

“藏茵陈”原植物及其混淆种类的 ITS 序列比较

刘健全^{1,2*}, 陈之端², 廖志新¹, 路安民²

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

摘要: 目的 比较藏药“藏茵陈”原植物川西獐牙菜及近年市场出现混淆种类的 ITS 序列, 为分子序列鉴定提供参照系统并为寻找新的药用植物来源提供分子证据。方法 利用 PCR 扩增和 ABI377 自动测序。结果 川西獐牙菜不同居群间的序列相同, 与其混淆种类之间存在一定的分子序列差异, 有其特定的分子序列; 利用 Paup 程序聚类分析表明川西獐牙菜与抱茎獐牙菜聚在一起。结论 ITS 序列可正确鉴定川西獐牙菜与其混淆种类, 他们之间的分子序列差异为进一步设计特异性分子鉴定试剂盒提供了科学依据; 抱茎獐牙菜可考虑作为“藏茵陈”药材的新植物来源。

关键词: 藏药; 藏茵陈; 川西獐牙菜; 抱茎獐牙菜; Internal transcribed spacers (ITS); 分子鉴定

中图分类号: Q949.776.4

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)01-0067-04

藏药“藏茵陈”为龙胆科獐牙菜属植物川西獐牙菜 *Swertia mussotti* Franch., 主治肝炎等肝胆系统疾病^[1,2]。由于多年的采集与利用, 该植物的年产量急剧下降; 因而, 藏药市场上出现了多种混淆种类, 如抱茎獐牙菜 *S. franchetiana* H. Smith、祁连獐牙菜 *S. przewalskii* Pissjak, 大花肋柱花 *Lomatogonium macranthum* Diels et Gilg、椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* D. Don 以及从尼泊尔进口的尼泊尔獐牙菜 *S. chirayita* Buch.-Ham. 等。后者被误认为是替代川西獐牙菜的“藏茵陈”上品。应用形态学、组织学和化学成分来鉴定市售的“藏茵陈”种类比较困难。DNA 分子遗传标记技术具有快速、微量、特异性强的特点, 在中药鉴定学研究中展示了良好的应用前景^[3-5]。本文试图利用 ITS (Internal transcribed spacers) 序列来标记川西獐牙菜及其混淆种类, 为分子序列鉴定与进一步设计特异性“藏茵陈”药材分子快速鉴定试剂盒提供参照系统; 同时, 利用分子手段在“藏茵陈”混淆种中筛选新的药材植物来源。

材料与方 法

材料 研究材料分别取自市售的“藏茵陈”药材

和野外经硅胶干燥的叶片 (每个居群平均取 3-5 个个体)。本文第 1 作者负责所用材料的植物分类鉴定。各种植物种类、来源和基因注册号详见表 1。

总 DNA 提取 总 DNA 提取基本依照 CTAB 法进行^[6]。

rDNA ITS 区的扩增、纯化和测序 采用双链 PCR 反应扩增 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 整个片段, 引物 P1 (5'-CGTAACAA GGTTCCTCGTAGG-3') 位于 18S 上和引物 P4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 位于 26S 上。反应体积 (50 μ L) 含: 25 μ L 双蒸水, 10 \times tris-HCL 缓冲液 (pH 9.2, 25 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂) 5 μ L, dNTP (8 mmol \cdot L⁻¹) 5 μ L, 引物 P1 和 P4 各 2.5 μ L (2 μ mol L⁻¹), Taq 酶 0.3 μ L (U \cdot μ L⁻¹) 以及模板 10 μ L (12.5 mmol L⁻¹)。扩增条件: 70 $^{\circ}$ 1 min, 接以 94 $^{\circ}$ 1 min, 55 $^{\circ}$ 20 s, 72 $^{\circ}$ 50 s, 循环 2 次, 再以 94 $^{\circ}$ 20 s, 55 $^{\circ}$ 20 s, 72 $^{\circ}$ 50 s, 循环 38 次, 在 72 $^{\circ}$ 保温 4 min。扩增得到的 PCR 产物利用 Qingen 公司的 PCR 产物纯化试剂盒进行割胶纯化。纯化后的产物利用同样的引物 (P1 和 P4) 和测序试剂盒进行测序 PCR 扩增, 条件为: 94 $^{\circ}$ 1 min, 60 $^{\circ}$ 50 s, 72 $^{\circ}$ 1 min, 循环 25 次。扩增产物在 377 DNA 测序仪上直接测序。每条链均能完整读出 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列 (约能读 700 bp), 正反两条链完全能相互验证。

序列排序和数据运算 ITS1 和 ITS2 的范围根据已发表的龙胆科 ITS 确定^[7]。利用 CLUSTALV 排序^[8]和 PAUP 3.1.1^[9]系统发育分析软件进行分

收稿日期: 2000-06-28

基金项目: 国家人事部和中国科学院“西部之光”人才培养计划和中国科学院生物科学与生物技术基金资助项目

作者简介: 刘健全, 男, 博士, 副研究员, 现在中国科学院西北高原生物研究所。

* Tel: (0971) 6153387, Fax: (0971) 6143282,

E-mail: ljquxy @public. xn. qh. cn

析。

结 果

川西獐牙菜 4 个和抱茎獐牙菜 3 个不同居群的 ITS 序列完全一致,说明 ITS 序列在所研究的类群中不受环境、地理分布的影响。利用药材和野外硅胶干燥材料在基因片段扩增及测序方面所采用的条件完全一致,均得到了满意的研究结果。川西獐牙

菜、抱茎獐牙菜药材与野外直接干燥材料所获得的序列也完全相同。本文新测得的 6 种獐牙菜属植物的 5.8S rDNA 长度完全相同,全长 164 bp,仅发现 1 个 bp 变异。ITS1 和 ITS2 的长度范围均为 225 - 233 bp。椭圆叶花锚、大花肋柱花和四数獐牙菜的 ITS1 和 ITS2 序列来自 GenBank。用于分析与比较的 ITS1 和 ITS2 基因序列均存于 GenBank,序列号见表 1。排列后的 ITS1 和 ITS2 序列限于篇幅故省略。

Tab 1 Origin of plant material and their accession number in GenBank

Taxon	Locality and Voucher	Accession number
<i>Swertia chirayita</i> Buch. - Ham 尼泊尔獐牙菜	From the crude medicine	AF255917
<i>S. wolfongiana</i> Gruning 华北獐牙菜	Maqin, Qinghai, Liu Jianquan 9906	AF255914
<i>S. erythrosticata</i> Maxim. 红直獐牙菜	Huzhu, Qinghai, Liu Jianquan 9908	AF251122
<i>S. mussotii</i> Franch. 川西獐牙菜	Yushu, Qinghai, Liu Jianquan 641	AF255915
	Chengduo, Qinghai, Liu Jianquan 20001	
	Nangqian, Qinghai, Liu Jianquan 20002	
	Chengduo, Qinghai, Liu Jianquan 20003	
	From the crude medicine	
<i>S. franchetiana</i> H. Smith 抱茎獐牙菜	Huzhu, Qinghai, Liu Jianquan 9909	AF255916
	Xining, Qinghai, Xue Chunying 05	
	Gonghe, Qinghai 20003	
	From the crude medicine	
<i>S. przewalskii</i> Pissjauk 祁连獐牙菜	Qilian, Qinghai, Liu Jianquan 9907	AF255913
<i>S. tetraptera</i> Maxim. 四数獐牙菜	Yuan and Kupfer 1995	Z48115, Z48139
<i>Lomatogonium macranthum</i> Diels et Gilg 大花肋柱花	Yuan and Kupfer 1995	Z48108, Z48135
<i>Halenia elliptica</i> D. Don. 椭圆叶花锚	Yuan and Kupfer 1995	Z48107, Z48134

利用 PAUP 分析得到川西獐牙菜及其混淆品 ITS 的绝对遗传距离(核苷酸差异数)和平均遗传距离见表 2。表 2 显示川西獐牙菜遗传距离最小的是抱茎獐牙菜,他们之间存在 16 个碱基的区别;在獐牙菜属中与川西獐牙菜遗传距离最大的为四数獐牙菜,有 36 个碱基的差异,而非獐牙菜属两个种的遗传距离分别为 62 和 42。利用 PAUP 进一步对川西獐牙菜及其混淆种进行分支分析。当 gap 当作缺

失状态时,获得两个最简约树,其步长 241 步,一致性指数(CI)和维持性指数(RI)分别为 0.851 和 0.697。两个树的一致性简约数没有明显改变其主要的拓扑结构(最简约树及其一致性树省略)。当 gap 作为第五碱基处理时,所获结果基本相似。在所有的聚类分析中抱茎獐牙菜始终与川西獐牙菜结合在一起,并得到鞋带分析(bootstrap) 100%支持。

Tab 2 Pair wise genetic distances of ITS sequences of *S. mussotii* and other adulterant species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>Halenia elliptica</i>	-	0.135	0.096	0.140	0.123	0.125	0.131	0.135	0.116
2 <i>Lomatogonium macranthum</i>	61	-	0.127	0.101	0.104	0.104	0.110	0.092	0.077
3 <i>Swertia. tetraptera</i>	44	58	-	0.124	0.120	0.118	0.125	0.111	0.114
4 <i>S. franchetiana</i>	64	46	57	-	0.100	0.102	0.109	0.035	0.072
5 <i>S. erythrosticata</i>	56	47	55	46	-	0.031	0.035	0.089	0.072
6 <i>S. przewalskii</i>	57	47	54	47	14	-	0.009	0.091	0.074
7 <i>S. wolfongiana</i>	60	50	57	50	16	4	-	0.098	0.078
8 <i>S. mussotii</i>	62	42	51	16	41	42	45	-	0.065
9 <i>S. chirayita</i>	53	35	52	33	33	34	36	30	-

讨 论

ITS 基因片段在植物药的分子标记和鉴定中具有许多优势:基因片段短,扩增和测序容易,十分适合于储藏药材的分子操作。但是,在一些类群中 ITS 基因序列在同一种中随地理环境的分布有少量的变异^[4],使其在一些类群中的药材分子遗传标记和鉴定受到了限制。川西獐牙菜和抱茎獐牙菜不同地区不同样品的测序结果完全相同,说明同一种类不同居群间 ITS 序列较为稳定,可用来鉴定与标记不同的植物种类。在本研究中我们对川西獐牙菜和抱茎獐牙菜的药材与原植物在 DNA 提取、扩增和测序方面均设置了对照,药材 DNA 测序结果与原植物完全一致,说明利用药材标本进行 DNA 提取、扩增和测序工作是可信赖的,所得结果是可靠的。从不同居群、新鲜材料和市场任意购买的药材所得到的 ITS 序列一致,说明利用 ITS 序列来鉴定“藏茵陈”药材是十分可靠的。“藏茵陈”原植物川西獐牙菜及其混淆种类的每个种都有其特定的 ITS 变异位点,因此能在分子水平将他们区分开。根据目前我们得到的 ITS 序列,已可对市场的出现的“藏茵陈”种类进行检测。但扩增和测序工作费时、费力,且成本高。根据已知序列,可设计特异性分子快速鉴定试剂盒是更为廉价与简捷的方法。此外,龙胆科 ITS 在种内不同的分布生境中均较为稳定,而在种间却变异较大,如川西獐牙菜与抱茎獐牙菜相差 16 bp,说明 ITS 片段是鉴定众多龙胆科中藏药(如龙胆、秦艽等)最为理想的片段之一。

无论从遗传距离还是从分支图上,尼泊尔獐牙菜与川西獐牙菜的遗传关系均较远,与川西獐牙菜最为接近的是抱茎獐牙菜。川西獐牙菜为传统的“藏茵陈”藏药,分布局限,产量较少。而抱茎獐牙菜却分布较广,储量较大。在所有的市场混淆种中,分子证据表明抱茎獐牙菜最有可能成为“藏茵陈”的新植物来源。我们正在进行的植物化学成分分析比较也表明抱茎獐牙菜与川西獐牙菜的基本成分及其含量均较为相似,唯在芒果苷含量有一定差距;而其他种与川西獐牙菜之间则存在明显的化学成分及其含量的区别。

REFERENCES:

- [1] Yang YC. *Tibetan Medicine* [M]. Qinghai: Qinghai People Press, 1992. 111 - 112.
- [2] Sun HF, Hu BL, Ding J Y. Isolation and identification of the Xanthone constituents from *Swertia mussotti* [J]. *Acta Bot Sin* (in Chinese), 1991, **33**(7): 798 - 781.
- [3] Wang YQ, Zhou YK, Xu LS, *et al.* Authentication of the Chinese crude “Wu Shao Se” (*Zoocys dhumnades*) [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1999, **34**(1): 67 - 71.
- [4] Cai JN, Zhou KY, Xu LS, *et al.* Ribosomal DNA ITS sequence analyses of *Cnidium monnieri* from different geographical origin in China [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 2000, **35**(1): 56 - 59.
- [5] Cao H, Bei PX, Shao PZ. Authentication of the Chinese drug “Ku-Di-Dan” (Herba Elephantopi) and its substitutes using random-primed polymerase chain reaction [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1996, **31**(6): 543 - 548.
- [6] Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from plant tissues [A]. *Plant Molecular Biology Manual* [M], 1988, A6: 1 - 15.
- [7] Yuan YM, Kupfer P. Molecular phylogenetics of the subtribe Gentianinae (Gentianaceae) inferred from the sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst Evol*, 1995, **196**(2): 207 - 226.
- [8] Higgins DG. Clustal V: Multiple alignment of DNA and protein sequences [A]. Griffin AM, Griffin HG. *Computer Analysis of Sequence Data. Part II* [M]. Totowa. New Jersey: Humana Press. 1994. 307 - 311.
- [9] Swofford DL. Computer program distributed by the illinois natural history survey [A]. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony Version 3. 1. 1.* [M]. Champaign, Illinois. 1993. 1 - 150.
- [10] Shaw PC, But PH. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction [J]. *Planta Med*, 1995, **61**: 466 - 469.
- [11] DeSalle R, Birstein VJ. PCR identification of black caviar [J]. *Nature*, 1996, **381**: 197.
- [12] Ngan F, Shaw P, But P, *et al.* Molecular authentication of *Panax species* [J]. *Phytochemistry*, 1999, **50**: 787.
- [13] Zhang YB, Ngan FN, Wang ZT, *et al.* Random primed polymerase chain reaction differentiates *Codonopsis pilosula* from different localities [J]. *Planta Med*, 1999, **65**: 157 - 160.
- [14] Cai ZH, Li P, Dong TTX, *et al.* Molecular diversity of 5S rRNA spacer domain in *Fritillaria* species revealed by PCR analysis [J]. *Planta Med*, 1999, **65**: 360 - 364.

A COMPARISON OF THE ITS SEQUENCES OF THE TIBETAN MEDICINE “ ZANG YIN CHEN ” — SWERTIA MUSSOTTI AND ITS ADULTERANT SPECIES

LIU Jian-quan^{1,2}, CHEN Zhi-duan², LIAO Zhi-xin¹, LU An-min²

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

ABSTRACT: AIM To identify the medicine and search for new medicine resource at the molecular level, the ITS of “Zang Yin Chen” — *Swertia mussotti* and its adulterant species were sequenced. **METHODS** The double-stranded DNA was amplified using PCR systems 9 600 kits and sequenced on an ABI 377 automated sequencer from both directions. **RESULTS** The ITS sequences of *S. mussotti* in different populations showed no variation. It has the unique ITS sequence and shows distinct difference from its adulterant species. In the phylogenetic tree based on the ITS data of *S. mussotti* and all vicarious species constructed by Paup, *S. franchetiana* and *S. mussotti* clustered together with high bootstrap support. **CONCLUSION** ITS sequences can be used for the molecular authentication between the *S. mussotti* and its adulterant species. *S. franchetiana* can be regarded as a new medicine resource of “Zang Yin Chen”.

KEY WORDS: Tibetan medicine; Zang Yin Chen; internal transcribed spacers; *Swertia mussotti*; *S. franchetiana*; authentication