

应用 ITS2 序列鉴定四川车前、平车前、大车前

任瑶瑶 江南屏 刘睿颖 宋良科 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 DNA 条形码技术对车前属植物的鉴定作用,并将之应用于四川车前属植物样本分析。方法:于四川不同地方和不同海拔高度采集车前属 13 个植物样本,提取 DNA,进行 ITS2 序列 PCR 扩增、测序,从 Genbank 上下载 10 条同属 ITS2 序列;运用 MEGA 5.0 对所有序列种间种内遗传距离进行计算分析,构建 Neighbor Joining(NJ)系统进化树,并比较样本 ITS2 序列的二级结构差异。结果:车前、平车前、大车前的遗传距离较近,但是三者种间最小距离均远大于种内最大距离,NJ 树显示三者聚为一大支,种内之间各单据一支;三者二级结构差异明显。分析不同地区和不同海拔样本时发现,不同采集地的样本无明显差异。结论:以 ITS2 序列作为 DNA 条形码,对车前属植物进行准确、快速的识别和鉴定,准确地弄清物种之间的系统进化关系,为该属药用植物的分布研究提供指导,对其质量控制、安全用药及资源合理开发利用提供了理论依据。

关键词 车前属 DNA 条形码 ITS2 二级结构 中药鉴定 四川

中图分类号 R281.71 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)05-0057-04

车前属(*Plantago* L.)属车前科植物,包括 190 余种,其中我国产车前属 20 种,分布于全国各地^[1]。国内外研究较多的车前属药用植物有车前草(*Plantago asiatica* L.)、平车前(*Plantago depressa* Willd.)、大车前(*Plantago major* L.)3 种,不仅具有清热利尿、凉血、解毒的功效,还具有镇咳、祛痰、抗菌抗炎等作用^[2-3],主要含有黄酮、环烯醚萜类、苯乙酰咖啡酰糖酯类、三萜类等化学成分^[4-5]。车前属植物资源丰富,用途广泛,且毒副作用小,具有广阔的应用前景,现代医学对车前草进行了深入研究,车前草中超过 60 种化合物已被分离和鉴定^[3],已发现有许多有效成分,并具有多种药理作用,应大力开发和利用^[6]。车前草植物形态及药材性状特征较为相似,其内部组织构造区别也不明显,且药材在采收加工后,叶片皱缩卷曲,很难仅用形态学方法来确定药材的原植物及其来源。

DNA 条形码技术是通过测定植物 DNA 序列进行比较来反映其遗传差异,以进行物种分类和鉴定^[7]。ITS2 序列是位于核基因的一小段序列,该序列在绿色植物中分布广泛。ITS2 序列具有通用引物,对植物有较高的鉴别能力^[8-10]。本实验拟通过采集四川不同地区不同海拔车前属植物,并

从 Genbank 下载同属序列,以 ITS2 序列作为 DNA 条形码,分析遗传距离、Neighbor Joining(NJ)系统进化树和 ITS2 序列二级结构,对车前属植物进行快速准确的鉴定,弄清车前属植物之间的系统进化关系。对不同车前属药用植物进行准确、快速的识别和鉴定,对研究车前属药用植物分布具有指导作用,对未来遗传育种,种质资源的深入研究、保护和利用都具有重要的理论和实践价值。

1 材料

从四川省峨眉市、凉山州不同海拔处采集了 13 份车前属植物样本,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定,分别为车前草 *Plantago asiatica* L.、平车前 *Plantago depressa* Willd.、大车前 *Plantago major* Willd.,其中车前草样品 4 份、平车前样品 1 份、大车前样品 8 份。标本保存于西南交通大学标本室。同时在 GenBank 数据库中下载车前属植物 ITS2 序列 10 条,样品信息见表 1。

2 方法

2.1 样品 DNA 提取、PCR 扩增及测序 取干燥药材 30mg,加入液氮充分碾磨,使用植物 DNA 提取试剂盒(Tiangen Biotech Co.,China)提取总 DNA。以样

基金项目:国家科技重大专项(2014ZX09304-307-001-019);四川省中医药管理局项目(2016Q039)

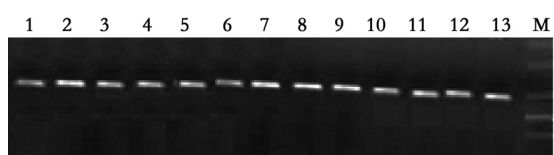
品 DNA 作为模板,对 ITS2 基因序列进行 PCR 扩增。正向引物 ITS2F:5'-ATGCGATACTTGGT-GTGAAT-3';反向引物 ITS3R:5'-GACGCTTCTCCAGACTA-CAAT-3'。PCR 反应体系:参照 PCR 反应试剂盒(TaKaRa 宝生物工程大连有限公司)的说明。PCR 反应条件:①94℃变性 5min;②94℃变性 30s;③56℃退火 30s;④72℃延伸 30s;⑤40 个循环;⑥72℃延伸 10min。将 PCR 产物送至北京梓熙生物科技有限公司进行测序。

2.2 数据处理 采用 CodonCode Aligner 6.0.2 对所得序列峰图进行校对拼接,去除引物区和低质量的序列,由基于隐马尔可夫模型(HMMer)的注释方法切除 ITS2 两端的 5.8S 和 28S 区域,获得标准的 ITS2 间隔区序列^[11]。所有 ITS2 序列用 MEGA5.0 比对^[12],分析种内、种间的遗传变异^[13],计算 K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离、相邻结合法(Neighbor Joining, NJ)构建系统进化树^[14],根据 Koetschan 等^[15]建立的 ITS2 数据库网站预测 ITS2 序列的二级结构。

3 结果

3.1 PCR 扩增结果 以样本 DNA 为模板扩增 ITS2 基因片

断的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 基因片段大小约为 500bp, 为含有 ITS2 序列的 DNA 片段。



M: DNA Marker; 1-13: 对应标本编号样品 ITS2 PCR 扩增片段

图 1 车前属植物样本 ITS2 扩增产物电泳结果

3.2 种内种间的变异分析 所有 ITS2 序列长度为 199~209bp、GC 含量 52%~61.1% (见表 1)。应用

表 1 车前属植物样本信息

植物名称	拉丁名	序列长度 (bp)	GC 比例 (%)	来源	标本号或 GenBank 登录号
车前草	<i>Plantago asiatica</i>	199	54.8	四川省峨眉黄湾乡 海拔: 496m	01
车前草	<i>Plantago asiatica</i>	199	54.8	四川省峨眉黄湾乡张坝村 海拔: 528m	02
车前草	<i>Plantago asiatica</i>	199	54.8	四川省峨眉黄湾乡 海拔: 494m	03
车前草	<i>Plantago asiatica</i>	199	54.8	四川省峨眉黄湾乡张坝村 海拔: 482m	04
车前草	<i>Plantago asiatica</i>	199	54.8	GenBank	KJ493679
车前草	<i>Plantago asiatica</i>	199	54.8	GenBank	KJ493677
平车前	<i>Plantago depressa</i>	200	52.0	四川省凉山州木里县乔瓦镇 海拔: 2297m	05
平车前	<i>Plantago depressa</i>	200	53.0	GenBank	JF421530
平车前	<i>Plantago depressa</i>	199	54.8	GenBank	KF454407
平车前	<i>Plantago depressa</i>	199	54.8	GenBank	KF454400
大车前	<i>Plantago major</i>	200	56.0	四川省峨眉黄湾乡 海拔: 483m	06
大车前	<i>Plantago major</i>	200	56.0	四川省峨眉黄湾乡张坝村 海拔: 477m	07
大车前	<i>Plantago major</i>	200	56.0	四川省峨眉黄湾乡张坝村 海拔: 482m	08
大车前	<i>Plantago major</i>	200	56.0	四川省峨眉黄湾乡 海拔: 519m	09
大车前	<i>Plantago major</i>	200	56.0	四川省峨眉黄湾乡 海拔: 518m	10
大车前	<i>Plantago major</i>	200	56.0	四川省峨眉高桥镇 海拔: 748m	11
大车前	<i>Plantago major</i>	200	56.0	四川省峨眉高桥镇 海拔: 748m	12
大车前	<i>Plantago major</i>	200	56.0	四川省凉山州木里县乔瓦镇 海拔: 2294m	13
大车前	<i>Plantago major</i>	200	55.7	GenBank	KJ493647
对叶车前	<i>Plantago arenaria</i>	208	58.6	GenBank	AY101891
对叶车前	<i>Plantago arenaria</i>	209	56.5	GenBank	AY692082
芒苞车前	<i>Plantago aristata</i>	208	58.5	GenBank	AY101911
芒苞车前	<i>Plantago aristata</i>	208	61.1	GenBank	AJ548983

MEGA 5.0 软件对样品进行多序列比对, 比对后的序列长度为 211bp。MEGA 5.0 分析显示车前、大车前种内没有变异位点, 平车前 3 个变异位点, 对叶车前 8 个变异位点, 芒苞车前 4 个变异位点, 种间最多 27 个变异位点(见表 2)。

3.3 K2P 遗传距离分析 物种间种内距离越小, 种间距离越大越适合条形码鉴定^[16]。计算近缘种车前、平车前、大车前 ITS2 种内种最大遗传距离为 0~0.005, 种间最小遗传距离为 0.010~0.051, 种间最小距离均远大于种内最大距离, 样本的 K2P 距离见表 3。

表2 车前属植物 ITS2 序列变异位点

[illegible]

3.4 NJ 树分析 根据 ITS2 序列对所有样本构建 NJ 系统聚类树, 见图 2。从 NJ 进化树图可以看出, 各样本种内之间单据一支, 车前、平车前、大车前聚为一支, 分支之间靴带检验法(bootstrap)支持率在 70% 以上, 与对照列的对叶车前和芒苞车前之间的支持率为 99%, 物种之间可明显区分开。

表3 车前属植物样本种间和种内距离分析

种类 1	种类 2	类型	最小种间距离	最大种内距离
车前	车前	种内		0
平车前	平车前	种内		0.005
大车前	大车前	种内		0
车前	平车前	种间	0.051	
平车前	大车前	种间	0.036	
大车前	车前	种间	0.010	

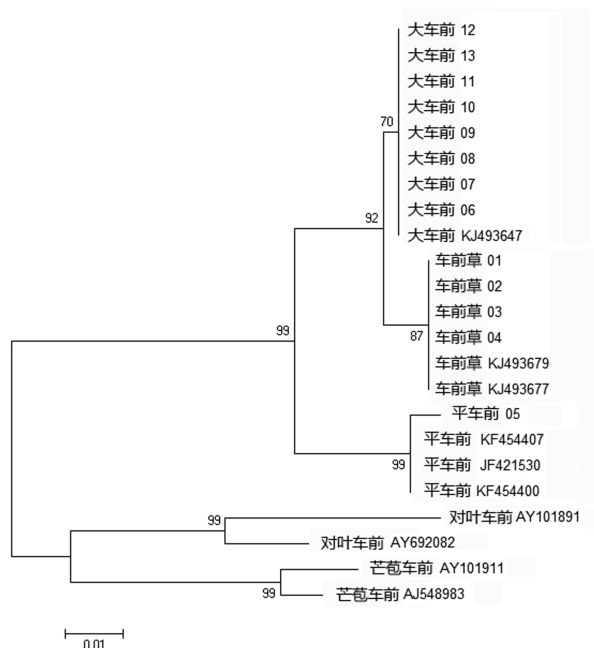


图 2 基于 ITS 序列构建的车前属植物样本的 NJ 树

3.5 ITS2 二级结构的分析

车前属植物样本 ITS2 序列的二级结构如图 3 所示。从样本的二级结构中可以看出,平车前、大车前和车前的 ITS2 二级结构较为相似,均由一个中心环及 5 个螺旋区(Helix)组成,但螺旋Ⅲ区上有差异,茎环(Loop)数量不同,与芒苞车前在Ⅰ、Ⅲ区均有差异,茎环的大小位置不同,与对叶车前差别最大,中心环和螺旋Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ区均有明显差异。

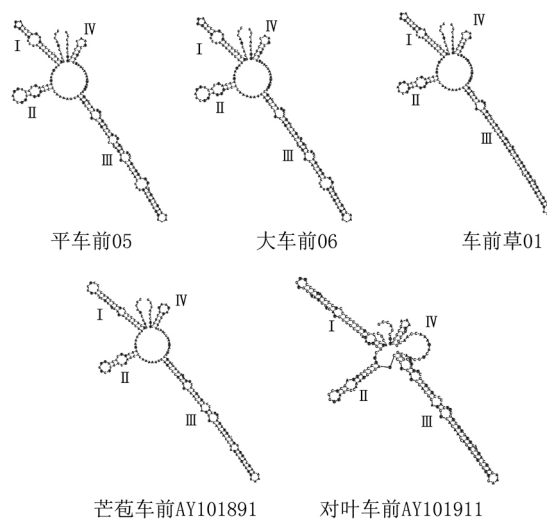


图3 车前属 ITS2 序列的二级结构

4 结语

车前属植物含有多种有效成分,具有较好的药用价值,其中车前、平车前和大车前是中医常用药材。ITS2 序列为核糖体内转录间隔区序列,对植物具有良好的扩增成功率和物种水平的鉴定成功率^[17-18],以 ITS2 序列作为 DNA 条形码对车前属植物的鉴定进行研究可以达到既快速又准确。

本研究将四川不同地方不同海拔采集的 13 份车前属植物样本进行 PCR 扩增、测序,成功获得双向序列,用 CodonCode Aligner 软件拼接序列,隐马尔可夫模型(HMMer)的注释方法得到 ITS2 间隔区序列。Genbank 上下载同属序列 10 条,23 条 ITS2 序列长度 199~209、GC 含量 52%~61.1%,MEGA 5.0 分析样本间变异位点、种内种间的遗传距离和构建的 NJ 进化树显示车前、平车前、大车前有很近的亲缘关系,但三者之间相比较,种内变异较小,种间变异比较明显。分析不同地区和不同海拔样本时发

现,不同采集地的样本无明显差异,同种样本被聚为一支。车前属植物 ITS2 序列二级结构差异明显,可以直观地将物种区分开,证明 ITS2 序列可以准确的识别和鉴定车前属植物,这为车前属药用植物质量标准进一步提高与完善提供了科学依据,为其安全用药及合理开发利用提供了保障。如果要确定 ITS2 序列分析四川不同地域和海拔的车前属药用植物资源分布,应从更多地区和海拔区间采样,进一步扩大采集样本的范围和数量。

参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所.中国高等植物图鉴:第4册[M].北京:科学出版社,1994:180.
- [2] 郭水良.车前属(*Plantago* L.)植物生态与进化生物学研究进展[J].植物学通报,2002,19(5):567.
- [3] 杨亚军,周秋贵,曾红,等.车前草化学成分及新生物活性研究进展[J].中成药,2011,33(10):1771.
- [4] 吴恋,王春艳,吕维,等.藏药大车前草中大车前苷的定性和定量分析[J].成都中医药大学学报,2014,37(1):48.
- [5] 刘力丰.车前草研究进展[J].中国医药指南,2009,7(5):40.
- [6] 夏玲红,金冠钦,孙黎,等.车前草的化学成分与药理作用研究进展[J].中国药师,2013,16(2):294.
- [7] BHARGAVA M,SHARMA A.DNA barcoding in plants: evolution and applications of in silico approaches and resources[J].Mol Phylogenet Evol,2013,67(3):631.
- [8] YAO H,SONG J,LIU C,et al.Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals[J].PLoS ONE,2010,5(10):e13102.
- [9] CHEN S,YAO H,HAN J,et al.Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J].PLoS ONE,2010,5(1):e8613.
- [10] 豆荣昆,毕振飞,白瑞雪,等.黄花紫堇、多刺绿绒蒿及其

同属近缘物种的 ITS2 条形码鉴定与分析[J].中国中药杂志,2015,40(8):1453.

- [11] KELLER A,SCHLEICHER T,SCHULTZ J,et al.5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J].Gene,2009,430(1-2):50.
- [12] TAMURA K,PETERSON D,PETERSON N,et al.MEGA5:Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood,Evolutionary Distance,and Maximum Parsimony Methods[J].Molecular Biology and Evolution,2011,28(10):2731.
- [13] LIAO B,CHEN X,HAN J,et al.Identification of commercial *Ganoderma* (Lingzhi) species by ITS2 sequences [J].Chinese Medicine,2015,10(1):1.
- [14] SAITOU N,NEI M.The neighbor-joining method:a new method for reconstructing phylogenetic trees[J].Mol Biol Evol,1987,4(4):406.
- [15] KOETSCHAN C,FISTER F,KELLER A,et al.The ITS2 Database III-sequences and structures for phylogeny[J].Nucleic Acids Res,2010,38(Database issue):D275.
- [16] 朱英杰,陈士林,姚辉,等.重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J].药学学报,2010,45(3):376.
- [17] GAO T,YAO H,SONG J,et al.Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J].J Ethnopharmacol,2010,130(1):116.
- [18] 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:生命科学,2010,40(4):342.

第一作者:任瑶瑶(1982—),女,硕士,工程师,中药学专业。

通讯作者:谭睿,博士,教授,硕士研究生导师。
tanrui@swjtu.edu.cn

收稿日期:2016-11-22

编辑:吴 宁

文末参考文献著录规则之页码的标注

根据国家标准 GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》的规定,本刊关于参考文献页码的著录做重要修订如下:(1)专著或期刊中析出文献的页码或引文页码,应采用阿拉伯数字著录,引自序言或扉页题词的页码,可按实际情况著录(例:钱学森.创建系统学[M].2版.太原:山西科学技术出版社,2001:序2.);(2)阅读型参考文献的页码著录文章的起始页,引文参考文献的页码著录引用信息所在页。阅读型参考文献指著者为撰写或编辑论著而阅读过的信息资源;引文参考文献指著者为撰写或编辑论著而引用的信息资源。例如:将谈勇等发表在本刊2015年第1期第1—4页的文章《夏桂成国医大师调治复发性流产经验探赜》作为阅读型参考文献引用时,页码著录为“1”;作为引文文献引用“夏老提出心-肾-子宫轴功能失常是流产病机关键”这一观点或原文时,著录这些引用信息的所在页“3”。更多有关本刊参考文献著录规则见本刊网站(www.jstcm.cn)首页下载专区。