

峨眉山区唇形科药用植物 ITS2 和 matK 条形码序列鉴定

郑 辉, 李秋娥, 陈安琪, 邓楷煜, 廖 海, 任瑶瑶, 周嘉裕*, 谭 睿*

西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031

摘要:目的 评价以 ITS2 和 matK 序列作为 DNA 条形码对峨眉山区唇形科药用植物的鉴定效果。方法 从峨眉山区采集 23 种唇形科药用植物样本, 提取 DNA, PCR 扩增 ITS2 序列, 并从 Genbank 上分别下载 54 与 51 条唇形科植物的 ITS2 及 matK 序列; 使用 MEGA 5.0 软件计算全部序列的种间、种内遗传距离及序列变异位点, 构建 Neighbor Joining (NJ) 系统进化树, 最后开展 barcoding gap 分析。结果 峨眉山唇形科药用植物的 ITS2 序列长度为 190~237 bp, GC 含量为 53%~73%, 具有较为明显的 barcoding gap, 对唇形科植物的识别率为 94%, 而 matK 序列的 barcoding gap 不显著, 有明显重叠现象, 对唇形科植物的识别率为 96%。结论 ITS2 从种水平上对唇形科植物有更好的鉴定能力, 但 matK 序列对唇形科植物的识别率更高, 因此, 以 ITS2 为主, matK 序列为辅的鉴定方法能够对唇形科药用植物进行快速、准确的鉴定和识别, 准确阐明物种之间的亲缘关系, 对峨眉山区唇形科药用植物资源的有效保护和合理开发提供了理论依据。

关键词: 峨眉山; 唇形科; DNA 条形码; ITS2; matK; 遗传距离

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5563-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.026

Identification and analysis on medicinal plants of Labiatae from Emei Mountain Area Using ITS2 and matK sequences

ZHENG Hui, LI Qiu-e, CHEN An-qi, DENG Kai-yu, LIAO Hai, REN Yao-yao, ZHOU Jia-yu, TAN Rui

School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: Objective To evaluate the efficiency of ITS2 and matK DNA barcode for the identification the Labiatae medicinal plants in Emei Mountain. **Methods** A total of 23 samples of Labiatae medicinal plants were harvested in Emei Mountain. The DNA was extracted and used for PCR to obtain the ITS2 sequences. Meanwhile, 54 ITS2 and 51 matK sequences of the medicinal plants in Labiatae were downloaded from Genbank. The interspecies and intraspecific genetic distance and sequence variation sites of all sequences were determined by MEGA 5.0 software. The Neighbor Joining (NJ) phylogenetic tree was constructed, and barcoding gap analysis was then performed. **Results** The length of various ITS2 sequence was distributed from 190 to 237 bp, with GC content of 53%—73%. Moreover, significant barcoding gap was observed when comparing the distances, the recognition rate for plants of the Labiatae family was 94%. The barcoding gap of the matK sequence was not significant, there was obvious overlap, and the recognition rate for the Labiatae family was 96%. **Conclusion** ITS2 has a better ability to identify Lamiaceae plants at the species level, but the matK sequence has a higher recognition rate for Lamiaceae plants. Therefore, the employment of ITS2 as core with matK as supplement was able to identify Lamiaceae plants quickly and accurately, and understand the genetic relationship between species accurately. This provides an important theoretical basis for the effective protection and rational development of the medicinal plant resources of the Labiatae plants in Emei Mountain.

Key words: Mountain Emei; Labiatae; DNA barcode; ITS2; matK; genetic distance

峨眉山位于四川盆地西南边缘向青藏高原过渡地带 (29°16'30"~29°43'42"N, 103°10'30"~103°37'10"E), 其最高峰为海拔 3 099 m 的万佛顶, 自山麓至山顶高程变幅 2 600 m。该区域受到亚热带

收稿日期: 2019-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31500276); 国家自然科学基金资助项目 (81473337); 国家重大专项 (2014ZX09304-307-001-019, 2013ZX09103-002-014); 国家发改委重要标准化行动专项 (2YB2H-Y-SC-41); 四川省应用基础研究项目 (2017JY0222); 四川省重点研发项目 (2018SZ0061, 2017SZ0074); 成都市科技技术研发项目 (2016-HM01-00260-SF); 四川省中医药管理局项目 (2016Z013)

作者简介: 郑 辉 (1994—), 女, 陕西咸阳人, 硕士研究生, 研究方向为植物资源与分子标记。E-mail: 1049116675@qq.com

*通信作者 周嘉裕 E-mail: spinezhou@home.swjtu.edu.cn

谭 睿 E-mail: tanrui@home.swjtu.edu.cn

季风气候影响,年降水量达 2 218.4 mm,平均湿度为 80%,造就了当地植被类型丰富,特有物种繁多的特点,成为我国 3 大资源植物区域之一^[1]。据文献数据统计,峨眉山拥有种子植物共 2 876 种以上^[2],分别占中国与四川省植物物种总数的 10%、30%。其中种子植物 2 800 多种,隶属 165 科。据成都中医药大学峨眉学院(原四川省中药学校)出版的《峨眉山药用植物研究》记载,峨眉山有药用种子植物 1 501 种,隶属 160 科。

唇形科(Lamiaceae)为世界性分布的较大的科。全世界有 10 个亚科,220 余属,3 500 余种,其中单种属与寡种属各占三分之一^[3]。常见的唇形科药用植物有溪黄草 *Isodon serra* (Maxim.) Hara,具有清热解毒、抗癌消炎、健脾、活血、抗菌的作用^[4];藿香 *Agastache rugose* (Fisch. et Mey.) O. Ktze,可以消除湿气,缓解恶心和呕吐,并治愈真菌感染^[5];薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq,其干燥的地上部分可入药,具有疏风、散热、解毒的功效,用于治疗风热感冒,头痛、目赤、咽喉肿痛、牙痛等^[6];益母草 *Leonurus japonicas* (Laur.) S. Y. Hu,为中医妇科临床常用药,活血调经、利尿消肿、清热解毒^[7]。

DNA 条形码是利用一个或几个 DNA 标准短序列来进行物种鉴定的分子诊断新技术,其能够实现快速、准确和自动化的物种鉴定^[8]。DNA 条形码在物种鉴定、生物多样性、物种资源开发、中药质量安全与动植物检疫等方面具有广阔的应用^[9-12]。陈士林等^[13]首次提出 ITS2 序列可以作为药用植物的 DNA 条形码通用条形码候选序列。本实验室也曾利用 ITS2 序列对含有小檗碱及不含有小檗碱的植物建立分类体系,获得了含有小檗碱的植物的特征性 DNA 标签,有望用于黄连、黄檗等含有小檗碱易混中药的鉴定^[14]。

由于唇形科植物形态变异较大,形态鉴定较为困难,因此对其开展基于 DNA 的分子鉴定研究已迫在眉睫^[15]。比如,Zahra 等^[16]比较 *rbcL*、*matK* 和 *psbA-trnH* 对 32 种唇形科样品的鉴定结果,发现 *matK* 和 *psbA-trnH* 对种间的鉴定成功率均为 40%,超过 *rbcL* (16%)。Thakur 等^[15]发现 *rbcL* 未能对唇形科 4 种薄荷属植物有效聚类,表明 *rbcL* 在种间水平上对薄荷属植物的鉴定能力较弱。He 等^[17]使用 *rbcL*、ITS、*ropB*、*psbA-trnH* 和 *ndhJ* 对 2 种广藿香的 103 种样品进行鉴定,结果发现 ITS 是最好的候选条码。Han 等^[18]比较了

matK、*rbcL*、ITS2 和 *psbA-trnH* 4 种条形码对 314 种唇形科植物的鉴定效果,发现 ITS2 的鉴定效果最好,其对属间的鉴定成功率达到了 100%,对种间的鉴定成功率为 78.3%;杨鹏等^[19]使用 ITS 序列 (ITS1+5.8 S+ITS2) 和 *matK* 序列对贵州省内的 40 多种常见唇形科植物进行鉴定,结果发现 *matK* 可以更好地鉴别唇形科植物,其对唇形科常见药用植物的识别率为 95%。总结以上研究现状,目前尚未形成唇形科植物分子鉴定的通用 DNA 条形码,推测 ITS2 与 *matK* 可能是较好的 DNA 条形码,但仍需进一步深入研究。本研究采集了峨眉山区 23 种唇形科药用植物样品,通过 PCR 方法获得它们的 ITS2 序列,并从 GenBank 上下载部分唇形科植物的 ITS2 序列,对所有序列开展遗传距离、*barcoding gap* 与 Neighbor Joining (NJ) 系统进化树分析,并且从 GenBank 中下载相关植物的 *matK* 序列,获得其遗传距离,进行 *barcoding gap* 及 NJ 系统进化树结果的分析。研究结果旨在形成唇形科药用植物的分子鉴定体系,为峨眉山唇形科药用植物的资源保护,种质资源的扩大与合理开发利用提供基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

取 23 种供试唇形科植物样品分别采集于四川峨眉山区,经西南交通大学生命科学与工程学院周嘉裕副教授鉴定,分属于鼠尾草属(4 种)、筋骨草属(2 种)、紫苏属(2 种)、龙头草属(2 种)、香茶菜属(1 种)、香科科属(2 种)、石荠苎属(1 种)、风轮菜属(1 种)、藿香属(1 种)、蜜蜂花属(2 种)、四棱草属(1 种)、菥蓂属(1 种)、夏枯草属(1 种)、益母草属(1 种),薄荷属(1 种)标本保存于西南交通大学科学与工程学院,见表 1。同时在 GenBank 数据库中下载唇形科植物 ITS2 序列 54 条、*matK* 序列 51 条,信息见表 2。

1.2 试剂

北京天根生化有限公司购买的植物基因组 DNA 提取试剂盒;北京擎科新叶生物技术有限公司购买的 PCR 扩增试剂盒 (TaqPCR Mastermix);大连宝生物工程有限公司购买的 DL2000 的 Marker。

1.3 仪器

Effendorf 公司的台式高速大容量离心机,型号为 5415R;ABI 公司的 PCR 仪,型号为 720;Bio-Rad 公司的凝胶成像仪,型号为 Universal Hood II。

表 1 供试全材料

Table 1 Total materials for experiment

属名	植物名称	拉丁名	序列长	GC 比例/%	主要药效	GenBank 登录号
藿香属	藿香	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. et Mey.) O. Ktze	232	68	缓解恶心、呕吐, 治愈真菌感染	KY197 932.1
筋骨草属	金疮小草	<i>Ajuga decumbens</i> Thunb	228	65	止咳化痰、清热凉血、消肿解毒。	KY197 935.1
筋骨草属	圆叶筋骨草	<i>Ajuga ovalifolia</i> Bur. et Franch	229	65	清热解毒、凉血消肿	MK124730
风轮菜属	细风轮菜	<i>Clinopodium gracile</i> (Benth.) Kuntze	237	70	除湿解毒、凉血止血	MK124726
香茶菜属	溪黄草	<i>Isodon serra</i> (Maxim.) Hara	223	70	清热利湿、退黄祛湿、凉血散瘀	KY082800.1
益母草属	益母草	<i>Leonurus japonicas</i> Houtt	216	72	活血调经、利尿消肿、清热解毒	KY197936.1
龙头草属	华西龙头草	<i>Meehania fargesii</i> (Levl) C. Y. Wu	215	67	解表散寒、宣肺止咳	MK124729
龙头草属	龙头草	<i>Meehania henryi</i> (Hemsl.) Sun ex C. Y. Wu	215	67	补气血、祛风湿、消肿毒	KY197933.1
蜜蜂花属	蜜蜂花	<i>Melissa axillaris</i> (Benth.) Bakh. F	232	64	清热、解毒	KY197930.1
蜜蜂花属	蜜蜂花	<i>Melissa axillaris</i> (Benth.) Bakh. F	232	64	清热解毒	MK124725
石芥芝属	小鱼仙草	<i>Mosla dianthera</i> (Buch.-Ham.) Maxim	232	66	祛风发表、利湿止痒	KY197929.1
紫苏属	紫苏	<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt	233	65	发汗散寒、行气宽中、解郁止呕	KY082799.1
紫苏属	紫苏	<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt	233	65	发汗散寒、行气宽中、解郁止呕	KY082798.1
夏枯草属	夏枯草	<i>Prunella vulgaris</i> Linn	234	67	清火明目	KY197931.1
鼠尾草属	鼠尾草	<i>Salvia japonica</i> Thunb	228	68	杀菌灭菌、抗毒解毒、驱瘟除疫	MK124727
鼠尾草属	甘西鼠尾草	<i>Salvia przewalskii</i> Maxim	229	66	活血祛瘀、安神宁心、排脓止痛	KX171662.1
鼠尾草属	一串红	<i>Salvia splendens</i> Ker-Gawl	234	68	清热、凉血、消肿	MK124723
鼠尾草属	蔓茎鼠尾草	<i>Salvia substolonifera</i> Stib	229	67	清肺热、止吐血、治风热咳嗽	KY197934.1
四棱草属	四棱草	<i>Schnabelia oligophylla</i> Hand.-Mazz	208	73	活血通经	MK124728
香科科属	二齿香科科	<i>Teucrium bidentatum</i> Hemsl	206	69	解毒、健脾利湿	MK124724
香科科属	血见愁	<i>Teucrium viscidum</i> Bl. Bijdr	217	73	止血、活血	KY082797.1
荜茇属	败酱草	<i>Thlaspi arvense</i>	190	53	清热解毒、祛瘀排脓	KX180985.1
薄荷属	薄荷	<i>Mentha haplocalyx</i> Briq	238	68	散热、解毒	

表 2 GenBank 下载的唇形科植物 ITS2 和 matK 序列

Table 2 ITS2 and matK sequences of Labiatae plant downloaded from GenBank

名称	拉丁名	GenBank 下载 ITS2 序列	GenBank 下载 matK 序列
一串红	<i>S. splendens</i> Ker-Gawl	MG824274.1、KC473275.1、MF622186.1、FJ883530.2	KX783778.1、KX783777.1、KC473392.1
鼠尾草	<i>S. japonica</i> Thunb	MG8824217.1、LC060731.1	KY646163.1、NC-035233.1
蔓茎鼠尾草	<i>S. substolonifera</i> Stib	MG824277.1、MG824276.1	JQ934097.1
甘西鼠尾草	<i>S. przewalskii</i> Maxim	KC473258.1、KC473272.1	KC473388.1、KC473387.1、KC473386.1
溪黄草	<i>I. serra</i> (Maxim.) Hara	KM280861.1、MG730993.1	AF477763.1
细锥香茶菜	<i>I. coetsa</i> (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara	KM877351.1、KM877350.1、KM877349.1	JF357834.1、KM877379.1、KM877378.1、KM877377.1
显脉香茶菜	<i>I. nervosus</i> (Hemsl.) C. Y. Wu et H. W. Li	KF032257.1、KF032256.1、KF032255.1	
二齿香科科	<i>T. bidentatum</i> Hemsl	AF477790.1	AF477767.1、MF801747.1
血见愁	<i>T. viscidum</i> Bl. Bijdr		HQ839703.1
紫苏	<i>P. frutescens</i> (L.) Britt	MG731095.1、MG731094.1	KP643139.1、KY624911.1
龙头草	<i>M. henryi</i> (Hemsl.) Sun ex C. Y. Wu	KM886740.1	KX526679.1
小鱼仙草	<i>M. dianthera</i> (Buch.-Ham.) Maxim	KT210242.1、KY552542.1	KY624905.1
石香薷	<i>M. chinensis</i> Maxim	KY552541.1	KY624904.1、HQ839706.1
金疮小草	<i>A. decumbens</i> Thunb	KR611786.1、KM280866.1	AF477763.1
圆叶筋骨草	<i>A. ovalifolia</i> Bur. et Franch	KP611786.1、KP6	KT280175.1
蜜蜂花	<i>M. axillaris</i> (Benth.) Bakh. F	JQ669114.1、KM886748.1	
香蜂花	<i>M. officinalis</i> Linn	JF301353.1、MG256281.1	MF694864.1、KP642889.1、KJ196364.1、HM850795.1
细风轮菜	<i>C. gracile</i> (Benth.) Kuntze	JQ669082.1	KX526669.1
夏枯草	<i>P. vulgaris</i> Linn	MF096646.1、MF096645.1、MH117686.1、MH117685.1	MG22888.1、KJ593074.1、KJ593073.1
益母草	<i>L. japonicus</i> Houtt	KX421756.1、MF096449.1、MF096448.1、MF096447.1、MF096446.1	MF158695.1、HQ839708.1、HQ839709.1
藿香	<i>A. rugosa</i> (Fisch. et Mey.) O. Ktze	KP058824.1、JQ669076.1、JF708195.1	
四棱草	<i>S. oligophylla</i> Hand. -Mazz	AF477789.1	MF801740.1、MF801739.1、MF801738.1
败酱草	<i>T. arvense</i>	MK044740.1、MK044739.1	HQ593466.1、KJ841026.1、JN966711.1、KM892765.1
小叶假糙苏	<i>P. javanica</i> (Bl.) Prain var. javanica	MG730489.1、MG730488.1、MG730487.1	JN680461.1、HQ911451.1、HQ911450.1
刚毛假糙苏	<i>P. hispida</i> C. Y. Wu	EU827112.1	
多硬毛假糙苏	<i>P. hirsutissima</i> C. Y. Wu et H. W. Li	EU827096.1	
台湾假糙苏	<i>P. formosana</i> (Hay) C. H. Hsieh et T. C. Huang		JN680460.1
薄荷	<i>M. suaveolens</i> Briq		KX783715.1、KP172057.1、HM850798.1、HQ902737.1

2 方法

2.1 样品 DNA 提取、PCR 扩增及测序

称取 100 mg 植物叶片样本,用 75%酒精和无菌超纯水擦拭干净,加入液氮研磨成极细粉,采用北京天根生化有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒提取样品总 DNA(具体方法参照试剂盒说明书)。

ITS2 序列扩增引物为 ITS2-F: 5'-ATGCGATA-CTTGGTGTGAAT-3', ITS2-R: 5'-GACGCTTCT-CCA GACTACAAT-3'。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 4 min, 循环反应 30 次(94 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min), 72 °C 延伸 7 min。将 PCR 扩增产物送到成都擎科梓熙生物科技有限公司进行双向测序。

2.2 数据处理及分析

对所获得的原始序列,采用 CExpressi 软件对序列拼接并校对。采用基于隐马尔科夫模型的 HMMer 注释方法去除 5.8 S 和 28 S 序列,得到准确的 ITS2 间隔区序列^[20]。使用 MEGA 5.0 软件对全部样品及下载的 ITS2 进行序列对比分析,比较所有 ITS2 序列的对比后长度、保守位点、变异位点、简约信息位点,基于 K2P (Kimura-2-Parameter) 双参数模型计算种内、种间距离并统计分析;使用 NJ 法构建系统进化树,设置 bootstrap 为 1 000 次重复;使用 MEGA 5.0 软件对所有下载的 matK 序列基于 K2P 方法计算遗传距离,并对遗传距离进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增与测序

实验所用样品 23 份,经过 DNA 提取,PCR 扩增,扩增出条带的有 23 份,扩增效率为 100%。测序结果表明,ITS2 的测序结果成功率为 100%,表明实验方法可靠。23 份样品所获得的 ITS2 序列均已提交到 GenBank,登录号见表 1。

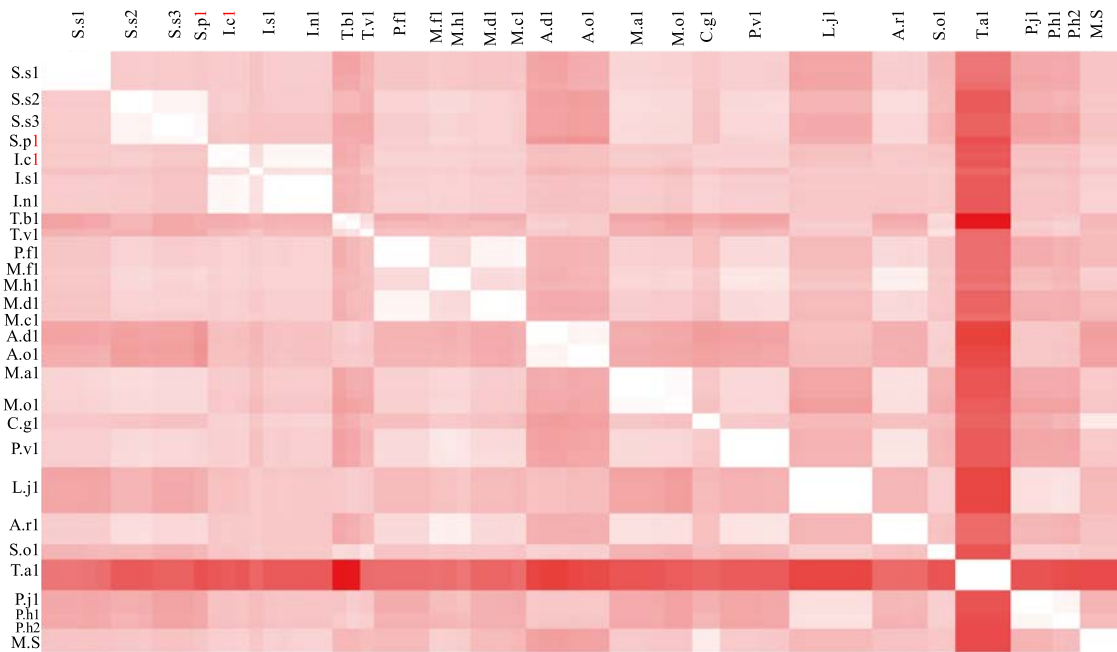
3.2 ITS2 序列信息

所有样品及下载的 ITS2 序列长度为 190~237 bp, GC 含量为 53%~73%。使用 MEGA 5.0 软件对所有序列的变异性分析发现,鼠尾草属 4 个物种 12 条序列对比后长度为 235 bp,共产生 52 个可变位点;香茶菜属 3 个物种 9 条序列对比后长度为 224 bp,共产生 34 个可变位点;香科科属 2 个物种 3 条序列对比后长度为 217 bp,共产生 19 个可变位点;紫苏属 1 个物种 4 条序列对比后长度为 233 bp,

无可变位点;龙头草属 2 个物种 3 条序列对比后序列长度为 215 bp,共产生 1 个可变位点;石芥苣属 1 个物种 4 条序列对比后长度为 233 bp,共产生 1 个可变位点;筋骨草属 2 个物种 6 条序列对比后长度为 229 bp,共产生 12 个可变位点;蜂蜜花属 2 个物种 6 条序列对比后长度为 234 bp,共产生 5 个可变位点;风轮菜属 1 个物种 2 条序列对比后长度为 237 bp,无可变位点;夏枯草属 1 个物种 5 条序列对比后长度为 234 bp,共产生 1 个可变位点;益母草属 1 个物种 6 条序列对比后长度为 216 bp,共产生 1 个可变位点;藿香属 1 个物种 4 条序列对比后长度为 232 bp,共产生 2 个可变位点;四棱草属 1 个物种 2 条序列对比后长度为 208 bp,无可变位点;假糙苏属 4 个物种 5 条序列对比后长度为 219 bp,共产生 12 个可变位点;荜茇属 1 个物种 4 条序列对比后长度为 191 bp,无可变位点。

3.3 种间、种内遗传距离分析

使用 MEGA 5.0 软件选择 K2P 距离模型计算 ITS2 序列的种间、种内遗传距离,结果见图 1。所有样品种间遗传距离最大的是败酱草与一串红,遗传距离为 1.546,最小的是龙头草与华西龙头草,显脉香茶菜与溪黄草,遗传距离为 0,平均遗传距离为 0.370;种内遗传距离最大的是溪黄草,遗传距离为 0.155,最小的是蔓茎鼠尾草、显脉香茶菜、紫苏等,遗传距离为 0,平均遗传距离为 0.007;使用 matK 序列计算种内、种间距离,结果为所有样品种间遗传距离最大的是败酱草与金疮小草,遗传距离为 0.445,最小的是台湾假糙苏与小叶假糙苏,遗传距离为 0,平均遗传距离为 0.134;种内遗传距离最大为夏枯草,遗传距离为 0.138,最小为鼠尾草、败酱草、四棱草等,最小遗传距离为 0,平均遗传距离为 0.014。由热图可以看到本实验中唇形科样品种内、属内颜色较浅,遗传距离较小,各属之间颜色较深,遗传距离较大。从种内与种间遗传距离分布图(图 2)可以发现,ITS2 序列存在较为明显的 barcoding gap,种间遗传距离主要集中在 0.101~0.600,种内遗传距离主要集中在 0~0.010,而 matK 序列的 barcoding gap 不是很明显,种内遗传距离主要集中在 0~0.010,种间遗传距离分布在 0.031~0.500,种内遗传距离与种间遗传距离在 0.021~0.030、0.031~0.040、0.051~0.060 和 0.101~0.200 有部分重叠现象;从 barcoding gap 来说,ITS2 更符合理想的 DNA 条形码要求,在种水平上来说鉴定



S.s1、S.s2、S.s3、S.p1、I.c1、I.s1、I.n1、T.b1、T.v1、P.fl、M.fl、M.h1、M.d1、M.c1、A.d1、A.o1、M.a1、M.o1、C.g1、P.v1、L.j1、A.r1、S.o1、T.a1、P.j1、P.h1、P.h2、M.S 分别代表一串红、鼠尾草、蔓茎鼠尾草、甘西鼠尾草、细锥香茶菜、溪黄草、显脉香茶菜、二齿香科科、血见愁、紫苏、华西龙头草、龙头草、小鱼仙草、石香薷、金疮小草、圆叶筋骨草、蜜蜂花、香蜂花、细风轮菜、夏枯草、益母草、藿香、四棱草、败酱草、小叶假糙苏、刚毛假糙苏、多硬毛假糙苏、薄荷

S.s1, S.s2, S.s3, S.p1, I.c1, I.s1, I.n1, T.b1, T.v1, P.fl, M.fl, M.h1, M.d1, M.c1, A.d1, A.o1, M.a1, M.o1, C.g1, P.v1, L.j1, A.r1, S.o1, T.a1, P.j1, P.h1, P.h2, M.S are *S. splendens*, *S. japonica*, *S. substolonifera*, *S. przewalskii*, *I. coetsa*, *I. serra*, *I. nervosus*, *T. bidentatum*, *T. viscidum*, *P. frutescens*, *M. fargesii*, *M. henryi*, *M. dianthera*, *M. chinensis*, *A. decumbens*, *A. oralifolia*, *M. axillaris*, *M. officinalis*, *C. gracile*, *P. vulgaris*, *L. japonicus*, *A. rugosa*, *S. oligophylla*, *T. arvense*, *P. javanica*, *P. hispida*, *P. hirsutisima*, *M. suaveolens*

图 1 唇形科植物样本种间和种内距离

Fig. 1 Interspecific and intraspecific distances of *Labiatae* plant samples

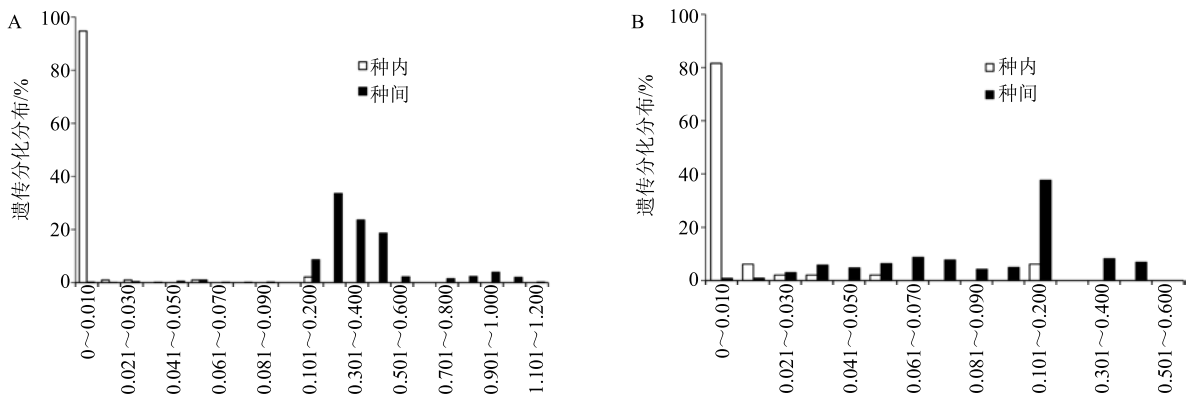


图 2 ITS2 (A) 和 matK (B) 序列种内和种间遗传距离分布

Fig. 2 Intraspecific and interspecific genetic distance distribution of ITS2 (A) and matK (B)

能力较强。

3.4 系统进化树分析

使用 MEGA 5.0 软件基于 K2P 模型对全部 ITS2 和 matK 序列构建 NJ 系统进化树 (图 3、4), 发现 ITS2 序列能够有效区分不同属的植物例如同为香茶菜属的溪黄草与细锥香茶菜、显脉香茶菜, 同为

香科科属的二齿香科科与血见愁, 同为假糙苏属的小叶假糙苏与刚毛假糙苏、多硬假糙苏等都能单聚为一大支, 支持率在 90% 以上; 而且还能较好地地区分不同种的植物例如一串红、鼠尾草、蔓茎鼠尾草、甘西鼠尾草等能各聚为小枝, 支持率在 84% 以上。matK 序列能较好地将不同属聚到一起 (鼠尾草属

除外), 如同为石芥苳属的小鱼仙草与石香薷、同为香科科属的二齿香科科与血见愁、同为假糙苏属的小叶假糙苏与台湾假糙苏能聚为一支, 支持率在 54% 以上; 而且还能很好区分不同种的植物, 如一串红、鼠尾草、薄荷等能聚为一小支, 支持率在 31% 以上。

4 讨论

DNA 条形码具有用于检测和保护濒危和有价值物种的潜力^[21], 作为一种分子诊断技术现在已经被普遍应用到物种鉴定中^[22], ITS2 序列对植物具有良好的扩增成功率和物种水平的鉴定成功率^[23]。本研究中的 ITS2 序列的可变位点及简约性信息位点总数分别占序列全长的 61.19% 和 56.99%, matK 序列中可变位点为 27%, 简约信息位点为 23%, 体现 ITS2 序列在不同唇形科植物中具有多样性, 表明 ITS2 序列具有较高潜质, 能够用于唇形科植物的鉴定及分类研究; 对遗传距离分析, 通过热图 (图 1) 和柱状图 (图 2) 可以发现种内颜色最浅, a 属内颜色次之, ITS2 序列种间种内有较明显的 barcoding gap, matK 序列没有较为明显的 barcoding gap, 从 ITS2 序列的系统进化树 (图 3) 可以看出唇形科同种可以很好的聚为一支, 同属的也能较好地聚到一起 (除一串红外), 鼠尾草属中的一串红与其他鼠尾草属样本在进化树中所处的距离较远, 一串红与其他鼠尾草属的属内遗传距离最小为 0.248, 最大为 0.290, 而其他属的属内遗传距离最大仅为 0.155, matK 序列的系统进化树 (图 4) 未能将鼠尾草与其他鼠尾草属聚到一起, 其他属也能够很好地聚到一起。杨鹏等^[19]利用 ITS 序列和 matK 序列对贵州省 40 余种常见唇形科植物进行鉴定, 发现 matK 序列相比 ITS 序列能更好地鉴定唇形科植物, 而用 matK 序列构建的 NJ 进化树, 同属假糙苏属的小叶假糙苏和纤细假糙苏未能聚到一起, 但鼠尾草属能较好的聚到一起, 本实验利用 ITS2 序列和 matK 序列构建 NJ 进化树, 都能将假糙苏属较好地聚到一起。有文献报道以 ITS 序列作为分子标记应用技术的最大限制是由于进化顺序、变异, 甚至分析方法等原因, 在 5.8 S 间隔区上表现的差异性较小, 不适用于属内种及种群的标记^[24]。比较 matK 与 ITS2 序列的种间与种内遗传距离值、barcoding gap 分析, ITS2 在种水平上鉴定唇形科植物的能力更强; 另一方面, 系统进化树结果表明 matK (96%) 对唇形科植物的识别率略优于 ITS2 (94%)。综合以上分析,

本课题组认为以 ITS2 为主, matK 为辅的分子鉴定体系能够更准确地鉴定唇形科植物。

由于唇形科植物种类繁多且分布广泛, 需要检测不同种类及不同地域唇形科植物的 DNA 条形码序列, 扩大其 DNA 条形码库, 才能建立适合唇形科植物分子鉴定的成熟 DNA 条形码体系。峨眉山素有“仙山药园”之称, 药用植物资源非常丰富^[25]。本实验利用 ITS2 条形码技术, 对峨眉山唇形科植物完成了准确、快速的鉴定, 这为峨眉山其他药用植物资源鉴定方法的建立也提供了理论参考。在未来的研究中, 将进一步扩大峨眉山及不同地区唇形科植物的 DNA 条形码库, 为唇形科植物的分子鉴定奠定基础。

参考文献

- [1] 王清, 廖学圆, 刘守江, 等. 峨眉山种子植物的垂直分布研究 [J]. 安徽林业科技, 2018, 44(3): 7-12.
- [2] 吴荭, 庄平, 张超, 等. 峨眉山资源植物研究 [J]. 资源开发与市场, 2011(4): 347-351.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 65 卷, 第 2 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] 吴桂凡, 许学健. 唇形科香茶菜属植物化学成分研究 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(6): 1012-1013.
- [5] Wei J F, Cao P R. Analysis of tilianin and acacetin in *Agastache rugosa* by high-performance liquid chromatography with ionic liquids ultrasound based extraction [J]. *Chem Central J*, 2016.
- [6] 于清跃, 朱新宝. 薄荷种植与薄荷精油提取研究进展 [J]. 安徽农业, 2012, 40(13): 153-160.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [8] 付涛, 王志龙, 钱萍仙, 等. 高等植物 DNA 条形码最新研究进展及其应用 [J]. 核农学报, 2016(5): 887-896.
- [9] Fu R Z, Wang J, Sun Y R, et al. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots [J]. *Biotechniques*, 1998, 25(5): 796-798.
- [10] Pečnikar Ž F, Buzan E V. 20 years since the introduction of DNA barcoding from theory to application [J]. *J Appl Genet*, 2013, 55(1): 43-52.
- [11] Hanner R, Becker S, Ivanova N V, et al. FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada [J]. *Mitochondrial DNA*, 2011, 22(Suppl 1): 106-122.
- [12] Fajardo V, González I I, Rojas M, et al. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2010, 21(8): 408-421.

- [13] 陈士林, 姚 辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [14] 胡 肖, 邓 银, 谢宇轩, 等. 含有小檗碱的药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 生物技术, 2017, 27(5): 452-459.
- [15] Thakur V V, Tiwari S, Tripathi, *et al.* DNA barcoding and phylogenetic analyses of *Mentha* species using rbcL sequences [J]. *Annal Phytomed Intel J*, 2016, 5(1): 59-62.
- [16] Zahra N B, Shinwari Z K, Qaiser M, *et al.* DNA barcoding: A tool for standardization of herbal medicinal products (Hmps) of Lamiaceae from Pakistan [J]. *Pakistan J Bot*, 2016, 48(5): 2167-2174.
- [17] He Y, Wan F, Xiong L, *et al.* Identification of two chemotypes of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. through DNA barcodes [J]. *Zeitschrift Fur Naturforschung Sect C-a J Biosci*, 2014, 69(5/6): 253-258.
- [18] Han J P, Shi L C, Chen X C, *et al.* Comparison of four DNA barcodes in identifying certain medicinal plants of Lamiaceae [J]. *J Systemat Evol*, 2012, 50(3): 227-234.
- [19] 杨 鹏, 沈文华, 石建明, 等. 唇形科常见药用植物 DNA 条形码的鉴定研究 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1397-1402.
- [20] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5S-28S rRNA interacinteraction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50-58.
- [21] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [22] Cheng K S, Kwan H S, But P P H. Pharmacognostical identification of American and Oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [J]. *J Ethnopharmacoll*, 1994, 42(1): 67-78.
- [23] 罗 焜, 陈士林, 陈科力, 等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究 [J]. 中国科学, 2010, 40(4): 342-351.
- [24] 吴清平, 黄龙花, 杨小兵, 等. 核酸序列分析在真菌分类鉴定中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(4): 959-961.
- [25] 鲁 松, 谢孔平, 李策宏. 峨眉山区野生濒危药用植物资源评价体系的初步研究 [J]. 广西植物, 2013, 33(2): 229-235.