

三斑海马及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定研究

陈 梦¹, 朱玲燕¹, 黄 真¹, 葛宇清², 张光霁¹, 程汝滨^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310006

摘 要: 目的 建立三斑海马 *Hippocampus trimaculatus* 的 COI、16 S rRNA 和 ATP6 的条形码序列数据库, 应用 DNA 条形码技术从分子水平快速准确鉴定三斑海马和其他正伪品海马, 探讨海马属药材鉴定的新方法。方法 提取三斑海马药材的基因组 DNA, PCR 扩增 COI、16 S rRNA 和 ATP6 的序列并进行双向测序, 所得序列采用软件 Codon Code Aligner V4.2 对测序峰图进行校对拼接, 应用 Clustal X 软件进行序列比对, MEGA 5.0 软件计算三斑海马的种内种间遗传距离 (Kimura 2-Parameter, K2P), 构建邻接树 (Neighbor-joining tree, NJ Tree) 聚类分析不同品种海马药材的鉴定结果。结果 获得的三斑海马线粒体 COI、16 S rRNA、ATP6 序列长度分别 649、572、603~605 bp, 其中 3 个条形码序列的种内变异位点碱基数分别为 8、4 和 15, 种内的变异率较小, COI、16 S rRNA、ATP6 序列的平均种内 K2P 遗传距离 0.002、0.001 和 0.006, 均远小于三斑海马的种间 K2P 距离; NJ 树结果显示三斑海马与其他海马均可明显区分, 具有良好的单系性。结论 COI、16 S rRNA、ATP6 序列作为条形码均可以鉴定三斑海马及其他混伪品海马药材, 为动物类药材及其混伪品和近源物种的分子鉴定提供依据, 为对保障海马临床用药安全提供了新的技术手段。

关键词: 三斑海马; COI; 16 S rRNA; ATP6; 分子鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5554-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.025

Molecular identification of *Hippocampus trimaculatus* and its adulterants based on DNA barcoding

CHEN Meng¹, ZHU Ling-yan¹, HUANG Zhen¹, GE Yu-qing², ZHANG Guang-ji¹, CHENG Ru-bin¹

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. The First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China

Abstract: Objective The aim of present study was to establish a DNA barcoding database of COI, 16 S rRNA and ATP6 sequences from *Hippocampus trimaculatus* and identify *H. trimaculatus* and other adulterants quickly and accurately. **Methods** Total genomic DNA was isolated using the muscle tissue from tail of *H. trimaculatus*. The DNA barcoding genes of COI, 16 S, and ATP6 sequences were amplified by universal primers and PCR products were sequenced from both directions. Sequences assembly and consensus sequence generation were performed using the Codon Code Aligner V4.2. Sequence alignment was performed by using Clustal X software. The Kimura 2-Parameter (K2P) distances were calculated using the MEGA5.0. Identification analyses were performed using neighbor-joining (NJ) methods. **Results** The length of the measured sequences of mitochondrial COI, 16 S, and ATP6 were 649 572 and 603—605 bp, respectively. The number of intraspecific variation sites of three genes was 8 bp, 4 bp, and 15 bp, respectively. The average intraspecific K2P genetic distance of COI, 16 S, and ATP6 were 0.002, 0.001, and 0.006. The genetic variation among *H. trimaculatus* was obviously less than the interspecific genetic variation. The NJ tree showed that *H. trimaculatus* could be distinguished obviously from other *Hippocampus* species, which showed high monophyly. **Conclusion** Our results indicated that COI, 16 S, and ATP6 sequences are effective DNA barcodes for the identification of *H. trimaculatus* species and its adulterants, with view to providing the basis data for molecular identification of animal medicinal materials, adulterants and near-source species, and contributing to the clinical medication safety of *H. trimaculatus*.

Key words: *Hippocampus trimaculatus* Leach; COI; 16 S rRNA; ATP6; molecular identification

收稿日期: 2019-04-03

基金项目: 国家中医药管理局公益性行业科研专项经费项目 (201507002-4-4); 浙江省新苗人才计划项目 (752214F00803)

作者简介: 陈 梦, 硕士研究生, 研究方向生药学。Tel: 15990120326

*通信作者 程汝滨 E-mail: biothcheng@hotmail.com

《中国药典》2015 年版记录并收载 5 个品种的海马药材：三斑海马 *Hippocampus trimaculatus* Leach、线纹海马 *Hippocampus kelloggi* Jorden et Snyder、大海马 *Hippocampus kuda* Bleeker、刺海马 *Hippocampus histrix* Kaup 和小海马（海蛆）*Hippocampus japonicus* Kaup 的干燥体，有散结消肿、温肾壮阳等功效^[1-2]。三斑海马（俗名龙落子），隶属我国国家二级保护动物，通常栖息在 1~100 公尺左右的具海藻床的礁石区中，也可生长在河海交界处，喜食活饵，糠虾、毛虾、磷虾、莹虾等小型浮游甲壳动物是其主要食物来源，其体色艳丽，无毒，具有良好的观赏价值^[3]。三斑海马产仔多，生长最快，为人工养殖的优良品种，其幼体常常作为小海马的伪品出售。三斑海马身上的第 1、4 及第 7 体环背侧各具一明显黑斑，是其最显而易见的形态特征，部分三斑海马的大小及生活环境不同，可能不具有此特征，而其他体征与其他海马之间差别微小。因此，仅凭其外观形态，很难对市售正品三斑海马的品质进行判断。近年来由于资源的破坏和市场需求的增加，海马药材的药源紧缺，市场上海马药材掺伪现象严重，致使其质量良莠不齐，海马的真伪鉴别工作变得愈加重要。

分子鉴定技术作为中药材传统鉴别方法的有益补充，具有准确性高、重复性好和经验要求低的特点，近年来在中药材鉴定领域得到了长足的进步和发展，其中 DNA 条形码技术作为生物鉴定技术的最新发展，在中药鉴定领域受到了广泛关注与应用^[4]。COI 基因是线粒体 DNA 上的一段蛋白质编码基因，在多数动物类群中，COI 基因都存在显著的序列变异，其进化速率较快，可用于分析和鉴定亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的关系，在药材鉴定和非药用动物的研究中应用广泛^[5]。张辉等^[6]选取《中国药典》中的麝香、蛤蚧、海龙及海马等 45 个动物药材，通过分析样品 COI 序列的种内种间变异情况、barcoding gap 和鉴定效率，考察了 COI 序列鉴定动物药材的有效性和准确性，研究结果表明 COI 序列作为 DNA 条形码适用于药典中动物药材的鉴定。16 S rRNA 基因是线粒体上的小核糖体 RNA，既含有高度保守的序列区域，又有中度保守和高度变化的序列区域，已成为广泛应用于水生动物群体遗传多样性和系统进化分析研究的分子标记^[7]。张瑛妮等^[8]扩增了北部湾北部 28 种水螅水母的线粒体 16 S rRNA 序列，基于 16 S 基因片

段构建的 NJ 树显示，单种所有个体都位于同一独立分枝，结果表明，以 16 S rRNA 作为 DNA 条形码能对北部湾北部常见水螅水母类进行物种鉴定。ATP6 基因全称为 ATP 合成酶 F0 亚单位 6 基因，具有较低的变异碱基数和较丰富的信息内容，在分子鉴定中，ATP6 基因可作为其他基因的补充^[9-10]。本研究运用 DNA 条形码技术，以 COI、16 S rRNA、ATP6 序列对三斑海马和常见的真伪品进行 DNA 条形码鉴定，分析其正品药材来源及混伪品间的种间变异情况，比较不同条形码在三斑海马混伪品分子鉴定中的优缺点，为三斑海马提供分子水平的鉴定和分类依据，以保证三斑海马药材在临床用药的准确性与药效性，为规范海马市场、建立海马药材的质量标准提供新的技术手段。

1 材料与仪器

1.1 材料

本实验共收集海马药材样品 13 份，分别购自浙江磐安以及安徽亳州药材市场，包括三斑海马样品 12 份，宝珈海龙样品 1 份，经浙江中医药大学第一临床医学院葛宇清副研究员鉴定为三斑海马 *Hippocampus trimaculatus* Leach 和宝珈海龙 *Doryichthys boaja* Bleeker。将所用样品做好标记，于干燥封口袋中避光保存，样品保存于浙江中医药大学药学院。同时在 GenBank 数据库中下载 20 条 COI、16 S 和 ATP6 序列（线纹海马 *H. kelloggi* Jorden et Snyder 3 条，大海马 *H. kuda* Bleeker 2 条，小海马 *H. mohnikei* Bleeker 3 条，刺海马 *H. histrix* Kaup 2 条，太平洋海马 *H. ingens* Girard 2 条，直立海马 *H. erectus* Perry 2 条，虎尾海马 *H. comes* Cantor 2 条，棘海马 *H. spinosissimus* Weber 3 条，拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* Bloch 1 条），样本来源及其 DNA 条形码序列信息见表 1 和 2。

1.2 试剂

无水乙醇（上海凌峰化学试剂有限公司）；海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司）；琼脂糖粉（BIOWEST）；50×TAE 缓冲液[生工生物工程（上海）股份有限公司]；DL2000 DNA Marker（TaRaKa 公司）；6×Loading Buffer（TaRaKa 公司，）；4S Green 染料（BBI Life Sciences）；10×PCR buffer（TaRaKa 公司）；dNTP Mix（TaRaKa 公司）；rTaq 酶（TaRaKa 公司）；COI、16 S rRNA 和 ATP 引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

表 1 材料来源及条形码序列信息

Table 1 Habitats of samples used in present study and theirs sequence information

编号	名称	COI			16 S rRNA			ATP6			收集地
		单倍型	长度/bp	GC/%	单倍型	长度/bp	GC/%	单倍型	长度/bp	GC/%	
1	三斑海马	A1	649	40.06	A'1	572	41.96	A''1	603	36.82	安徽亳州
2	三斑海马	A1	649	40.06	A'2	572	42.13	A''2	603	37.15	安徽亳州
3	三斑海马	A2	649	39.91	A'1	572	41.96	A''3	603	36.98	安徽亳州
4	三斑海马	A3	649	40.22	A'1	572	41.96	A''4	603	36.32	安徽亳州
5	三斑海马	A4	648	40.28	A'1	572	41.96	A''5	603	36.82	安徽亳州
6	三斑海马	A5	650	40.31	A'1	572	41.96	A''6	603	36.82	安徽亳州
7	三斑海马	A6	649	40.52	A'3	572	42.13	A''7	603	37.15	浙江磐安
8	三斑海马	A4	649	40.22	A'4	572	41.96	A''8	605	36.69	浙江磐安
9	三斑海马	A4	649	40.22	A'1	572	41.96	A''9	603	36.65	浙江磐安
10	三斑海马	A7	649	40.37	A'4	572	41.96	A''10	603	36.82	浙江磐安
11	三斑海马	A1	649	40.06	A'1	572	41.96	A''9	603	36.65	浙江磐安
12	三斑海马	A1	649	40.06	A'5	572	41.78	A''11	603	36.82	浙江磐安
13	线纹海马	B1	649	40.68	B'1	578	43.77	B''1	603	34.99	GenBank
14	线纹海马	B2	648	40.43	B'2	578	43.60	B''2	603	35.32	GenBank
15	线纹海马	B2	648	40.43	B'1	578	43.77	B''1	603	34.99	GenBank
16	大海马	C1	648	40.90	C'1	575	43.48	C''1	603	36.98	GenBank
17	大海马	C2	648	40.74	C'2	575	43.30	C''1	603	36.98	GenBank
18	小海马	D1	649	40.37	D'1	573	43.11	C''2	603	36.15	GenBank
19	小海马	D1	649	40.37	D'1	573	43.11	D''1	603	36.15	GenBank
20	小海马	D1	649	40.37	D'1	573	43.11	D''2	603	36.48	GenBank
21	刺海马	E1	649	40.37	E'1	574	42.68	E''1	603	37.98	GenBank
22	刺海马	E1	649	40.37	E'1	574	42.68	E''1	603	37.98	GenBank
23	太平洋海马	F1	649	40.68	F'1	575	43.30	F''1	603	36.15	GenBank
24	太平洋海马	F1	649	40.68	F'2	576	43.23	F''1	603	36.15	GenBank
25	直立海马	G1	649	42.68	G'1	577	42.63	G''1	603	39.64	GenBank
26	直立海马	G2	649	42.84	G'2	577	42.46	G''1	603	39.64	GenBank
27	虎尾海马	H1	649	39.60	H'1	574	42.86	H''1	603	36.48	GenBank
28	虎尾海马	H2	648	39.66	H'1	574	42.86	H''1	603	36.48	GenBank
29	棘海马	I1	649	40.22	I'1	578	42.39	I''1	603	35.32	GenBank
30	棘海马	I2	649	40.06	I'1	578	42.39	I''1	603	35.32	GenBank
31	棘海马	I3	649	39.91	I'2	578	42.56	I''1	603	35.32	GenBank
32	拟海龙	J1	649	46.22	J'1	571	44.83	J''1	604	39.90	GenBank
33	宝珈海龙	K1	649	39.60	K'1	571	44.66	K''1	604	38.08	河北安国

表 2 样品 DNA 条形码序列信息
Table 2 Sequences of DNA barcoding of samples

物种	GenBank 序列号		
	COI	16 S rRNA	ATP6
三斑海马	MH346182~346193	MH346170~346181	MH346194~346205
线纹海马	KT878879.1	KT878879.1	KT878879.1
	MF123923.1	MH279623.1	KF703755.1
	GQ502150.1	MH279624.1	NC_029349.1
大海马	FJ176577.1	AP005985.1	AP005985.1
	FJ541046.1	DQ452301.1	NC_010272.1
小海马	KY798142.1	KY798142.1	KY798142.1
	KF557651.1	KF557651.1	KF557651.1
	KT780446.1	KT780446.1	KT780446.1
刺海马	AP013027.1	AP013027.1	AP013027.1
	NC_021454.1	NC_021454.1	NC_021454.1
太平洋海马	KF680453.1	KF680453.1	KF680453.1
直立海马	KC851895.1	KY065553.1	NC_024530.1
	KC851878.1	KF557652.1	KF557652.1
	KC851880.1	NC_022722.1	NC_022722.1
虎尾海马	JX970973.1	JX970973.1	JX970973.1
	GQ502135.1	NC_020336.1	NC_020336.1
棘海马	KT878878.1	KT878878.1	KT878878.1
	KT592058.1	MH282495.1	KJ123693.1
	KT592067.1	MH282494.1	NC_029350.1
拟海龙	MG728097.1	MG728097.1	MG728097.1
宝珈海龙	MH259592	MH259592	MH259592

1.3 主要仪器设备

电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; 电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司); 超微量分光光度计(美国 Thermo 公司); 鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 微波炉(格兰仕微波生活电器有限公司); S1000TM Thermal Cycler(美国 Bio-rad 公司); 凝胶电泳仪(美国 Bio-rad 公司); 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司); 离心机(杭州宝诚生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 DNA 提取

取三斑海马样品, 用 75%酒精擦洗尾部, 剪取尾部组织碎片 5 mg 置于 EP 管中, 样本的基因组总 DNA 均用 DNA 提取试剂盒(Takara 公司)提取, 提取方法参照试剂盒说明书。用超微量分光光度计检测样本 DNA 的纯度和浓度。将提取好的样品置

于-20 °C 保存。

2.2 PCR 扩增及测序

COI 基因片段、16 S 基因片段、ATP6 基因片段均采用相同反应体系: 总反应体系为 50 μL, 超纯水 35 μL, 10×PCR buffer 5 μL, rTaq 酶 0.5 μL, dNTP Mix 5 μL, 上游引物(F) 1 μL, 下游引物(R) 1 μL, 模板 DNA 2.5 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 48~53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 32~35 个循环; 72 °C 延伸 15 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统(Genegenus 公司)上检测、成像。采用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化回收, 纯化后的 PCR 产物由上海桑尼生物科技有限公司进行测序, 使用 ABI-3730 自动测序仪对各样品的 PCR 产物进行双向测序, 以保证测序结果的准确性, 所用引物和 PCR 引物相同。扩增和测序所用的 PCR 引物序列见表 3。

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequences

通用引物名称	方向	序列 (5'→3')	IUB 标准兼并碱基缩写
COI	正向	TTCTCAACTAATCACAAAGACATCGGCA	R=(A/G)
	反向	ACTTCAGGRTGTCCRAAGAATCAGAATAAG	H=(A/C/T)
16 S	正向	CGCCTGTTTAHYAAAAACAT	Y=(C/T)
	反向	CCGGTCTGAACTCAGMTCA YGT	M=(A/C)
ATP	正向	CAACCCCTTGAACTGACAATGACA	
	反向	GCTTGRATTATAGCAACGGCTACTTC	R=(A/G)

2.3 数据处理与序列分析

将测序成功的序列进行 BLAST 检索, 确定序列方向。若序列为反向序列, 用 Bio Edit 软件进行人工正向校正。除去其上下游引物序列, 用 Clustal W 进行序列比对, 两两产生同源性, 序列结果已提交 GenBank 数据库, 登录号见表 2, 利用 MEGA 5.0 软件计算所得所测序列的碱基组成和长度, 基于 K2P 双参数模型计算并分析变异位点和信息位点的比率、种内及种间遗传距离; 通过邻接法构建系统进化树 (NJ 树) [11-13]。

3 结果与分析

3.1 性状特征鉴别

三斑海马干燥体形态见图 1。三斑海马具体形态特征: 体长 10~17 cm。背鳍 20~21, 胸鳍 17~18。头冠短小、尖锐, 顶端有 5 个短小突棘。吻部突起, 吻管较短, 不及头长的 1/2, 背部结节呈隆

起状脊, 背侧方棘亦较其他种为大。体黄褐色或黑褐色。体侧背部第 1、4、7 节小棘基部有 3 个大黑斑, 但常消失不见。弯钩状颊刺为三斑海马的明显特征。



图 1 三斑海马干燥体形态

Fig. 1 Morphological character of *H. trimaculatus*

表 4 三斑海马扩增序列分析信息

Table 4 Analysis of sequence of *H. trimaculatus*

序列名称	保守位点/bp	变异位点/bp	信息位点/bp	转换	颠倒	变异率/%
COI	641	8	1	2	0	1.233
16 S	568	4	1	0	0	0.699
ATP6	588	15	6	3	1	2.487

3.2 条形码序列分析

本研究对三斑海马样品的 COI、16 S rRNA、ATP6 基因进行了 PCR 扩增及测序, 采用 Mega 5.0 软件对三斑海马基因序列 GC 含量, 碱基变异位点、信息位点和转换/颠换等进行分析, 序列分析结果见表 4。其中 COI 序列全长为 649 bp, GC 平均含量为 40.13%。16 S 序列长度为 572 bp, GC 平均含量为 41.97%。ATP6 序列全长变化范围为 603 bp, GC 平均含量为 36.81%。对三斑海马的 COI、16 S rRNA 和 ATP6 序列的单倍型数目和变异位点分

析发现, 不同的条形码序列存在丰富的单倍型多样性和变异率, 其中三斑海马 COI 序列存在 7 种单倍型, 16 S rRNA 序列存在 5 种单倍型, ATP6 序列存在 11 种单倍型, 提示 ATP6 序列在三斑海马种内存在较大的遗传多样性, 可用于后续的地理和群体遗传学研究。COI 序列和 ATP6 序列的变异位点百分比分别为 1.233% 和 2.487%, 而 16 S rRNA 序列的变异位点最少, 其百分比为 0.699%。COI 序列的转换值为 2, 不存在颠倒现象; 16 S rRNA 序列不存在转换和颠倒现象;

ATP6 转换值和颠倒值分别为 3 和 1。

3.3 三斑海马及其易混品不同序列遗传距离分析

通过对三斑海马及其混伪品不同序列遗传距离分析结果表明,海马种内 COI、16 S rRNA 及 ATP6 序列遗传距离从 0 到 0.012 不等,三斑海马种内 16 S rRNA 序列遗传距离最小,遗传距离变化范围最大的为 ATP6 序列,结果见图 2。三斑海马与 4 种正品海马(线纹海马、刺海马、大海马、小海马)和 4 种伪品海马(太平洋海马、虎尾海马、棘海马、直立海马)不同序列遗传距离变化范围均大于三斑海马种内序列遗传距离。

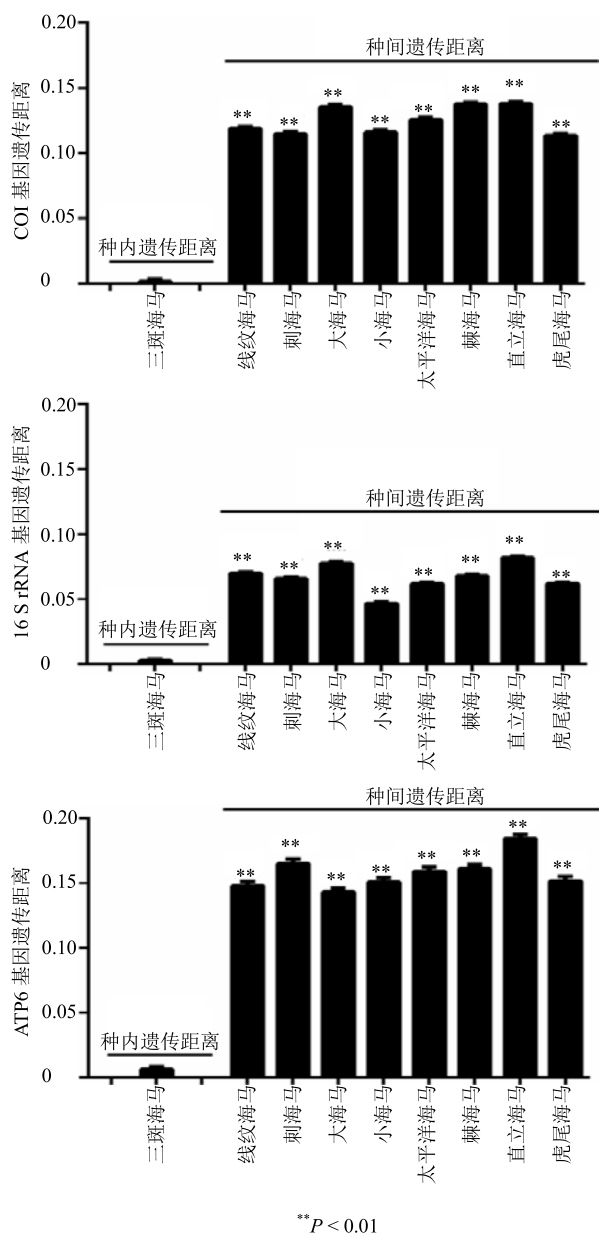


图 2 三斑海马及其混伪品不同序列遗传距离分析

Fig. 2 Intraspecific and interspecific genetic distances in different sequences of *H. trimaculatus* and its adulterants

基于 COI 序列对三斑海马的种内变异速率结果,分析发现其种内遗传距离变幅为 0.000~0.008,平均种内遗传距离为 0.002,将其与其他 4 种正品海马(线纹海马、大海马、小海马、刺海马)和 4 种伪品海马(太平洋海马、虎尾海马、棘海马、直立海马)的 COI 序列比较,三斑海马与其他 8 种海马的种间遗传距离在 0.112~0.141,与虎尾海马和刺海马的种间遗传距离最小,分别为 0.113 和 0.114,与直立海马的种间遗传距离最大,为 0.138,最小种间遗传距离远大于最大种内遗传距离,存在显著的条形码间隙。16 S rRNA 序列和 ATP6 序列分析表明,三斑海马的最大种内遗传距离显著小于最小的种间遗传距离,其中 16 S rRNA 序列的三斑海马最大的种内遗传距离和最小种间遗传距离分别是 0.004 和 0.047(小海马),ATP 序列三斑海马最大的种内遗传距离和最小种间遗传距离分别是 0.012 和 0.138(大海马),其中基于 16 S rRNA 序列和 ATP 序列的三斑海马最小种间遗传距离分别是其最大种内遗传距离的 11.75 倍和 11.5 倍,不存在条形码重叠部分,可用于准确区分三斑海马与其他海马品种。基于 COI 序列、16 S rRNA 序列和 ATP6 序列的平均种间遗传距离分别为 0.125、0.067 和 0.158,提示 ATP6 基因在不同海马品种间的进化速率最快,而 16 S rRNA 基因在海马不同品种间的进化速率最慢。

3.4 三斑海马及其混伪品 NJ 树聚类分析

为进一步明确不同 DNA 条形码序列对三斑海马样品鉴别的准确度,利用 12 个三斑海马样品的 COI、16 S rRNA 和 ATP6 序列和其他 8 种正伪品海马样品与海龙样品的相应条形码序列,通过邻接法构建 NJ 树进行聚类分析。其中正伪品海马样品与海龙样品包括 4 种正品、2 种伪品海马和两种海龙样品(正品海马:线纹海马、大海马、小海马、刺海马;伪品海马:棘海马、太平洋海马、虎尾海马;海龙:宝伽海龙、拟海龙)的序列(表 2),结果见图 3。

在图 3-A 中,由 COI 序列扩增所得的三斑海马 12 个样品聚集成一个大分支,其分支支持率为 99%,明显与其他 8 种海马和 2 种海龙区分开。三斑海马与刺海马和虎尾海马聚集成一支,其 Bootstrap 值仅为 20,该结果提示三斑海马与 2 种海马之间的亲缘关系较近,但其 NJ 树结构不稳定,其可信度较差。此外,在 COI 序列的 NJ 进化树中,直立海马、大海马、线纹海马、太平洋海马和棘海马聚为一支,小海马单独聚为一支,其 Bootstrap

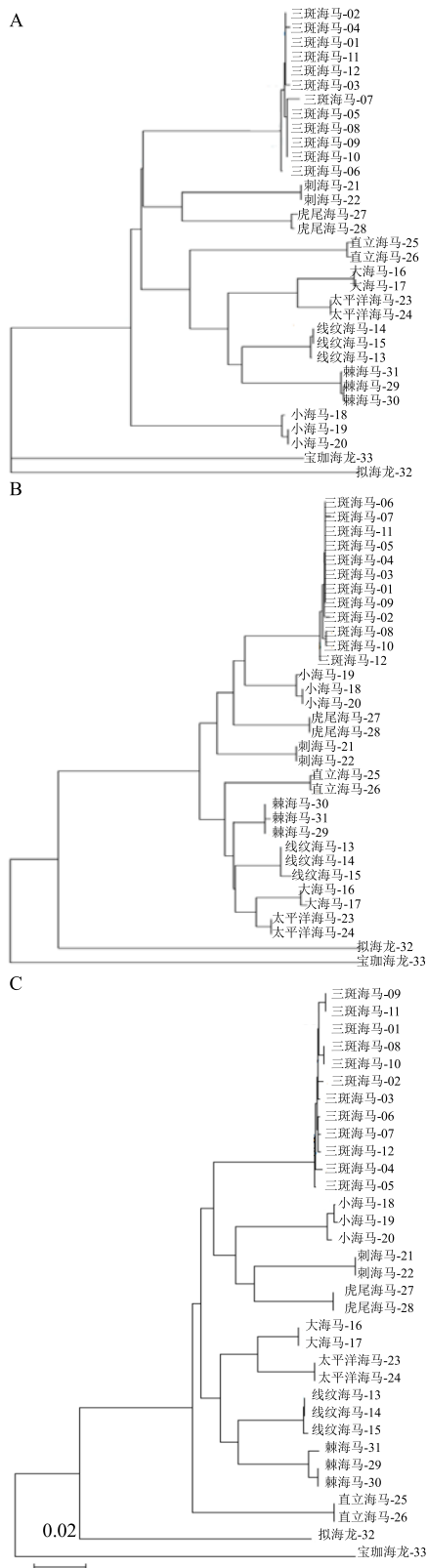


图3 基于 COI (A)、16 S rRNA (B)、ATP6 (C) 序列构建的三斑海马及其易混品 NJ 树

Fig. 3 NJ tree of *H. trimaculatus* and its adulterants based on COI (A), 16 S rRNA (B), and ATP6 (C) sequences

值分别为 94 和 42, 该结果说明小海马单独聚为一支的可信度较低, 其 NJ 树结构随着条形码序列的不同可能会发生改变。如图 3-B 和图 3-C 中所示, 16 S rRNA 序列和 ATP6 序列所构建的 NJ 进化树中, 三斑海马 12 个样品聚集成一个大的分支, 其分支支持率分别为 99% 和 100%, 均能明显能与其他海马分开, 且与其他海马类群品种区分的 Bootstrap 值分别为 99 和 72, 说明 NJ 树结构稳定, 分子鉴定的准确度高。与 COI 序列的 NJ 树结构不用, 在 16 S rRNA 序列和 ATP6 序列所构建的 NJ 树中, 三斑海马、小海马、刺海马和虎尾海马聚为一群。所不同的是, 在 16 S rRNA 序列构建的 NJ 树种, 三斑海马与小海马先聚为一群后, 分别与虎尾海马和刺海马聚为一群; 在 ATP6 序列构建的 NJ 树种, 虎尾海马与刺海马聚为一群后, 再与小海马聚为一群, 最后与三斑海马聚为一群。综合考虑 NJ 树结构和条形码扩增效率, COI 基因最适合作为三斑海马种类区分的条形码, 16 S rRNA 基因和 ATP6 基因可以作为海马药材 DNA 条形码鉴定的有效补充, ATP6 基因因其在三斑海马种内丰富的单倍型数量和变异位点, 可作为分子标记物用于三斑海马的种群遗传多样性及系统地理进化研究。

4 讨论

本实验对三斑海马的性状鉴别特征和分子鉴定条形码进行了系统研究, 明确了三斑海马与其他常见混伪品海马样品间的最显著鉴别特征, 对 COI、16 S rRNA 和 ATP6 序列在三斑海马种内种间的变异率、遗传距离和 NJ 树聚类进行了分析, 明确了不同 DNA 条形码在三斑海马分子鉴定种的优势与不足, 为三斑海马快速准确鉴定技术的开发奠定了基础。本研究三斑海马的 16 S rRNA 序列 GC 含量最高, 达 42.13%, ATP 6 序列 GC 含量最低, 为 36.32%。基于 COI、16 S rRNA 和 ATP6 序列对 36 个三斑海马序列进行分析, 发现其 A 和 T 碱基含量大于 C 和 G 碱基含量, 所有序列碱基 G 含量最低。说明三斑海马序列中碱基含量偏重于 A 和 T, 不偏重碱基 G 和 C, 与温琬莲等的研究结果类似^[14], 海马线粒体基因组富含 A 和 T, 可能是因为密码子的使用偏好受到突变和选择的影响^[15]。

DNA 条形码技术作为生物鉴定技术的最新发展, 近年来在中药材及水产品鉴定领域发展快速稳定^[16-17]。与单个的线粒体条形码基因相比, 线粒体全序列包含的遗传信息丰富、变异位点和序列更加

多样, 可通过不同药材品种间的线粒体全序列比对, 确定物种间最显著的差异序列^[18]。为建立适用于海马药材分子鉴定的技术体系, 课题组通过获得线粒体全基因组序列, 建立海马及其混伪品的系统发育关系, 明确不同海马来源的分子进化地位, 基于线粒体全序列对 COI 等不同基因在种内和种间的变异速率进行分析, 筛选速度适中的可用于区分近缘海马药材的 DNA 条形码分子标签。目前, 课题组已获得包括线纹海马、棘海马、南非海马和欧洲海马在内的 6 种海马以及拟海龙和宝伽海龙的线粒体基因组全序列, 为规范海马中药材市场的技术开发奠定基础, 也为我国海马资源的遗传多样性保护、资源开发与利用、海马良种选育提供了数据支撑^[19-24]。

本研究基于 COI、16 S rRNA 和 ATP6 序列对三斑海马的种内变异速率进行分析, 结果表明三斑海马种间遗传变异远远大于其种内遗传变异, 海马 COI、16 S rRNA 及 ATP 序列种内遗传距离从 0 到 0.012 不等, 三斑海马种内 16 S rRNA 序列遗传距离最小, 遗传距离变化范围最大的为 ATP 序列。在 16 S rRNA 序列的测序结果中, 变异位点最少, 只有 0.7%, 而 COI 序列种内变异位点有 8 个, 占总碱基长度的 1.23%, 尽管 COI 序列的种内碱基变异大于 16 S 的种内变异, 但基于 PCR 扩增的条件及成功率, 更适合利用线粒体 COI 作为三斑海马中药材鉴定与检识的 DNA 条形码, ATP6 基因可用于区分海马的近缘物种。同时, 基于线粒体 COI、16 S rRNA、ATP 序列构建的 NJ 树, 12 个三斑海马样品聚集成一个大分支, 自检举值为 100%, 明显与其他 8 种海马和 2 种海龙区分开, 三斑海马与小海马亲缘性最近, 直立海马与棘海马、线纹海马、大海马及太平洋海马各自亲缘关系较为接近。本实验将 DNA 条形码技术用于三斑海马药材的鉴别中, 简便有效地鉴别出三斑海马药材和其他海马正品和混伪品, 为海马药材鉴别提供新方法, 促进海马药材质量标准的建立, 对规范海马药材流通销售及临床使用有重要意义。通过本研究, 希望为 DNA 条形码在中药材方面的研究提供一定的参考和借鉴, 为三斑海马的鉴别方法和遗传变异研究提供基础数据支撑。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 陈 梦, 陈建真, 葛宇清, 等. 海马化学成分及药理活

性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4089-4099.

[3] 郭雪中, 李 毅. 海洋中药 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.

[4] 陈 梦, 方 昀, 程汝滨, 等. 线粒体 DNA 标记在动物类药材分子鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3134-3142.

[5] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.

[6] 张 辉, 姚 辉, 崔丽娜, 等. 基于 COI 条形码序列的《中国药典》动物药材鉴定研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013(3): 371-380.

[7] 徐田军, 孙悦娜, 廖 智, 等. 日本囊对虾 4 个地理群体线粒体 16 S rRNA 序列及遗传结构分析 [J]. 动物学杂志, 2010, 45(2): 93-100.

[8] 张瑛妮, 郑连明, 何劲儒, 等. 基于线粒体 COI 和 16 S 片段序列的北部湾北部水螅水母 DNA 条形码分析 [J]. 生物多样性, 2015, 23(1): 50-60.

[9] 夏英定, 汪世平, 李 娟, 等. 湖南省日本血吸虫线粒体 *atp6* 基因部分序列的多态性分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(1): 1-6.

[10] 延 宁. 基于线粒体 12S、*nad1* 和 *atp6* 基因对青藏高原细粒棘球蚴种群遗传结构的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.

[11] 李 军, 张莉娜, 温珍昌. 生物软件选择与使用指南 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.

[12] 韦健红. 地龙类药材 DNA 条形码分子鉴定的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.

[13] Pang X, Shi L, Song J, *et al.* Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(3): 571-575.

[14] 温琰莲. 中药海马的品种与 DNA 条形码鉴定研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.

[15] 郝桂英, 何学谦. 鸡蛔虫凉山州分离株线粒体 ATP6 基因的序列测定和种系发育分析 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36(8): 1341-1345.

[16] Cheng R, Zheng X, Ma Y, *et al.* The complete mitochondrial genomes of two octopods *Cistopus chinensis* and *Cistopus taiwanicus*: Revealing the phylogenetic position of the genus *Cistopus* within the order Octopoda [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84216.

[17] 郑小东, 马媛媛, 程汝滨. 线粒体 DNA 标记在头足纲动物分子系统学中的应用 [J]. 水产学报, 2015, 39(2): 294-303.

[18] Gwenaëlle D T, Serge H, Benjamin M, *et al.* Complete mitochondrial DNA sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* confirms Ostreidae classification [J]. *Bmc Res Notes*, 2011, 4(1): 400-409.

- [19] Cheng R, Liao G, Ge Y, *et al.* Complete mitochondrial genome of the great seahorse *Hippocampus kelloggi* Jordan & Snyder, 1901 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2015, 28(2): 227-228.
- [20] Wang Z K, Ge Y Q, Cheng R B, *et al.* Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Hippocampus spinosissimus* Weber, 1913 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2015, 28(3): 303-304.
- [21] Ge Y, Zhu L, Chen M, *et al.* Complete mitochondrial genome sequence for the endangered Knysna seahorse *Hippocampus capensis*, Boulenger 1900 [J]. *Conserv Genet Resour*, 2017, doi: org/10.1007/s12686-017-0849-3.
- [22] Chen M, Zhu L, Chen J, *et al.* The complete mitochondrial genome of the short snouted seahorse *Hippocampus hippocampus*, Linnaeus 1758 (Syngnathiformes: Syngnathidae) and its phylogenetic implications [J]. *Conserv Genet Resour*, 2017, doi: org/10.1007/s12686-017-0930-y.
- [23] Cheng R, Fang Y, Ge Y, *et al.* Complete mitochondrial genome sequence of the Jayakar's seahorse *Hippocampus jayakari* Boulenger, 1900 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2017, 2(2): 593-594.
- [24] Zhu L, Chen M, Cheng R, *et al.* Complete mitochondrial genome characterization of the alligator pipefish *Syngnathoides biaculeatus*, and phylogenetic analysis of family Syngnathidae [J]. *Conserv Genet Resour*, 2018, doi: org/10.1007/s12686-018-1032-1.