

辽宁省白头翁属植物分类与基于 ITS2 的 DNA 条形码分子鉴定

梁勇满, 许亮*, 陈思有, 王佳豪, 王冰, 康廷国
(辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**进一步总结辽宁省白头翁属植物种类,为合理开发保护白头翁属植物资源提供依据。**方法:**从植物形态、花粉粒、基于内转录间隔区(ITS2)序列的 DNA 条形码分子鉴定三方面对辽宁省白头翁属植物进行分类与鉴定研究。**结果:**在全国第四次中药资源普查中,笔者经实地调查白头翁属植物的形态特征、花粉粒微观形态、基于 ITS2 序列的 DNA 条形码分子鉴定等,确证了一种新种白头翁-岩生白头翁(*Pulsatilla saxatilis*)的存在;确证了兴安白头翁(*P. dahurica*),白花白头翁(*P. chinensis*)两种辽宁省新记录;确证了在大连市大黑山、鞍山市千山有金县白头翁(*P. chinensis* var. *kissii*)的存在。**结论:**辽宁地区为白头翁的主产区之一,白头翁药材基本都为野生,价格逐年上涨,加之开荒种地等原因,辽宁地区白头翁属资源正在逐年锐减,更加造成了白头翁属植物资源的匮乏,急需加快栽培技术研究,保护白头翁属植物野生资源的多样性和保证白头翁药材的可持续利用。

[关键词] 辽宁省;白头翁属植物;ITS2序列;鉴定与分类;资源保护

[中图分类号] R281;R931.5;Q948;R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0036-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181417

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180427.1815.002.html>

[网络出版时间] 2018-04-28 10:27

Classification of *Pulsatilla* Adans and Molecular Identification of DNA Barcodes Based on ITS2 Sequence in Liaoning Province

LIANG Yong-man, XU Liang*, CHEN Si-you, WANG Jia-hao, WANG Bing,
KANG Ting-guo
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To further summarize the species of *Pulsatilla* Adans in Liaoning province, in order to provide basis for rational development and protection of resources of the species. **Method:** The classification and identification of *Pulsatilla* Adans in Liaoning province were studied in three aspects: plant morphology, pollen grains and DNA barcode molecular identification based on internal transcribed space (ITS2) sequence. **Result:** In the fourth census of resources of traditional Chinese medicine, we investigated the characteristics of the plants of the genus *Pulsatilla* Adans morphological, the microstructure of the pollen grain, ITS2 sequences of DNA-based molecular identification of bar code, etc., confirmed a new species of *Pulsatilla* Adans-*P. saxatilis*. Two new records of *P. dahurica* and *P. chinensis* in Liaoning province were confirmed. The existence of *P. chinensis* var. *kissii* was confirmed in Dalian and Anshan. **Conclusion:** Liaoning is one of the main producing areas of *Pulsatillae* Radix. Because *Pulsatillae* Radix is mostly wild, the price has been rising ever year.

[收稿日期] 20171016(001)

[基金项目] 辽宁中医药大学杰出青年基金项目(20121228);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目(LJQ2014101);中医药行业科研专项(201407002);中央本级重大增减支项目(2060302);国家自然科学基金面上项目(81773852)

[第一作者] 梁勇满,在读硕士,从事中药种质与资源鉴定研究,E-mail:1486171139@qq.com

[通信作者] *许亮,教授,硕士生导师,从事中药鉴定与品质评价研究,E-mail:861364054@qq.com

Besides, due to land reclamation and other reasons, *Pulsatilla* Adans resources in Liaoning province have been sharply declined year by year, which caused the lack of *Pulsatilla* Adans plant resources more seriously. Therefore, it's urgent to speed up the cultivation of technological research and protection of wild resources, so as to ensure the sustainable use of *Pulsatillae* Radix resources.

[Key words] Liaoning province; *Pulsatilla* Adans; internal transcribed spacer 2; identification and classification; resource conservation

辽宁省位于中国东北地区南部,地处北纬 38°43'~43°26',东经 118°53'~125°46',地貌主要由东部山区丘陵、西部山区丘陵及中部的辽河平原组成。辽宁省地处欧亚大陆东岸、中纬度地区,属于温带大陆性季风气候区,境内四季分明,但降雨量不均;受季风气候影响,各地气温差异较大^[1]。随着辽宁第四次中药资源普查工作的进行,笔者对辽宁省白头翁属植物进行了整理,发现了包括兴安白头翁、白花白头翁的 2 种辽宁省新纪录;凤城白云山首次发现岩生白头翁新物种,极大丰富了辽宁省白头翁属植物资源资料。通过白头翁本草考证发现^[2],白头翁属多种植物药材用于临床且主要来自野生,导致白头翁资源日趋减少。所以很有必要对辽宁地区白头翁属植物进行收集整理,保护野生白头翁属植物资源,进一步为栽培白头翁植物提供科学依据,保证白头翁资源的可持续利用。

1 材料

SU8000 型扫描电子显微镜(日本日立公司),SBC-12 型小型离子溅射仪(北京中科科仪股份有限公司),HH-ZK 型数控恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司),G1000 改进型基因 PCR 仪(杭州博

日科技有限公司),TGL-16M 型高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),EPS-600 型电泳仪和 Tabnon-4100 凝胶成像处理系统(上海天能科技有限公司),ABI3730XL 型测序仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

离心柱型天根植物基因 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号 Q5302);Taq Master Mix(北京康为世纪,批号 50114);引物(北京六合华大基因股份有限公司,批号 BJP12161703304);Trans2k DNA Marker(大连宝生物股份有限公司,批号 A2001D);琼脂糖(批号 111860)和溴化乙锭(EB,批号 E60735)均来自上海 Sangon 公司;其余试剂均为分析纯。

药材样本来源见表 1,包括实验样本和 GenBank 中下载的序列,共 3 属 49 个样本,其中白头翁属 47 个及外类群银莲花 1 个、獐耳细辛 1 个。实验样本均经辽宁中医药大学王冰教授鉴定,存于辽宁中医药大学药用植物标本室。下载 GenBank 的序列经 BLAST 鉴定为实验样本的近缘种。在花期,分别摘取白头翁、朝鲜白头翁、兴安白头翁、岩生白头翁各 3 朵新鲜花自然干燥,备用。

表 1 白头翁样本来源及 ITS2 序列 GenBank 登录号

Table 1 Source of sample and ITS2 sequence GenBank accession number

No.	药材	拉丁学名	样本类型	采集地及来源	经度(E)	纬度(N)	GenBank 登录号
A1	白头翁	<i>Pulsatilla chinensis</i>	叶片	DL-1	121°49'	39°06'	KY224049
A2	白头翁	<i>P. chinensis</i>	叶片	DL-2	121°49'	39°06'	KY224052
A3	白头翁	<i>P. chinensis</i>	叶片	AS-1	123°08'	41°03'	KY224050
A4	白头翁	<i>P. chinensis</i>	叶片	AS-2	123°08'	41°03'	KY224051
A5	白头翁	<i>P. chinensis</i>	叶片	AS-3	123°08'	41°03'	KY224053
A6	白头翁	<i>P. chinensis</i>	根	DL-1g	121°49'	39°06'	KY346839
A7	白头翁	<i>P. chinensis</i>	根	AS-1g	123°08'	41°03'	KY346840
B1	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	叶片	SY-1	123°44'	41°34'	KY224033
B2	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	叶片	SY-2	123°44'	41°34'	KY224034
B3	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	叶片	SY-3	123°44'	41°34'	KY224035
B4	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	叶片	SY-4	123°44'	41°34'	KY224036

续表 1

No.	药材	拉丁学名	样本类型	采集地 及来源	经度 (E)	纬度 (N)	GenBank 登录号
B5	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	叶片	JH-1	127°36′	43°35′	KY224032
B6	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	叶片	FS-1	125°06′	41°42′	KY224041
B7	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	叶片	FS-2	125°06′	41°42′	KY224040
B8	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	根	SY-1g	123°44′	41°34′	KY346841
B9	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	根	SY-2g	123°44′	41°34′	KY346842
B10	朝鲜白头翁	<i>P. cernua</i>	根	FS-1g	125°06′	41°42′	KY346843
C1	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	叶片	XF-1	124°45′	42°31′	MF196248
C2	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	叶片	XF-2	124°45′	42°31′	MF196249
C3	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	叶片	XF-3	124°45′	42°31′	MF196250
C4	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	叶片	XF-4	124°45′	42°31′	MF196251
C5	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	叶片	XF-5	124°45′	42°31′	MF196252
C6	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	叶片	XF-6	124°45′	42°31′	MF196253
C7	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	叶片	XF-7	124°45′	42°31′	MF196254
C8	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	叶片	XF-8	124°45′	42°31′	MF196255
C9	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	根	XF-9	124°45′	42°31′	MF196256
C10	兴安白头翁	<i>P. dahurica</i>	根	XF-10	124°45′	42°31′	MF196257
D1	细叶白头翁	<i>P. turczaninovii</i>	叶片	TL-1	119°48′	45°13′	KY224027
D2	细叶白头翁	<i>P. turczaninovii</i>	叶片	TL-2	119°48′	45°13′	KY224028
D3	细叶白头翁	<i>P. turczaninovii</i>	叶片	TL-3	119°49′	45°17′	KY224029
D4	细叶白头翁	<i>P. turczaninovii</i>	叶片	TL-4	119°49′	45°17′	KY224030
D5	细叶白头翁	<i>P. turczaninovii</i>	叶片	TL-5	119°49′	45°18′	KY224031
D6	细叶白头翁	<i>P. turczaninovii</i>	根	TL-1g	119°49′	45°17′	KY346846
D7	细叶白头翁	<i>P. turczaninovii</i>	根	TL-2g	119°50′	45°23′	KY346847
E1	岩生白头翁	<i>P. saxatilis</i>	叶片	DF-1	124°17′	40°27′	MF196258
E2	岩生白头翁	<i>P. saxatilis</i>	叶片	DF-2	124°17′	40°27′	KY224043
E3	岩生白头翁	<i>P. saxatilis</i>	叶片	DF-3	124°17′	40°27′	KY224044
E4	岩生白头翁	<i>P. saxatilis</i>	叶片	DF-4	124°17′	40°27′	KY224045
E5	岩生白头翁	<i>P. saxatilis</i>	叶片	DF-5	124°17′	40°27′	KY224046
E6	岩生白头翁	<i>P. saxatilis</i>	叶片	DF-6	124°17′	40°27′	KY224047
E7	岩生白头翁	<i>P. saxatilis</i>	叶片	DF-7	124°17′	40°27′	KY224048
F1	金县白头翁	<i>P. chinensis</i> var. <i>kissii</i>	叶片	DL-3	121°49′	39°06′	KY270958
F2	金县白头翁	<i>P. chinensis</i> var. <i>kissii</i>	叶片	DL-4	121°49′	39°06′	KY270959
F3	金县白头翁	<i>P. chinensis</i> var. <i>kissii</i>	叶片	AS-4	121°49′	39°06′	KY270960
F4	金县白头翁	<i>P. chinensis</i> var. <i>kissii</i>	叶片	AS-5	121°49′	39°06′	KY270961
G	肾叶白头翁	<i>P. patens</i>	-	GenBank	-	-	AM267280
H1	-	<i>P. tongkanensis</i>	-	GenBank	-	-	JN811081
H2	-	<i>P. tongkanensis</i>	-	GenBank	-	-	JN811082
H3	-	<i>P. tongkanensis</i>	-	GenBank	-	-	JN811083
I	银莲花	<i>Anemone cathayensis</i>	-	GenBank	-	-	AM267291
J	獐耳细辛	<i>Hepatica nobilis</i> var. <i>asiatica</i>	-	GenBank	-	-	EU370102

注:采集地分别为 DL. 辽宁省大连市大黑山;AS. 辽宁省鞍山市千山区;SY. 辽宁省沈阳市苏家屯;FS. 辽宁省抚顺市;XF. 辽宁省铁岭市西丰县;DF. 辽宁省丹东市凤城市;DK. 辽宁省丹东市宽甸满族自治县;TL. 内蒙古通辽市;- . 此项无信息。

2 方法

2.1 花粉粒扫描电镜 将新鲜花朵自然干燥后,剥取花粉粒粘于双面透明胶上,真空镀金,然后置于日立SU-8000型扫描电子显微镜下,选取每种具代表性的性状、外壁雕纹等进行观察和拍照。在电镜下随机测量20粒花粉粒的赤道轴长、极轴长,计算平均值。

2.2 基于转录间隔区(ITS)2序列的DNA条形码分子鉴定

2.2.1 总DNA的提取 选取硅胶干燥的叶片约30 mg,研磨粉碎,使用天根植物基因DNA提取试剂盒(离心柱型)提取总DNA,具体步骤严格按照试剂盒流程操作。

2.2.2 PCR扩增及产物测序 扩增引物ITS2序列包括正反2个方向,上游引物:5'-ATGCGATACTTGGTGTAAT-3';下游引物:5'-GACGCTTC TCCAGACTACAAT-3'。PCR反应体系为50 μ L:含有上、下游引物各2.0 μ L (2.5 μ mol \cdot L⁻¹), Tap Master Mix 25 μ L,总DNA(约40 ng)4.0 μ L,加RNase-Free水(17 μ L)补足至50 μ L。扩增程序为94 $^{\circ}$ C变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,56 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s(35个循环),72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR扩增产物经纯化后采用双向测序。

2.2.3 数据处理 测序后的序列经DNAMAN 8.0软件拼接、校对,使用MEGA 6.0软件进行分析比对,计算遗传距离(K2P)并对数据进行处理。利用邻接法(NJ)构建系统进化树和BLAST进行序列比对,鉴定各样本^[3-4]。

3 结果与分析

3.1 植物形态^[5]

3.1.1 白头翁 植株高15~35 cm。根状茎粗约为0.8~1.5 cm。基生叶4~5;叶片宽卵形,三全裂,中全裂片有柄或近无柄,宽卵形,又三深裂,中深裂片楔状倒卵形,全缘或有齿;叶柄有密长柔毛。花葶1或2,萼片蓝紫色;雄蕊长约为萼片之半。聚合瘦果。4月至5月开花。分布于辽宁省沈阳、鞍山、大连等地。

3.1.2 金县白头翁 与白头翁的区别,叶三出羽状分裂,末回裂片比白头翁较狭。分布于辽宁省鞍山市千山、大连市大黑山地区。

3.1.3 白花白头翁 与白头翁的区别,萼片及花柱均为白色,非蓝紫色。分布于辽宁省葫芦岛市南票地区。见图1。

3.1.4 朝鲜白头翁 植株高14~28 cm。根状茎



图1 白花白头翁生境及植物形态

Fig.1 *Pulsatilla chinensis* habitat and plant morphology

长达10 cm。基生叶4~6,叶片卵形,三全裂,一回中全裂片有细长柄,五角状宽卵形,又三全裂,表面近无毛,背面密被柔毛。花萼片紫红色,外面有密柔毛;雄蕊长约为萼片之半。聚合瘦果。4月至5月开花。分布于辽宁省沈阳、鞍山、抚顺、大连、凤城、宽甸等地。

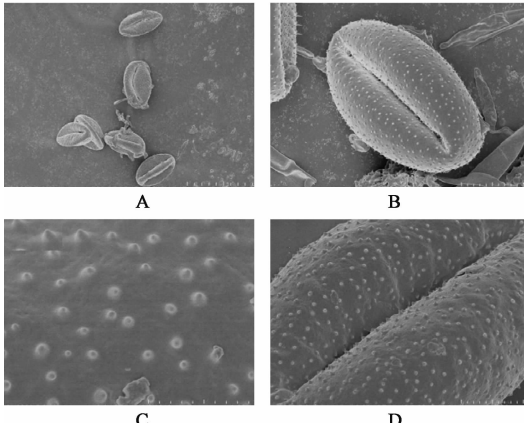
3.1.5 兴安白头翁 植株高25~40 cm。根状茎长达16 cm。基生叶7~9,有长柄;叶片卵形三全裂,一回中全裂片有细长柄,又三全裂,表面近无毛,背面沿脉疏被柔毛;花葶2~4,萼片紫灰色。聚合瘦果。5月至6月开花。分布于辽宁省铁岭市西丰县榆树川镇河沟边荒地。

3.1.6 岩生白头翁 多年生草本,高9~20 cm。根状茎粗0.5~1 cm。基生叶6~11;叶片长卵形,三全裂或近三出羽状分裂,一回中全裂片具细柄,近心形,三全裂,二回全裂片三深裂,末回裂片楔形,上部有2~3小裂片或齿,一回侧全裂片与一回中全裂片相似,花葶1或2,直立;花直立,萼片6~12,淡蓝色、淡蓝白色或白色,聚合瘦果。花期5月中下旬。果期6月。分布于辽宁省丹东市凤城市白云山海拔1100 m以上的峭壁岩石,分布区域狭小,建议在当地建立保护区。

3.2 花粉粒形态

3.2.1 白头翁^[6] 花粉特征:花粉粒长球形或近球形,极面观为三裂圆形。大小为45.5(40.0~48.7) μ m \times 38.4(33.1~40.0) μ m。三沟宽而长,几乎达两极,有时在极区汇合,边不平,末端圆,沟膜上具末端较钝的小刺,沟常有变异,有时具四沟和六散沟的花粉出现。表面具小刺,小刺大小不一,有时2~3粒小刺排列成堆或成行。见图2。

3.2.2 朝鲜白头翁^[6] 花粉特征:花粉粒近球形,极面观为三裂圆形。大小为31.3(27.8~

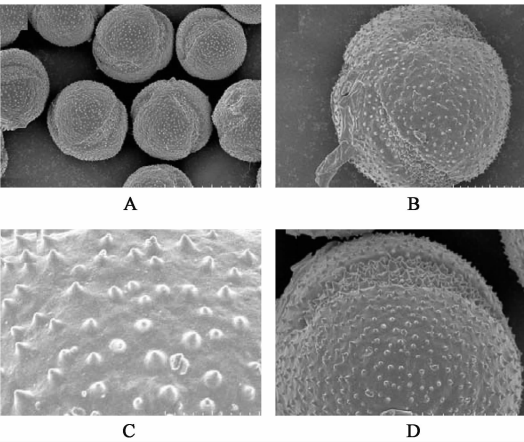


A. 花粉粒群 (×500); B. 花粉粒 (×2 000); C. 表面纹饰及小刺 (×10 000); D. 散孔 (×4 000)

图 2 白头翁花粉粒形态特征

Fig. 2 *Pulsatilla chinensis* morphological characteristics of pollen grains

34.8) μm 。具三沟,沟较明显,边不平,末端尖或圆,沟膜上具小刺。表面具小刺,分布较密集不均匀,顶部尖而短,基部具有垫状隆起。表面纹饰不平。见图 3。

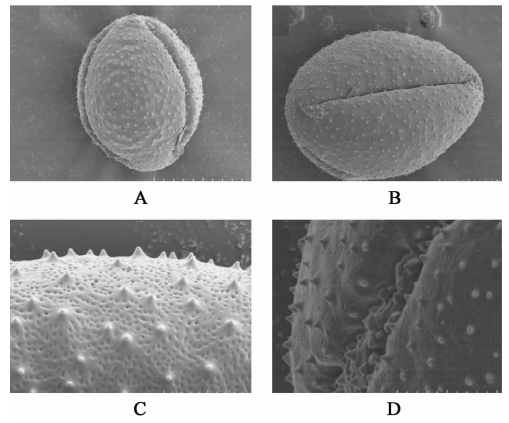


A. 花粉粒群 (×900); B. 花粉粒 (×2 500); C. 表面纹饰及小刺 (×10 000); D. 散孔 (×3 000)

图 3 朝鲜白头翁花粉粒形态特征

Fig. 3 *Pulsatilla cernua* morphological characteristics of pollen grains

3.2.3 兴安白头翁^[6] 花粉特征:花粉粒球形,有时长,有时扁,极面观为三裂圆形。大小为 31.3 (27.8 ~ 33.1) μm 。具三沟,沟较短而宽,末端圆,边不整齐,膜不平,其上具小刺。沟常有变异型出现,有时为规则的六散沟。表面不平,呈沙丘状或波浪状升高。小刺基部隆起不明显。小穿孔明显,圆形,分布在小刺之间的低凹处,小刺基部有一小块无穿孔区。见图 4。

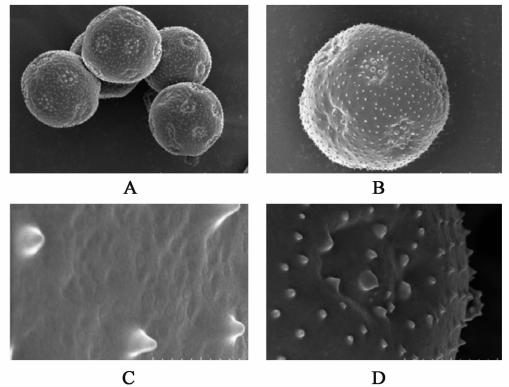


A. 花粉粒 1 (×1 800); B. 花粉粒 2 (×2 500); C. 表面纹饰及小刺 (×10 000); D. 散孔 (×7 500)

图 4 兴安白头翁花粉粒形态特征

Fig. 4 *Pulsatilla dahurica* morphological characteristics of pollen grains

3.2.4 岩生白头翁 花粉特征:花粉粒球形,大小为 27.68 (27.14 ~ 30.33) μm 。具 9 ~ 12 散孔,孔形状不规则,多数为圆形,界限清楚。表面具小刺,分布较稀疏不均匀,顶部尖而短,基部具有垫状隆起。散孔内小刺较大,基部也具有垫状隆起。表面纹饰不平。见图 5。



A. 花粉粒群 (×900); B. 花粉粒 (×2 500); C. 表面纹饰及小刺 (×30 000); D. 散孔 (×7 500)

图 5 岩生白头翁花粉粒形态特征

Fig. 5 *Pulsatilla saxatilis* morphological characteristics of pollen grains

4 基于 ITS2 序列的 DNA 条形码分子鉴定

4.1 ITS2 序列物种鉴定分析 白头翁属 37 个样本 ITS2 序列的 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳总 DNA 提取成功率 100%;ITS2 序列的白头翁属 37 个样本扩增成功率 100%;测序成功率 100%。对测序所得峰图分析可知,各序列的碱基质量值均 > 20。

4.2 种内和种间变异 白头翁属 41 个样本 ITS2 序列长度为 218 ~ 219 bp。应用 MEGA 6.0 软件进

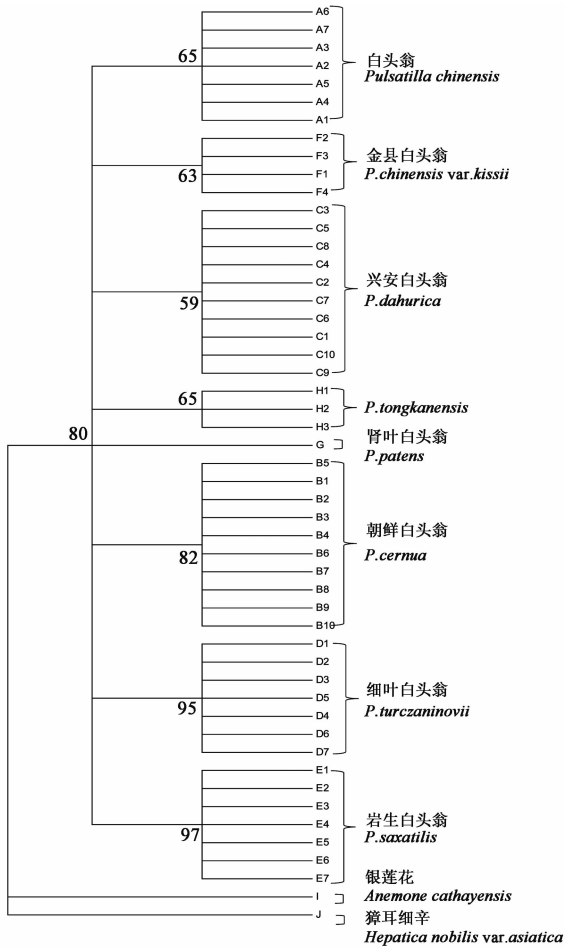


图 7 样本基于 ITS2 序列构建的 NJ 系统聚类树
Fig. 7 Neighbor-joining tree of samples based on ITS2 sequences

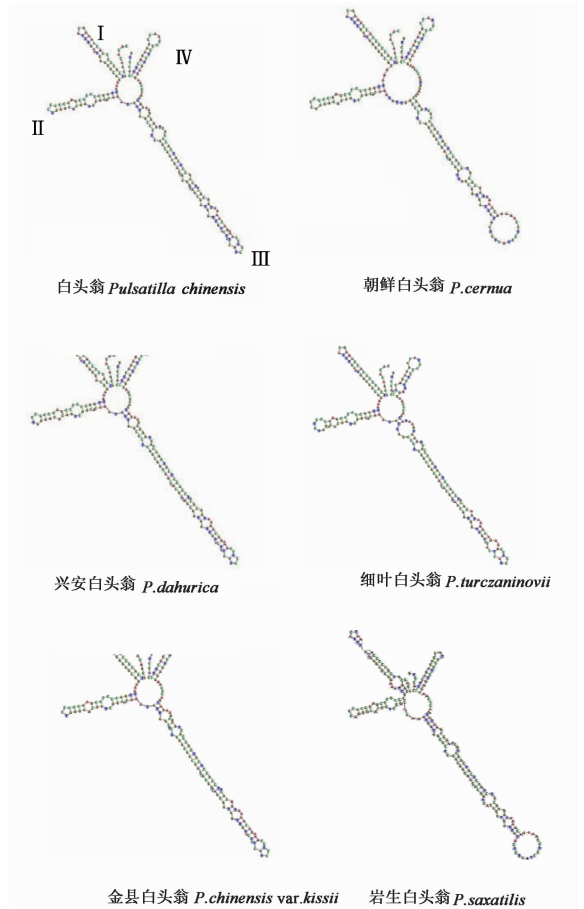


图 8 白头翁属植物的 ITS2 序列的二级结构比较
Fig. 8 Secondary structure comparison of ITS2 sequence of Pulsatilla Adans

白头翁等构建的 NJ 树进一步确证了兴安白头翁、岩生白头翁在辽宁省的分布。目前市售白头翁药材商品来源混乱、复杂,因此建立有效的中药白头翁来源的鉴定方法非常迫切。本实验通过对白头翁原植物及根茎药材的 ITS2 序列比较研究,结果表明 DNA 条形码技术可以应用于中药材鉴定来源的问题,可以为鉴定植物的种类及发现新物种提供了新方法,也可以为商品白头翁药材鉴定提供新的技术手段。

[参考文献]

[1] 李雪铭,程振杰,丛雪萍. 辽宁省城市发展的自然地理背景质量分析[J]. 辽宁师范大学学报:自然科学版,2016,39(1):103-110.
[2] 梁勇满,赵容,许亮,等. 中药白头翁本草考证与中国白头翁属植物分类[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):203-209.
[3] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring

verylarge phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101(30):11030-11035.

[4] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximumlikelihood, evolutionary distance, and maximumparsimony methods [J]. Mol Biol Evol,2011,28(10):2731-2739.
[5] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志. 第二十八卷[M]. 北京:科学出版社,1980:65.
[6] 席以珍. 白头翁属的花粉形态研究[J]. 中国科学院大学学报,1985,23(5):336-343.
[7] 蔡振娇,关兴东,李忠宇,等. 辽宁省凤城市第四次中药资源普查(试点)研究初报[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(21):32-35.

[责任编辑 顾雪竹]