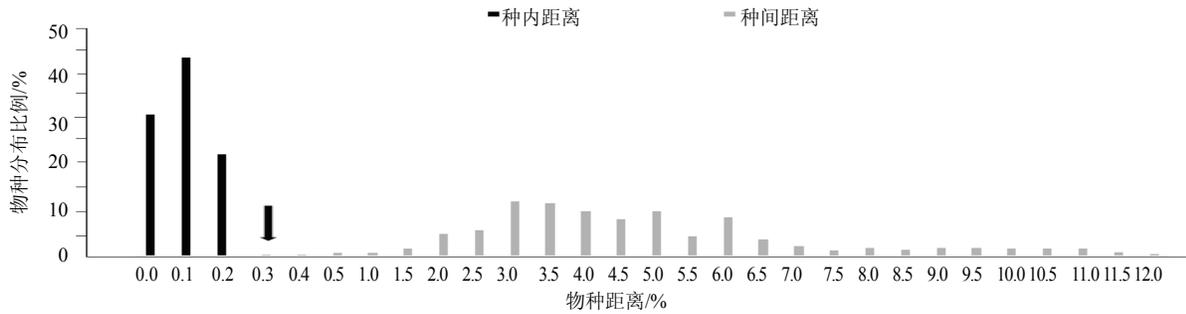


图 1 当归属种间和种内的遗传距离

Fig. 1 Intraspecific and interspecific distances of species in *Angelica* L.

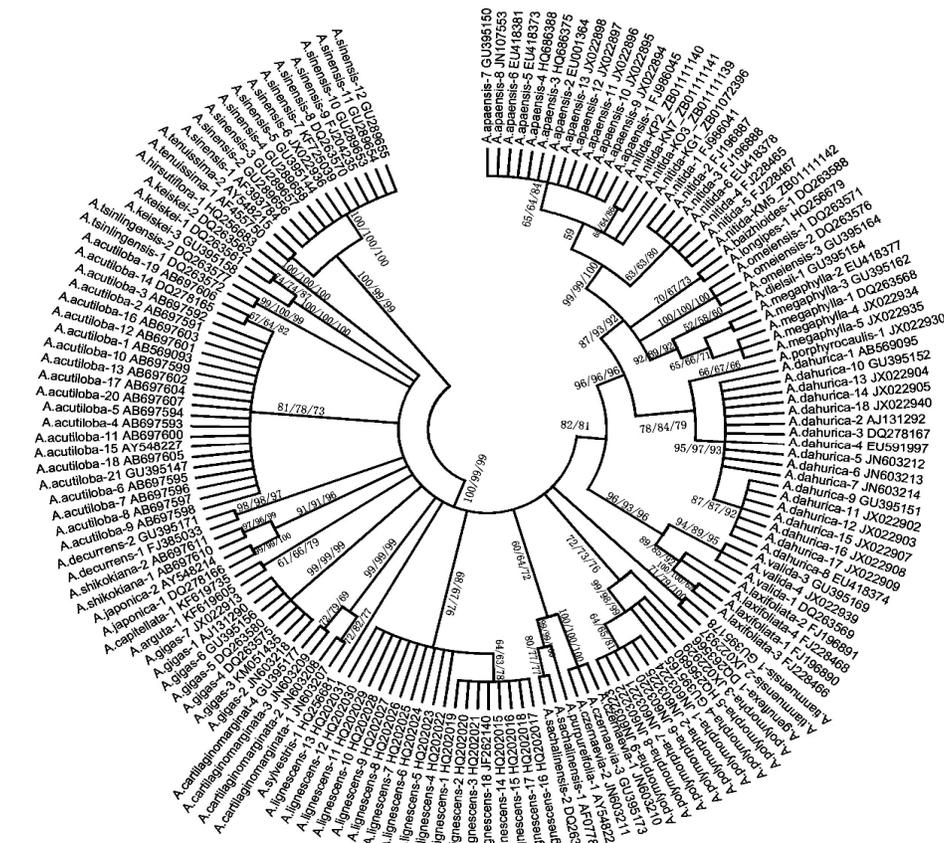


图 2 基于当归属 32 个物种的 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on ITS sequences of 32 species in *Angelica* L.

如图 3, 阿坝当归分别在 43 bp (碱基 A)、56 bp (碱基 T)、62~64 bp (碱基 CCG) 以及 70 bp (碱基 A) 都存在与其他 2 个物种区分的特异性碱基; 小叶独活在 53 bp (碱基 T) 和 60 bp (碱基 T) 处存在 2 个特异性碱基, 而日本当归则在 37~39 bp (碱基 ATC) 处与其他 2 个物种不同。另外, 青海当归和峨眉当归作为当归的替代品和易混品, 也能找到物种各自特有的条形码位点。如图 4, 分别在 109~111 bp、152~154 bp 2 处的 3 个

碱基存在显著的差异, 这 2 个碱基位点可以将这 3 个物种完全区分。除此之外, 在 120 bp(碱基 C)、130 bp (碱基 A) 和 143 bp (碱基 A) 处为当归的特征碱基。此外, 拐芹在东北被当作白芷药用, 而大叶当归经常用作当归。如图 5, 在 336~338 bp 处的 3 个碱基可以鉴别出白芷、大叶当归和拐芹 3 个物种; 并且, 分别在 367 bp (碱基 A) 和 371 bp (碱基 C) 处有大叶当归和拐芹的特有碱基变异点。



图 3 阿坝当归、小叶独活和日本当归的 ITS 序列比对结果

Fig. 3 Sequence alignment of *A. apaisensis*, *A. czernaevia*, and *A. japonica* in ITS region

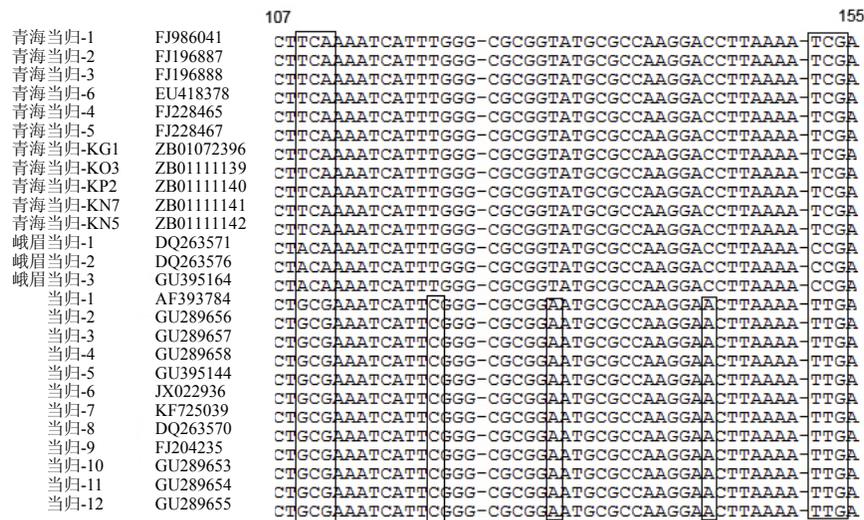
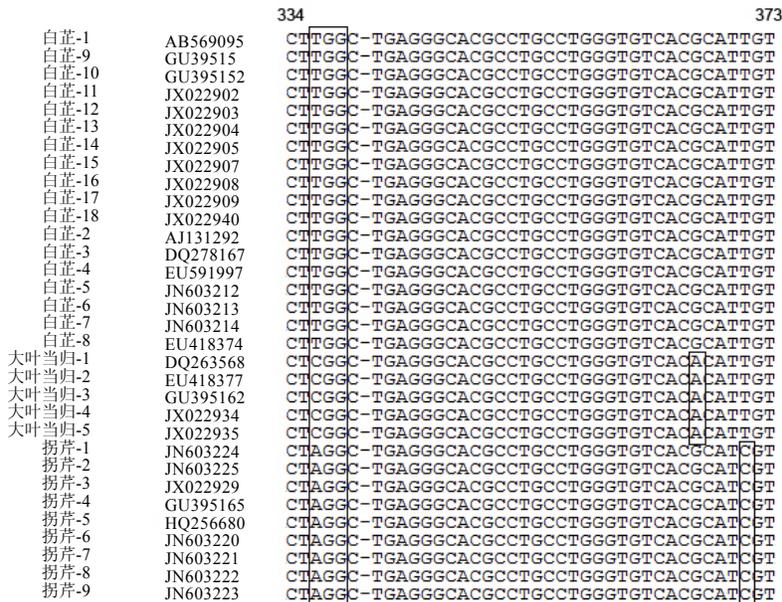


图 4 青海当归、峨眉当归和当归的 ITS 序列比对结果

Fig. 4 Sequence alignment of *A. nitida*, *A. omeiensis*, and *A. sinensis* in ITS region



## 4 讨论

### 4.1 ITS 序列作为条形码在当归属药用植物鉴定中的可行性

ITS 序列由 rDNA 上的 5.8 S、16 S、28 S rRNA 基因序列和 3 个区域之间的内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 组成。一般所用的 ITS 条形码标记则是核糖体 RNA 上的非编码区序列, 这段区域所承受的选择压力较小, 呈中性进化模式, 在物种内序列相对保守, 而种间差异比较明显, 进化速率较快, 因此适合于近缘物种间和种内水平上的分析鉴定<sup>[27]</sup>。近年来, 利用 ITS 序列作为药用植物分子鉴定的研究已广泛报道, 是研究物种间系统进化和近缘种间关系的重要手段。例如张宏意等<sup>[28]</sup>选择不同产地的何首乌药材, 分析和比对其 ITS 序列, 结果证明 ITS 序列能够有效鉴别何首乌的道地药材和其野生种质资源。陶刚等<sup>[29]</sup>选择贵州地区类似钩藤的 4 种药用植物进行 ITS 序列分析, 结果表明所选植物与药用钩藤属有很近的亲缘关系, 为药用钩藤寻找到了有效的替代品。而张晓南等<sup>[30]</sup>通过比较黄草乌及其混滑品的 ITS 序列, 发现了大量的物种特异性变异位点, 可以作为药材混伪品鉴别的重要依据。彭禄等<sup>[31]</sup>选择同样是当归属的独活为研究对象, 涉及 2 科 5 属 17 个种共 26 个居群的独活样品材料, 进行 ITS 序列分析, 综合构建系统发育树和单倍型式样进行分析, 得出 ITS 序列可以鉴定独活物种。本研究中, 基于当归属 32 种植物的 ITS 条形码序列, 利用 NJ、ML 和 MP 法分别构建该属物种的系统发育树, 结果显示, 不同建树方法得到了高度一致的拓扑结构, 而且每种植物的 ITS 基因型序列基本能够聚为一个对应于该物种本身的独立遗传分支, 说明 ITS 序列可以很好地鉴别当归属植物物种。同时, 研究发现了当归属物种在 ITS 区域存在大量的物种特异性变异位点, 也可以作为该属物种鉴别的特异性位点。

### 4.2 ITS 条形码鉴定当归属药用植物的可靠性

通过对当归属 32 个物种共 158 条的 ITS 序列进行分析, 结果说明基于群体遗传学的方法, 利用 ITS 序列来鉴定当归属药用植物是可行的。构建的系统发育树将所选的 32 个当归属物种成功区分, 并存在中到高度水平的支持率。其中当归和极细当归聚在一起, 和其他物种能够明显区分, 通过对比这 2 个物种的 ITS 序列, 发现当归在多处有特异性碱基位点变异, 如在 82~84 bp 的碱基为 TAC, 109~111 bp

为 GTA, 399~401 bp 为 TGA, 468~470 bp 为 TCT 等, 这些位点均可与极细当归进行区分。而在阿坝当归和青海当归形成的分支中, 来自于 GenBank 数据库的青海当归序列和通过实验得到的序列 (KM5\_ZB0111142) 形成一个分支, 而另外 4 条序列形成了一个分支, 出现这个结果的原因可能是青海当归种内序列出现了遗传变异或分化。对比青海当归的 ITS 序列, 发现青海当归存在 3 个种内变异位点, 分别在 31、334、444 bp, 而实验序列 (KM5\_ZB0111142) 与数据库下载的青海当归 ITS 序列完全一致。进一步分析系统发育树表明, 青海当归和阿坝当归聚为一支, 说明 2 物种间具有较近的亲缘关系, 推测 2 物种间可能存在着基因渐渗 (introgression) 或杂交现象。野外调查也显示, 这两个物种的自然地理分布区域存在着明显重叠现象, 而且物种间具有大量的中间过渡形态, 暗示这 2 个物种之间可能存在近期的基因流或渐渗。

一般来说, 作为 DNA 条形码标记, 要求种间遗传距离大于种内距离, 只有种间差异尽可能的大, 而种内差异尽可能的小, 才能保证可以尽量不受种内变异的影响, 进一步更准确的鉴别物种之间的关系。本研究通过对当归属种内和种间遗传距离的计算, 发现当归属的种间距离明显大于种内距离。虽然有些物种出现了种内变异, 但是通过对比 ITS 序列, 发现种间的变异位点可以很好地将所选的当归属物种区分开, 例如阿坝当归和青海当归有 2 处变异位点, 即 31 bp (G-T) 和 187 bp (T-C) 可以将这 2 个种鉴定开来; 长序当归、峨眉当归、城口当归和大叶当归共有 14 处变异位点, 可以将这聚在一支的 4 个种区分开来; 东当归、秦岭当归、明日叶和滨当归共有 21 个变异位点, 可以将这 4 个种区分开来。

通过对当归属 ITS 序列的分析研究以及系统发育分析结果, 说明以 ITS 序列作为 DNA 分子条形码, 可以准确地对当归属药用植物进行区分和鉴定, 为进一步利用当归属药用植物资源提供了重要科学依据。

### 参考文献

- [1] 陈书坤, 李恒, 陈邦余. 中国植物志 (第 55 卷, 第 3 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 晋玲, 吴迪, 崔治家, 等. 当归药材资源种类及分布研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2013(1): 74-77.

- [4] 马瑞君, 王 钦, 陈学林, 等. 当归的研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33(3): 280-282.
- [5] 潘泽惠, 庄体德, 姚欣梅, 等. 当归属及近缘小属的核型演化及地理分布研究 [J]. 植物分类学报, 1994, 32(5): 419-424.
- [6] 张桥英, 何兴金. 四川当归属植物资源及其开发利用 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(1): 17-19.
- [7] 冯 图, 刘 爽, 何兴金. 西南地区当归属植物叶表皮微形态研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2009, 46(6): 1798-1804.
- [8] 廖晨阳, 何兴金, 马祥光. 中国广义当归属及其相关类群的叶柄结构研究 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(1): 90-98.
- [9] 姚惠萍. 当归属药用植物化学成分研究概况 [J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(2): 56-58.
- [10] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Royal Soc London B: Biol Sci*, 2003, 270(Suppl): S96-S99.
- [11] Gregory T R. DNA barcoding does not compete with taxonomy [J]. *Nature*, 2005, 434(7037): 1067.
- [12] 陈士林, 宋经元, 姚 辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.
- [13] 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): 1393-1396.
- [14] 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(1): e8613.
- [15] 李 栎, 肖 憬, 苏振宇, 等. ITS2 条形码序列对茜草科藜药植物的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1814-1818.
- [16] Gao T, Yao H, Song J, *et al.* Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10(1): 324-329.
- [17] 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.
- [18] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [19] Li D Z, Gao L M, Li H T, *et al.* 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*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [20] Hollingsworth P M. Refining the DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19451-19452.
- [21] 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.
- [22] 辛天怡, 姚 辉, 韩建萍, 等. 当归药材及其混伪品 ITS2 条形码鉴定 [J]. 科研信息化技术与应用, 2013, 4(3): 76-82.
- [23] 张 春, 王晓丽, 朱 焯, 等. 中药当归及其混伪品的 rDNA ITS 序列分析与鉴别 [J]. 四川农业大学学报, 2011, 29(2): 218-224.
- [24] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [25] Hall T A. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98.
- [26] Sudhir K, Masatoshi N, Joel D, *et al.* MEGA: Abiologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequence [J]. *Brief Bioinf*, 2008, 9(4): 299-306.
- [27] 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, 41(3): 491-495.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 张晓南, 杜春华, 付德欢, 等. 黄草乌及其混淆品 ITS 序列的分析鉴别 [J]. 中药材, 2012, 35(9): 1410-1413.
- [31] 彭 禄, 余 岩, 王志新, 等. 基于 ITS 序列对独活 17 个种的分子鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1648-1653.