

基于 ITS2 序列的苍术属植物遗传关系

姜宇珺, 张北雪, 马善鹏, 孙建之, 才谦*
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**应用内部转录间隔区 2 (ITS2) 序列鉴定东北产栽培和野生苍术及其近缘种药材, 明确其种间遗传关系远近, 并对东北产朝鲜苍术的栽培起源进行初步探索。**方法:**提取不同栽培区包括北苍术、朝鲜苍术在内的五种苍术属 40 份样本以及朝鲜苍术 7 份野生种质样本的基因组 DNA, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 ITS2 序列并进行双向测序, 所得所有序列用 MEGA5.0 软件进行比对分析 (clustal W), 去除两端 5.8S 和 28S 序列, 获得完整的 ITS2 序列, 构建系统聚类树 (NJ 树)。**结果:**苍术属 5 种药材 ITS2 序列长度均为 232 bp。根据 NJ 树和 ITS2 二级结构结果, 除北苍术和朝鲜苍术未被区分开, 其余几种药材均可明显区分, 表现出良好的单系性。根据 NJ 树结果可知, 朝鲜苍术的栽培品系和野生种质也能很好的聚在一起。**结论:**ITS2 序列能稳定、准确鉴别苍术属 5 种药材。朝鲜苍术与北苍术亲缘关系很近, 可认为是苍术北方分支中的一种变种, 建议将朝鲜苍术并入北苍术。且在辽宁有大规模栽培的朝鲜苍术可能起源于辽宁本地的野生群体, 种源可能来自于辽宁岫岩等地的野生种。

[关键词] 苍术属; 关苍术; 朝鲜苍术; 内部转录间隔区 2 (ITS2); 遗传关系; 二级结构

[中图分类号] R284.1; R282.6; R22; R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0171-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191913

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190617.0938.005.html>

[网络出版时间] 2019-06-17 16:37

Molecular Identification of *Atractylodes* Plants Based on ITS2 Sequence

JIANG Yu-jun, ZHANG Bei-xue, MA Shan-peng, SUN Jian-zhi, CAI Qian*

(School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the genetic relationship of cultivated and wild *Atractylodes* and its closely related species by using the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) barcode, in order to explore the cultivation origin of *A. coreana* from Northeast China. **Method:** Genomic DNAs were extracted from 40 samples of *Atractylodes* and its closely related species from different cultivated habitats, and 7 samples of wild *A. coreana* were also extracted. The ITS2 sequences of these samples were amplified, and bidirectional sequencing was conducted by polymerase chain reaction (PCR). Totally 47 ITS2 sequences were aligned by using MEGA 5.0, 5.8S and 28S sequences were removed to obtain the complete ITS2 sequence and build neighbor-joining (NJ) tree. **Result:** The lengths of ITS2 sequences of all samples were 232 bp. The NJ tree and the secondary structures of ITS2 showed that various varieties could be distinguished obviously except *A. chinensis* and *A. coreana*, which showed a good monophyly. The NJ tree showed that cultivated and wild *A. coreana* can also get together very well. **Conclusion:** As a DNA barcode, ITS2 sequences can be used to stably and accurately distinguish various varieties of *Atractylodes*. The relationship between *A. chinensis* and *A. coreana* is very close. *A. coreana* can be considered as a variant of *A. coreana* in North China. It is recommended to incorporate *A. coreana* into *A. chinensis*. The large-scale cultivation of *A. coreana* may originate from local wild population in Liaoning province, and the provenance

[收稿日期] 20181223(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573601)

[第一作者] 姜宇珺, 在读硕士, 从事生药学相关研究, E-mail: 365421596@qq.com

[通信作者] *才谦, 博士, 教授, 从事生药学相关研究, Tel: 0411-85890122, E-mail: caiqianmail@sina.com

may come from Xiuyan and other places in Liaoning province.

[Key words] *Atractylodes*; *A. japonica*. ; *A. coreana*; ITS2; genetic relationship; secondary structure

2015 年版《中国药典》收载北苍术 *Atractylodes chinensis* 与茅苍术 *A. lancea* 作为菊科植物苍术药材来源,而主产于东北三省的关苍术 *A. japonica* 和朝鲜苍术 *A. coreana* 并未收录,但在《中国植物志》中有详细记载。在辽宁境内有较多野生和栽培的关苍术和朝鲜苍术资源,并被作为苍术使用。白术为菊科植物苍术属白术 *A. macrocephala* 的干燥根茎。白术与苍术均能健脾、燥湿,治疗脾失健运、湿浊中阻^[1]。但白术以健脾益气为主,为补脾要药,适用于脾虚湿困而偏于虚证者;苍术以苦温燥湿为主,为运脾要药,适用于湿浊内阻而偏于实证者。本课题组前期研究表明,关苍术虽名为苍术,但其中所含的化学成分与 2015 年版《中国药典》收录的茅苍术和北苍术差别较大,而与白术较相似,且在日本关苍术作为白术使用。所以,关苍术到底应该作为白术使用还是作为苍术使用还需进行深入研究。

DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术,对传统形态鉴别方法给予了有效补充。根据其研究对象和内容的差异,已广泛应用于各行各业,例如中药鉴定学、系统分类学、发育进化、生态学、生物多样性保护等各个领域^[2]。其中在中药材亲缘物种的鉴定方面,中药材 DNA 条形码分子鉴定法^[3-4]为其提供了强有力的科技支撑,已经在药材党参、麻黄、锁阳、曼陀罗等^[5-11]药材及其混伪品的鉴定中取得了良好的效果。本文对东北栽培苍术及其近缘种进行 DNA 条形码的鉴定研究,从遗传关系方面对其进行聚类分析,拟从亲缘关系远近方面为关苍术和朝鲜苍术的合理应用提供一定依据,并初步探索东北产朝鲜苍术的进化起源。

1 材料

本文在辽东地区收集了当地栽培的关苍术、北苍术和朝鲜苍术,以及采自道地产地的茅苍术和白术栽培品系共 40 个样品;收集辽宁各地野生种质的朝鲜苍术共 7 个样品,见表 1。样本经辽宁中医药大学药用植物教研室许亮教授鉴定均为正品。

Fresco 型台式冷冻离心机(德国 Heraeus 公司); HH-ZK2 型二空水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);MG96G 型聚合酶链式反应(PCR)仪(杭州朗基科学仪器有限公司);EPS-600 型电泳仪,Tanon-4100 型凝胶图像处理系统(上海天能科技有限公司);ABI-

表 1 材料产地及其内转录间隔区 2 (ITS2) 序列信息

Table 1 Habitats of samples used in present study and its ITS2 sequences

编号	近缘物种	植物拉丁名	产地	种植方式
1~5	北苍术	<i>Atractylodes chinensis</i>	辽宁清原	栽培
6~10	北苍术	<i>A. chinensis</i>	辽宁宽甸	栽培
11~15	关苍术	<i>A. japonica</i>	辽宁清原	栽培
16~20	关苍术	<i>A. japonica</i>	辽宁宽甸	栽培
21~27	茅苍术	<i>A. lancea</i>	湖北襄阳	栽培
28~30	朝鲜苍术	<i>A. coreana</i>	辽宁大连	野生
31~32	朝鲜苍术	<i>A. coreana</i>	辽宁岫岩	野生
33~34	朝鲜苍术	<i>A. coreana</i>	辽宁盖州	野生
35~37	朝鲜苍术	<i>A. coreana</i>	辽宁清原	栽培
38~42	白术	<i>A. macrocephala</i>	浙江于潜	栽培
43~47	白术	<i>A. macrocephala</i>	浙江新昌	栽培

注:序列长度均为 232 bp,GC 含量均为 69%。

3130xl 型基因测序仪(美国 ABI 公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒, *Taq* PCR Master Mix, ddH₂O(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 D1500, 20180824, PC1120); 引物(Invitrogen Biotechnology Co. Ltd, 批号 ESO5222591); DNA Marker(100~5 000 bp)(北京天根生化科技有限公司,批号 MD171211),其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 DNA 提取 选取硅胶干燥的植物叶片约 30~40 mg,研磨粉碎取细粉,使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,具体步骤按照试剂盒操作说明书进行。

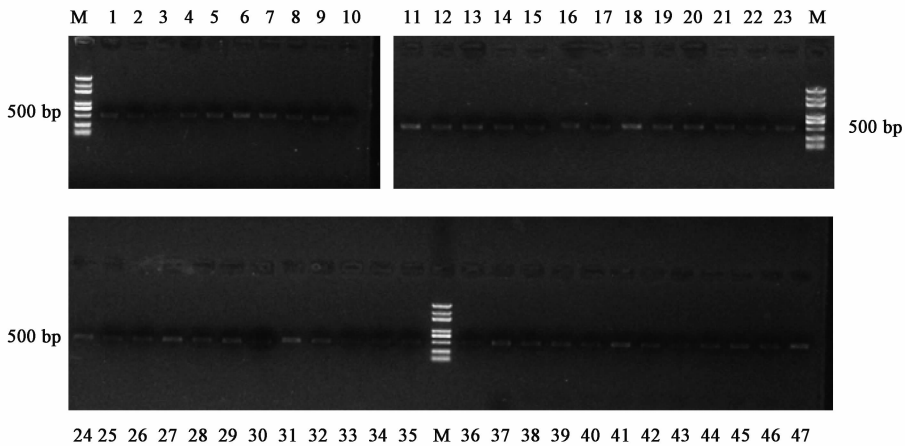
2.2 PCR 扩增及测序 ITS2 正向引物:ITS2F(5'-ATGCCGATACTTGGTGTGAAT-3'),反向引物:ITS3R(5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'),反应体系 25 μL,包括 2 × *Taq* PCR Master Mix 12.5 μL,正反向引物各 1 μL, DNA 模板 2~3 μL,其余体积以 ddH₂O 补充。反应条件为 94 °C 变性 5 min;再进行 40 个循环的 94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s;最后 72 °C 延伸 10 min^[11]。PCR 扩增产物经纯化后,使用 ABI-3130xl 基因测序仪进行测序。

2.3 数据处理 获得测序数据后,基于测序峰值图去除序列两端的测序质量较低区域,获得高质量的测序数据。基于隐马尔可夫模型的 HMM 注释及同源比对的方法,获得序列两端 5.8S 和 28S 区域的序列,使用 MEGA 5.0 软件进行比对分析(clustal W),

去除两端 5.8S 和 28S 序列,获得完整的 ITS2 序列,对两端缺失的序列进行删除操作,采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树。采用 RNA Structure 和 ITS2 在线网站 <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/#opennewwindow> 预测 ITS2 序列的二级结构。各个分支的支持率使用 bootstrap 重复 1 000 次进行检验。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增效果 对采集到的所有药材样品的 ITS2 序列分析发现,所有实验样本的 PCR 扩增效率为 100%,序列获得率(有效序列比例)为 100%,经琼脂糖凝胶电泳得到 PCR 扩增电泳图,扩增效果较好,电泳呈清晰明亮的单一条带,没有拖尾现象,见图 1。ITS2 序列扩增长度为 500 bp 左右。



M. 分子标记物 Marker; 1~47. 表 1 中相应编号的样本

图 1 PCR 扩增效果

Fig.1 Picture of PCR amplification effect

3.2 种内种间变异分析 苍术属 5 种植物 47 个样本 ITS2 序列长度均为 232 bp, GC 含量均为 69%。

应用 MEGA 5.0 软件对所有样品进行种间序列比对,不同物种间的碱基变异位点有 19 个,见表 2。

表 2 苍术属植物 ITS2 种间变异位点

Table 2 Variable sites in ITS2 sequence of *Atractylodes*

编号	变异位置/bp																		
	19	30	35	48	49	56	83	84	88	93	98	99	114	126	153	168	212	213	220
23	A	C	C	C	G	G	T	G	C	C	A	G	C	A	C	G	C	A	C
1,2,4~8,10	T	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	G	*
3	T	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	G	T
9	T	*	*	*	A	*	C	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	G	T
11	T	*	*	T	*	A	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*
12	T	*	*	*	*	A	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
13	*	*	T	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
14	T	*	*	T	*	A	C	A	T	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*
15	*	*	T	*	*	A	*	A	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
16	*	*	T	*	*	A	*	A	T	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*
17	T	*	T	T	*	A	*	A	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
18	*	*	T	*	*	A	*	A	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
19	*	*	T	*	*	A	*	A	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
20	*	*	*	T	*	A	*	A	T	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*
28	T	T	*	T	*	*	C	*	*	*	*	*	*	T	*	A	*	*	*
29	T	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	T
30	T	*	*	T	*	*	C	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*
38~40,44~46	G	*	*	*	*	*	C	*	*	*	C	*	*	T	T	*	T	*	*
41	G	*	*	*	*	*	C	*	*	*	C	*	*	T	T	*	T	*	*
47	G	*	*	*	*	*	C	*	*	*	C	C	*	T	T	*	T	*	*

注:“*”表示与第 1 列碱基相同(表 3 同)。

朝鲜苍术种内变异见表 3, 在朝鲜苍术的野生种质中, 只有采自辽宁大连的 3 个样本存在变异, 其余样本 ITS2 序列均与栽培品系一致。

表 3 朝鲜苍术种内变异位点

Table 3 Variable sites in ITS2 sequence of *Atractylodes coreana*

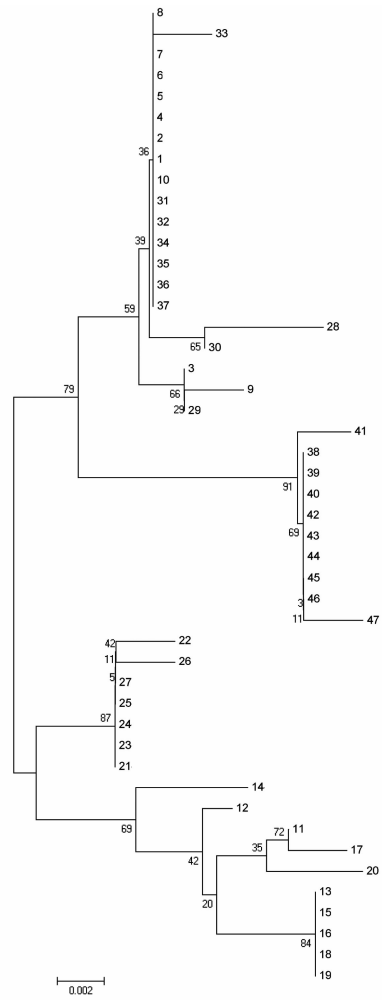
编号	变异位点/bp			
	30	48	168	220
31 ~ 37	C	C	G	C
28	T	T	A	*
29	*	*	*	T
30	*	T	*	*

3.3 系统发育树聚类分析 根据 ITS2 序列构建的 NJ 系统聚类树中可以看出, 苍术属 5 种的 47 个样品被聚为 4 大支, 除北苍术和朝鲜苍术未分开, 其余各品种种内样本均分别聚在一支, 表现出单系性, 且白术 bootstrap 支持率为 91%, 与其他种能够明显区分。见图 2。

3.4 ITS2 序列二级结构 根据图 3 可以看出, 所有物种的二级结构均为 1 个中心环(主环)及 4 个螺旋区构成。通过比较白术与苍术各近缘种的 ITS2 二级结构发现, 苍术属各种间的主要差异位于 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度, 但北苍术与朝鲜苍术的 ITS2 序列的二级结构却几乎无差异, 关苍术更接近茅苍术。

4 讨论

《中国植物志》主要依据叶片的形状、花序大小



Bootstrap 1 000 次重复, 分支支持率 ≥ 50%

图 2 基于 ITS2 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining tree of samples based on ITS2 sequences

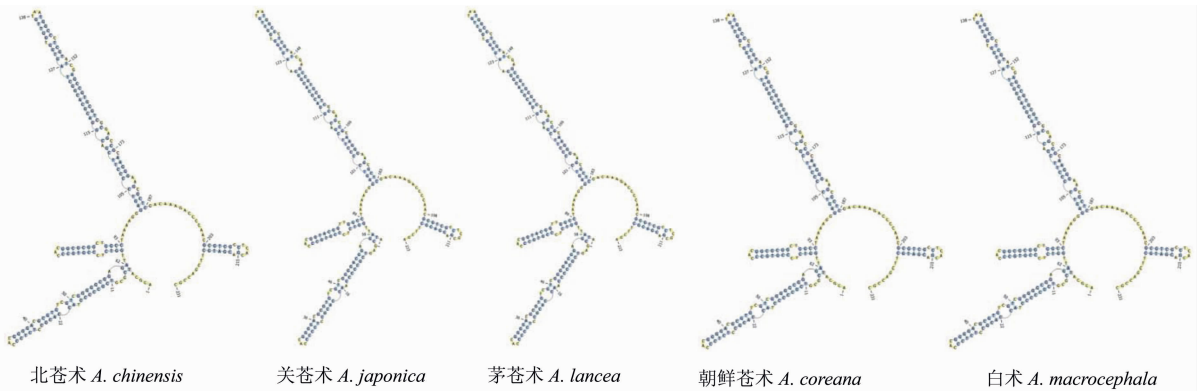


图 3 苍术属植物 ITS2 序列的二级结构比较

Fig. 3 Secondary structure comparison of ITS2 sequence of *Atractylodes*

及颜色将苍术分为白术、苍术、关苍术、朝鲜苍术、鄂西苍术 5 个种^[12]。其中被 2015 年版《中国药典》收录并栽培作药用的以苍术为主, 有茅苍术和北苍术

之分。茅苍术主要分布于湖北、安徽、浙江等省, 适宜生长在半阴半阳的丘陵地带。北苍术主要分布于中国北方, 如黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等地。就

北苍术而言,在北方部分地区将北苍术定义为北方的苍术,所以因其多样的商品概念还包括关苍术和朝鲜苍术,且在辽宁地区有大量种植栽培资源。

本文应用 ITS2 序列对苍术属白术、茅苍术、北苍术、关苍术、朝鲜苍术进行聚类分析,序列长度均为 232 bp,且 DNA 的提取、扩增及测序效果均很好。通过建立的 NJ 树图可以看出,苍术的 4 个近缘物种,分别为北苍术、茅苍术、朝鲜苍术、关苍术,可以和白术明显分开,但无法区分北苍术和朝鲜苍术,在二级结构图中,朝鲜苍术和北苍术几乎无差别,这与 Shiba 等^[13]和 PENG 等^[14]的研究结果一致。根据这一结果,可以认为朝鲜苍术嵌于北苍术分支,不是单系类群,与北苍术亲缘关系很近,是苍术北方分支中的一种变种,建议将朝鲜苍术并入北苍术。根据 NJ 树图和二级结构图来看,关苍术与茅苍术亲缘关系较近,无法判断与其他种亲缘关系远近,需要通过化学成分进一步分析研究。

通过比较朝鲜苍术的野生种质和栽培品系的聚类图发现,野生与栽培的样本很好的聚在一起,且变异位点较少,可以认为在辽宁有大规模栽培的朝鲜苍术可能起源于辽宁本地的野生群体。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:161-162.

[2] 裴男才,陈步峰. 生物 DNA 条形码:十年发展历程、研究尺度和功能[J]. 生物多样性,2013,21(5):616-627.

[3] 陈士林,庞晓慧,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2011,13(5):747-754.

[4] 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.

[5] 杨美青,杜燕. 基于 ITS2 序列及其二级结构对防己及其混伪品的鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(10):43-48.

[6] 赵莎,辛天怡,侯典云,等. 党参药材及其混伪品的 ITS/ITS2 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2013,15(3):421-428.

[7] 庞晓慧,宋经元,徐海滨,等. 应用 ITS2 条形码鉴定中药材麻黄[J]. 中国中药杂志,2012,37(8):1118-1121.

[8] 侯典云,宋经元,石林春,等. 中药材锁阳的 ITS2 条形码分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(23):4028-4032.

[9] 吴亚男,许亮,陈靓,等. 基于 ITS2 条形码的曼陀罗属药用植物 DNA 分子鉴定[J]. 中药材,2015,38(9):1852-1857.

[10] 王晖,时玲玲,周珏,等. 基于 DNA 条形码分析的霍山石斛及其常见混伪品的初步研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(20):4055-4061.

[11] 刘金欣,李耿,陈彩霞,等. 基于 ITS2 序列的中药材苍术种苗 DNA 条形码鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):34-38.

[12] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1987.

[13] Shiba M, Kondo K, Miki E, et al. Identification of medicinal *Atractylodes* based on ITS sequences of nrDNA [J]. Biol Pharm Bull,2006,29(2):315-320.

[14] PENG H S, YUAN Q J, LI Q Q. Molecular systematics of genus *Atractylodes* (Compositae, Cardueae): evidence from internal transcribed spacer (ITS) and *trnL-F* sequences [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(11):14623-14633.

[责任编辑 顾雪竹]