

藏药加哇及其易混品的 ITS2 序列鉴定研究

杨吉玉^{1,2}, 高必兴^{1*}, 齐景梁¹, 王艺娱³, 李倩¹, 连艳^{3*} (1. 四川省药品检验研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 成都 611731; 2. 泸州医疗器械职业学院, 四川 泸州 646000; 3. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137)

摘要:目的 利用 DNA 条形码核基因内部转录间隔区 (ITS2) 序列, 建立加哇及其易混品的有效鉴定方法。方法 采用试剂盒提取 72 批加哇及其易混品的 DNA, 针对其 ITS2 片段进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增并双向测序, 获取 ITS2 序列信息, 同时从 GenBank 下载相关序列 30 条, 应用 MEGA6.0 软件对 102 条 ITS2 序列进行序列比对分析, 计算种内和种间 Kimura 双参数遗传距离 (K2-P), 构建邻接法 (neighbor-joining, N-J) 系统进化树, 并预测 ITS2 二级结构。结果 K2-P 遗传距离分析显示, 除松潘棱子芹与瘤果棱子芹外, 西藏棱子芹、迷果芹、西藏凹乳芹、葛缕子、裂叶独活、羽苞藁本及刺果峨参具有明显的条形码间距。N-J 树聚类分析显示, 各物种均能以 >50% 的自展支持率各自聚为 1 支, 单系性良好。ITS2 二级结构分析显示, 加哇与其易混品在 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置有所差异。结论 ITS2 序列可用于鉴别加哇及其易混品, 有利于加哇的质量控制及资源利用。

关键词: 加哇; 核基因内部转录间隔区序列; 易混品; 藏药

doi:10.11669/cpj.2024.08.004 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)08-0687-07

Identification of Tibetan Medicine Jiawa and Easily Mixed Species Based on ITS2 Barcode

YANG Jiyu^{1,2}, GAO Bixing^{1*}, QI Jingliang¹, WANG Yiyu³, LI Qian¹, LIAN Yan^{3*} (1. Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicines, Sichuan Institute for Drug Control, NMPA, Chengdu 611731, China; 2. Luzhou College of Medical Devices, Luzhou 646000, China; 3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources of Southwestern China, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an effective identification method for Jiawa and easily mixed species by using DNA barcoding ITS2 sequence. **METHODS** The total DNA of 72 Jiawa and its similar species samples were extracted by using the plant genomic DNA Extraction kit, PCR amplification and bidirectional sequencing were carried out for the ITS2 fragments, another 30 items of the genus were downloaded from GenBank. MEGA6.0 software was applied to analyze 102 ITS2 sequences, calculate the intraspecific and interspecific K2-P distance, construct neighbor-joining (N-J) phylogenetic tree, and predict the secondary structure of ITS2. **RESULTS** K2-P genetic distance analysis showed that, in addition to *Pleurospermum franchetianum* Hemsl. and *Pleurospermum wrightianum* de Boiss., *Pleurospermum hookeri* var. *thomsonii* C. B. Clarke., *Sphallerocarpus gracilis* (Bess.) K.-Pol., *Vicatia tibetica* de Boiss., *Carum carvi* L., *Heracleum millefolium* Diels., *Ligusticum daucooides* (Franch.) Franch. and *Anthriscus sylvestris* subsp. *Nemorosa* have obvious barcode spacing. N-J tree cluster analysis showed that each species could be clustered into one branch with a bootstrap support rate of >50%, and the monophylicity was good. The secondary structure analysis of ITS2 showed that the number, size and position of stem-loops in the four helical regions of Jiawa and its miscible were different. **CONCLUSION** The ITS2 sequence can be used to identify Jiawa and its easily mixed species, which is beneficial to the rational development and utilization of Jiawa resources.

KEY WORDS: Jiawa; ITS2 barcode; mixed species; Tibetan medicine

加哇是一味常见藏药, 藏文名“ལྷུང་ཁྱུང་”, 药用部位为根应用历史悠久, 最早记载于《四部医典》^[1], 具有干黄水、祛腰肾寒症功效, 主治消化不良, 肾病, 腰痛, 肾虚, 隆病, 黄水病等。现收载于《中华人民共和国卫生部药品标准藏药分册》(1995 年)^[2]、《四川

省中药材标准》(2010 年版)^[3]、《西藏自治区藏药材标准》第一册^[4]及《青海省藏药材标准》(2019 年版)第一册^[5], 主要收录西藏棱子芹 (*Pleurospermum hookeri* var. *thomsonii* C. B. Clarke) 及迷果芹 (*Sphallerocarpus gracilis* (Bess.) K.-Pol.) 两个基原。前期调

基金项目: 国家药品监督管理局药品监管科学体系建设重点项目资助 (RS2024Z006)

作者简介: 杨吉玉, 女, 助教 研究方向: 中药品种、质量与资源开发应用研究 * 通讯作者: 高必兴, 男, 主管中药师 研究方向: 中药及民族药质量研究 Tel: (028)87877143; 连艳, 女, 高级实验师 研究方向: 中药品种、品质与资源研究 Tel: (028)61800231

查研究发现,五省藏区内加哇的使用基原远远不止以上两种,还包括西藏凹乳芹(*Vicatia thibetica* de Boiss.)、刺果峨参(*Anthriscus sylvestris* subsp. *Nemorosa*)等一系列基原,基原复杂,鉴定困难,表现于药材的鉴别更甚,目前传统鉴别方法难以将其区分。

DNA 条形码是当前生物分类学的热门技术,是利用一段有足够变异的、易扩增且相对较短的标准 DNA 片段(500 ~ 1 000 bp)对物种进行快速、准确的自动鉴定^[6]。DNA 条形码自正式提出以来发展迅速^[7],因其准确、快速、有效的特点,在中药及民族药领域使用广泛^[8-12]。现有关于加哇的研究中未见有关 DNA 条形码的相关报道,课题组前期在四川省、青海省等地收集加哇样品,并采集了当地藏区常见易混品种,对其 ITS2 序列进行比对分析,找出藏药加哇在分子水平的鉴别特征,建立一种快速鉴别加哇及其易混品的方法,保障临床安全用药。

1 仪器及试剂

C1000 型聚合酶链式反应(PCR)仪、PowerPac Basic 型电泳仪、Gel Doc XR⁺ 型全自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);XP205 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);MM400 型球磨机(德国 Retsch 公司);MiniSpin 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Milli-Q Advantage A10 型纯水仪(美国 Millipore 公司);植物基因组 DNA 提取试剂盒、2 × Taq Master Mix 缓冲液、Gene Red 核酸染料(中国天根生化科技有限公司);Taq 酶 PCR 扩增试剂盒(中国北京聚合美生物科技有限公司);琼脂糖(法国 Biowest 公司);ITS2 引物(ITS2F:5'-ATGCGATACT-TGCTGTGAAT-3'; ITS3R:5'-GACGCTTCTCCAGAC-TACAAT-3',中国上海捷瑞生物工程有限公司)。

收集加哇相关样品共 72 批,其中自采 52 批,购买 20 批,药材经四川省药品检验研究院黎跃成主任中药师鉴定,包括 9 个基原,分别为西藏棱子芹(*Pleurospermum hookeri* var. *thomsonii* C. B. Clarke)、迷果芹[*Sphallerocarpus gracilis* (Bess.) K. -Pol.]、西藏凹乳芹(*Vicatia thibetica* de Boiss.)、葛缕子(*Carum carvi* L.)、松潘棱子芹(*Pleurospermum franchetianum* Hemsl.)、裂叶独活(*Heracleum millefolium* Diels)、羽苞藁本[*Ligusticum daucoides* (Franch.) Franch.]、刺果峨参(*Anthriscus sylvestris* subsp. *Nemorosa*)及瘤果棱子芹(*Pleurospermum wrightianum* de Boiss.)。具体样品信息见表 1。另从 GenBank 的 Nucleotide 数据库下载相关样品序列用于分析比较,信息见表 2。

表 1 藏药加哇及其易混品样品信息

Tab. 1 Information of Tibetan medicine Jiawa and its easily mixed species

No.	Origin	Collection place (in Chinese)	Method of collecting
XZ-1	<i>Pleurospermum hookeri</i> var. <i>thomsonii</i> C. B. Clarke	Shiqu Sichuan(四川石渠)	Pick
XZ-2		Kangding Sichuan(四川康定)	Pick
XZ-3		Yajiang Sichuan(四川雅江)	Pick
XZ-4		Daocheng Sichuan(四川稻城)	Pick
XZ-5		Dege Sichuan(四川德格)	Pick
XZ-6		Dege Sichuan(四川德格)	Pick
XZ-7		Shiqu Sichuan(四川石渠)	Pick
XZ-8		Shiqu Sichuan(四川石渠)	Pick
XZ-9		Ganzi Sichuan(四川甘孜)	Pick
XZ-10		Seda Sichuan(四川色达)	Pick
XZ-11		Xiaojin Sichuan(四川小金)	Pick
XZ-12		Gande Qinghai(青海甘德)	Pick
XZ-13		Gande Qinghai(青海甘德)	Pick
XZ-14		Maqin Qinghai(青海玛沁)	Pick
XZ-15		Litang Sichuan(四川理塘)	Pick
MGQ-1	<i>Sphallerocarpus gracilis</i> (Bess.) K. -Pol.	Xining Qinghai(青海西宁)	Purchase
MGQ-2		Xining Qinghai(青海西宁)	Purchase
MGQ-3		Xining Qinghai(青海西宁)	Purchase
MGQ-4		Maqin Qinghai(青海玛沁)	Purchase
MGQ-5		Nangqian Qinghai(青海囊谦)	Purchase
MGQ-6		Tongren Qinghai(青海同仁)	Purchase
MGQ-7		Yushu Qinghai(青海玉树)	Purchase
MGQ-8		Lasa Xizang(西藏拉萨)	Purchase
MGQ-9		Chengdu Sichuan(四川成都)	Purchase
MGQ-10		Chengdu Sichuan(四川成都)	Purchase
MGQ-11		Maqin Qinghai(青海玛沁)	Purchase
MGQ-12		Shandan Gansu(甘肃山丹)	Pick
MGQ-13		Minle Gansu(甘肃民乐)	Pick
MGQ-14		Chengdu Sichuan(四川成都)	Purchase
MGQ-15		Zhangye Gansu(甘肃张掖)	Purchase
MGQ-16		Hongyuan Sichuan(四川红原)	Pick
ARQ-1	<i>Vicatia thibetica</i> de Boiss.	Xichang Sichuan(四川西昌)	Purchase
ARQ-2		Panzhihua Sichuan(四川攀枝花)	Pick
ARQ-3		Huidong Sichuan(四川会东)	Purchase
ARQ-4		Zhanyi Yunan(云南沾益)	Pick
ARQ-5		Kunming Yunan(云南昆明)	Pick
ARQ-6		Qujing Yunan(云南曲靖)	Purchase
ARQ-7		Huidong Sichuan(四川会东)	Pick
ARQ-8		Huize Yunan(云南会泽)	Pick
ARQ-9		Huidong Sichuan(四川会东)	Pick
ARQ-10		Mojiang Yunan(云南墨江)	Pick
ARQ-11		Yanyuan Sichuan(四川盐源)	Pick
ARQ-12		Chengdu Sichuan(四川成都)	Purchase
ARQ-13		Chengdu Sichuan(四川成都)	Purchase
ARQ-14		Dali Yunan(云南大理)	Purchase
ARQ-15		Aba Sichuan(四川阿坝)	Purchase
ARQ-16		Huidong Sichuan(四川会东)	Pick
GLZ-1	<i>Carum carvi</i> L.	Ganzi Sichuan(四川甘孜)	Pick
GLZ-2		Ganzi Sichuan(四川甘孜)	Pick
GLZ-3		Aba Sichuan(四川阿坝)	Pick
GLZ-4		Aba Sichuan(四川阿坝)	Pick
GLZ-5		Maqin Qinghai(青海玛沁)	Pick

续表 1 (continued)

No.	Origin	Collection place (in Chinese)	Method of collecting
GLZ-6		Banma Qinghai(青海班玛)	Pick
SP-1	<i>Pleurospermum franchetianum</i> Hemsl.	Yajiang Sichuan(四川雅江)	Pick
SP-2		Maerkang Sichuan(四川马尔康)	Pick
SP-3		Hongyuan Sichuan(四川红原)	Pick
SP-4		Songpan Sichuan(四川松潘)	Pick
SP-5		Xiaojin Sichuan(四川小金)	Pick
LY-1	<i>Heracleum millefolium</i> Diels	Shiqu Sichuan(四川石渠)	Pick
LY-2		Ruogai Sichuan(四川若尔盖)	Pick
LY-3		Gande Qinghai(青海甘德)	Pick
LY-4		Shiqu Sichuan(四川石渠)	Pick
YB-1	<i>Ligusticum daucooides</i> (Franch.) Franch.	Litang Sichuan(四川理塘)	Pick
YB-2		Luding Sichuan(四川泸定)	Pick
YB-3		Yajiang Sichuan(四川雅江)	Pick
YB-4		Daocheng Sichuan(四川稻城)	Pick
YB-5		Shiqu Sichuan(四川石渠)	Pick
YB-6		Maerkang Sichuan(四川马尔康)	Pick
CG-1	<i>Anthriscus sylvestris</i> subsp. <i>Nemorosa</i>	Baiyu Sichuan(四川白玉)	Pick
CG-2		Baiyu Sichuan(四川白玉)	Pick
LG-1	<i>Pleurospermum wrightianum</i> de Boiss.	Yajiang Sichuan(四川雅江)	Pick
LG-2		Shiqu Sichuan(四川石渠)	Pick

表 2 核基因内部转录间隔区(ITS2)序列的 GenBank 登录号信息

Tab. 2 GenBank login number information of ITS2 sequence

Name	GenBank login number
<i>Pleurospermum hookeri</i> var. <i>thomsonii</i> C. B. Clarke	EU236199.1、AF164863.1、FJ483485.1、HQ824799.1、KP311520.1
<i>Sphallerocarpus gracilis</i> (Bess.) K. -Pol.	KM191322.1、AH008959.2
<i>Vicatia tibetica</i> de Boiss.	FJ483507.1、MN689000.1、GU395143.1
<i>Carum carvi</i> L.	KF454471.1、MF785658.1、U78437.1、KX167447.1、KX167445.1、KM887355.1、KX167448.1
<i>Pleurospermum franchetianum</i> Hemsl.	EU236198.1、KY848849.1
<i>Heracleum millefolium</i> Diels	HQ686349.1、HQ686341.1、HQ686332.1、HQ686331.1、EU236170.1、EU001362.1、GU967798.1
<i>Ligusticum daucooides</i> (Franch.) Franch.	EU236173.1
<i>Anthriscus sylvestris</i> subsp. <i>Nemorosa</i>	AH008907.2
<i>Pleurospermum wrightianum</i> de Boiss.	FJ483494.1、EU236201.1

2.3 数据处理

应用 CodonCode Aligner V6.0 对测序所获得的数据进行校对拼接,去除引物及低质量区,基于隐马尔科夫模型(HMMer)的注释方法去除 5.8 S 和 28 S 区段,即可获得 ITS2 序列信息。

采用基于局部序列比对算法的搜索工具(BLAST),在美国国家生物技术信息中心(NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和中药材 DNA 条形码鉴定系统(<http://barcode.ndctcm.org/china/>),应用相似性搜索法^[8]对实验样品的不同单倍型序列进行 BLAST 鉴定分析。

采用 MEGA6.0 进行比对,对序列的变异位点

2 方法

2.1 DNA 提取

用体积分数 75% 乙醇擦拭样品表面,自然晾干后,用球磨机研磨成粉末,称取粉末约 30 mg,按植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作,提取 DNA, -20 °C 保存备用。

2.2 PCR 扩增及测序

选取通用引物 ITS2F(5'-ATGCGATA-CTTGGTGTGAAT-3')和 ITS3R(5'-GACGCTTCT-CCAGACTA-CAAT-3')对样品 DNA 进行扩增。反应体系为 50 μL,包含 2 × Taq Master Mix 缓冲液 25 μL、上下游引物各 2 μL、DNA 模板 5 μL,加灭菌超纯水至 50 μL。阴性对照为无模板 DNA 的反应体系。以 10 000 r · min⁻¹ 离心(离心半径为 3 cm)5 s 后,置于 PCR 仪中。反应程序为先 95 °C 预变性 4 min;然后 35 个循环:94 °C 变性 30 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 45 s;最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物使用琼脂糖凝胶(质量分数 1.5%)电泳来进行检测,确定成功率以及目的条带片段大小,扩增产物委托生工生物工程(上海)公司双向测序。

进行分析,不同物种的单倍型为 A1、B1、C1,同一物种的不同单倍型为 A1、A2、A3;基于 K2-P 模型计算样品种内以及种间的遗传距离,使用邻接法构建聚类树^[8];登录二级结构预测网站 <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>,对不同物种的主导单倍型进行 ITS2 二级结构的预测。

3 结果与分析

3.1 DNA 模板质量检测

对所提取的样品 DNA 进行 PCR 扩增检测,通用引物 ITS2F 和 ITS3R 能够扩增成功,片段长度为 450 bp 左右,实验样品皆有亮带扩增出来,见图 1。

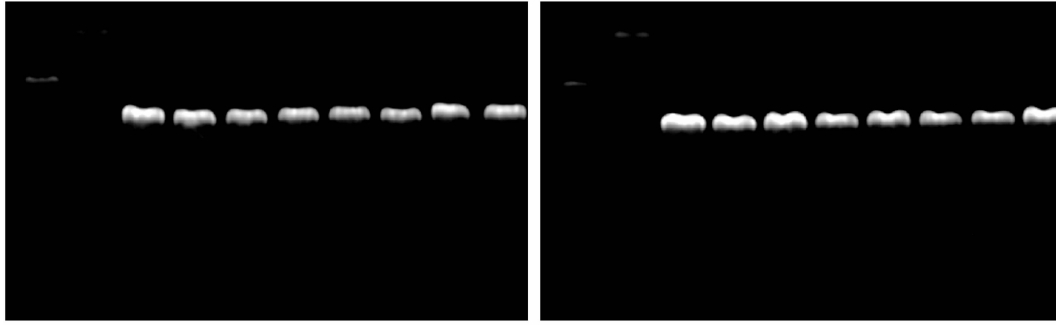


图1 加哇及其易混品 ITS2 电泳图

Fig. 1 ITS2 electrophoretic diagram of Tibetan medicine Jiawa and its easily mixed species

3.2 BLAST 鉴定结果分析

基于 NCBI 和中药材 DNA 条形码鉴定系统的 BLAST 鉴定结果与性状鉴定结果一致。

3.3 序列信息分析

通过 MEGA 6.0 对序列信息进行了分析,具体见表 3。

表 3 藏药加哇及其易混品 ITS2 序列信息

Tab. 3 The ITS2 sequence information of Tibetan medicine Jiawa and its easily mixed species

Name	Sequence number	Sequence length/bp	GC/%
<i>Pleurospermum hookeri</i> var. <i>thomsonii</i> C. B. Clarke	20	222	55.8-56.3
<i>Sphallerocarpus gracilis</i> (Bess.) K. -Pol.	18	225	49.3
<i>Vicatia tibetica</i> de Boiss.	19	219	50.2-52.5
<i>Carum carvi</i> L.	13	223	51.6
<i>Pleurospermum franchetianum</i> Hemsl.	7	216	56.0-56.9
<i>Heracleum millefolium</i> Diels	11	224	56.2
<i>Ligusticum daucooides</i> (Franch.) Franch.	7	221	55.7-58.4
<i>Anthriscus sylvestris</i> subsp. <i>Nemorosa</i>	3	222 ~ 225	47.5-48.0
<i>Pleurospermum wrightianum</i> de Boiss.	4	218 ~ 220	56.4-56.8

3.4 变异位点分析

对不同来源的加哇及其易混品 ITS2 序列变异位点进行统计分析,结果见表 4。

3.5 K2-P 遗传距离分析

加哇及其易混品的遗传距离见表 5。种内最大遗传距离 0 ~ 0.033,除松潘棱子芹与瘤果棱子芹外(两者种间距离 0.024 ~ 0.034),种间最小遗传距离 0.144 ~ 0.462,远大于种内最大遗传距离,具有明显

的条形码间距,说明 K2-P 遗传距离可很好地区分开此 9 种,但无法完全区分松潘棱子芹与瘤果棱子芹。结果见表 5。

3.6 N-J 树聚类分析

构建加哇及其易混品的 ITS2 序列 N-J 树,设置 bootstrap 1 000 次重复,支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50%$,见图 2。可看出,各物种均能以 $>50%$ 的自展支持率各自聚为 1 支,单系性良好。

表 4 藏药加哇及其易混品变异位点统计

Tab. 4 Statistics of variation sites of Tibetan medicine Jiawa and its easily mixed species

Name	Variation site	Haplotype		
		Number of haplotypes	Dominant haplotype (number)	Experimental sample haplotype
<i>Pleurospermum hookeri</i> var. <i>thomsonii</i> C. B. Clarke	5	5	A1(11)	A1, A2, A3
<i>Sphallerocarpus gracilis</i> (Bess.) K. -Pol.	0	1	B1	B1
<i>Vicatia tibetica</i> de Boiss.	5	4	C1(9)	C1, C2
<i>Carum carvi</i> L.	0	1	D1	D1
<i>Pleurospermum franchetianum</i> Hemsl.	2	3	E1(5)	E1, E2
<i>Heracleum millefolium</i> Diels	6	3	F1(5), F2(5)	F1, F2
<i>Ligusticum daucooides</i> (Franch.) Franch.	9	5	G1(3)	G1, G2
<i>Anthriscus sylvestris</i> subsp. <i>Nemorosa</i>	1	2	H1(2)	H1
<i>Pleurospermum wrightianum</i> de Boiss.	2	2	I1(3)	I1, I2

表5 种内种间遗传距离分析

Tab.5 Analysis of intraspecific and interspecific genetic distance

Name	<i>Pleurospermum hookeri</i> var. <i>thomsonii</i> C. B. Clarke	<i>Sphallerocarpus gracilis</i> (Bess.) K. -Pol.	<i>Vicia thibetica</i> de Boiss.	<i>Anthriscus sylvestris</i> subsp. <i>Nemorosa</i>	<i>Carum carvi</i> L.	<i>Pleurospermum franchetianum</i> Hemsl.	<i>Heracleum millefolium</i> Diels	<i>Ligusticum daucoides</i> (Franch.) Franch.	<i>Pleurospermum wrightianum</i> de Boiss.
<i>Pleurospermum hookeri</i> var. <i>thomsonii</i> C. B. Clarke	(0.0-0.014) 0.004	(0.201-0.214) 0.180	(0.179-0.204) 0.169	(0.205-0.218) 0.210	(0.251-0.265) 0.239	(0.358-0.384) 0.363	(0.256-0.284) 0.258	(0.206-0.226) 0.214	(0.367-0.376) 0.361
<i>Sphallerocarpus gracilis</i> (Bess.) K. -Pol.	(0.201-0.214) 0.180	0	(0.287-0.295) 0.243	(0.148-0.154) 0.147	(0.391-0.391) 0.363	(0.425-0.442) 0.413	(0.333-0.366) 0.307	(0.253-0.296) 0.250	(0.430-0.440) 0.398
<i>Vicia thibetica</i> de Boiss.	(0.179-0.204) 0.169	(0.287-0.295) 0.243	(0.0-0.023) 0.009	(0.283-0.298) 0.267	(0.218-0.231) 0.213	(0.308-0.357) 0.332	(0.193-0.252) 0.217	(0.156-0.212) 0.180	(0.305-0.346) 0.327
<i>Anthriscus sylvestris</i> subsp. <i>Nemorosa</i>	(0.205-0.218) 0.210	(0.148-0.154) 0.147	(0.283-0.298) 0.267	(0.0-0.005) 0.003	(0.366-0.366) 0.345	(0.462-0.483) 0.454	(0.347-0.381) 0.347	(0.265-0.293) 0.283	(0.450-0.471) 0.440
<i>Carum carvi</i> L.	(0.251-0.265) 0.239	(0.391-0.391) 0.363	(0.218-0.231) 0.213	(0.366-0.366) 0.345	0	(0.359-0.367) 0.370	(0.244-0.271) 0.247	(0.252-0.265) 0.250	(0.362-0.362) 0.366
<i>Pleurospermum franchetianum</i> Hemsl.	(0.358-0.384) 0.363	(0.425-0.442) 0.413	(0.308-0.357) 0.332	(0.462-0.483) 0.454	(0.359-0.367) 0.370	(0.000-0.009) 0.003	(0.311-0.350) 0.338	(0.303-0.366) 0.335	(0.024-0.034) 0.031
<i>Heracleum millefolium</i> Diels	(0.256-0.284) 0.258	(0.333-0.366) 0.307	(0.193-0.252) 0.217	(0.347-0.381) 0.347	(0.244-0.271) 0.247	(0.311-0.350) 0.338	(0.000-0.028) 0.008	(0.144-0.173) 0.165	(0.315-0.338) 0.346
<i>Ligusticum daucoides</i> (Franch.) Franch.	(0.206-0.226) 0.214	(0.253-0.296) 0.250	(0.156-0.212) 0.180	(0.265-0.293) 0.283	(0.252-0.265) 0.250	(0.303-0.366) 0.335	(0.144-0.173) 0.165	(0.0-0.033) 0.014	(0.309-0.365) 0.352
<i>Pleurospermum wrightianum</i> de Boiss.	(0.367-0.376) 0.361	(0.430-0.440) 0.398	(0.305-0.346) 0.327	(0.450-0.471) 0.440	(0.362-0.362) 0.366	(0.024-0.034) 0.031	(0.315-0.338) 0.346	(0.309-0.365) 0.352	(0.0-0.009) 0.005

注:括号外的数据为平均遗传距离。

Note: outside the parentheses is the average genetic distance.

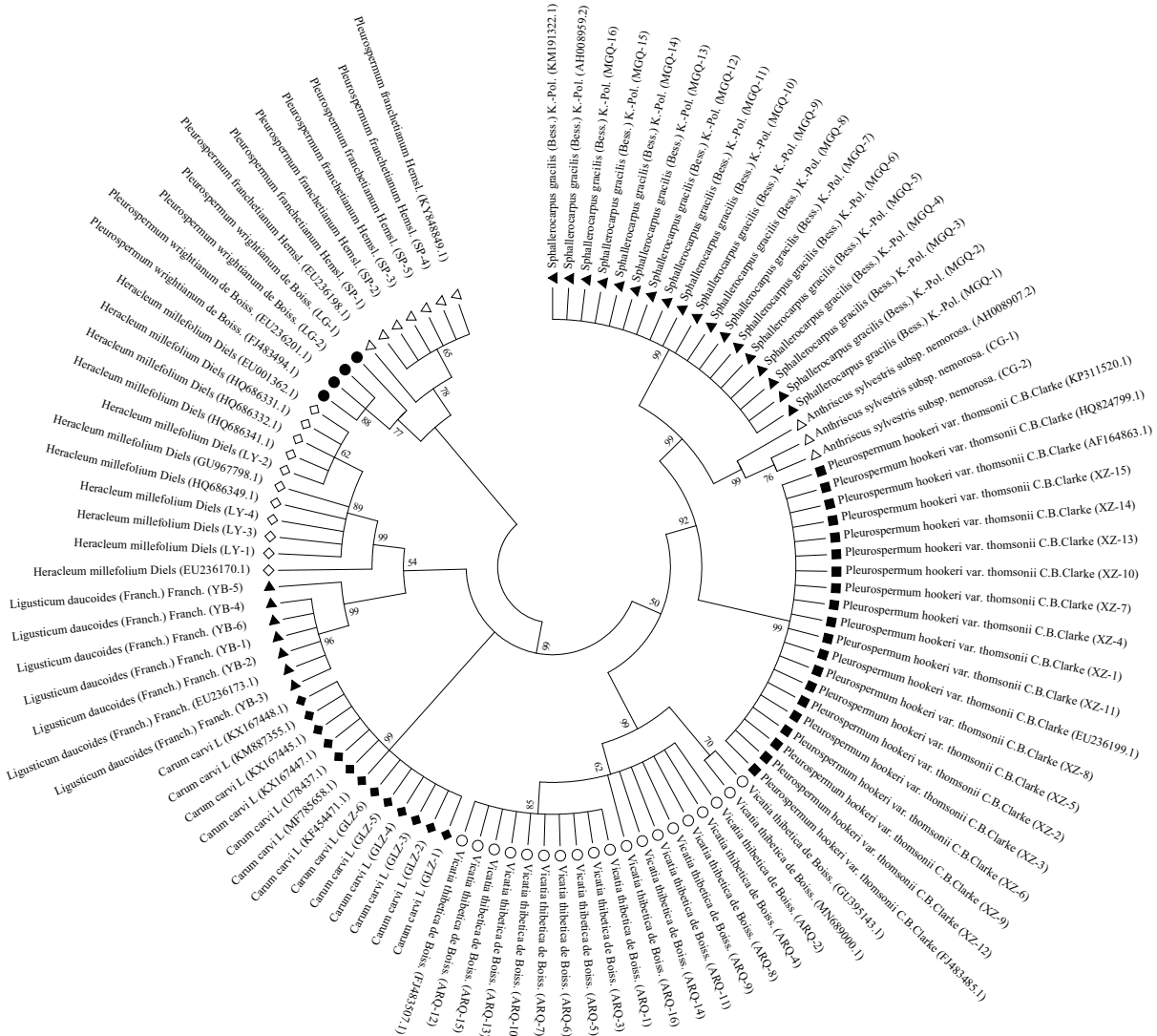


图2 基于 ITS2 序列构建的邻接法(N-J)系统聚类树

Fig.2 Phylogenetic tree constructed with ITS2 sequences using N-J method

3.7 ITS2 二级结构分析

进行 ITS2 二级结构预测时,数据库有与西藏凹乳芹、松潘棱子芹、裂叶独活、羽苞蕈本、瘤果棱子芹主导单倍型相同,或者高度相似的模型;西藏棱子芹、

迷果芹、刺果峨参、葛缕子主导单倍型可以直接生成二级结构,见图3。可见,加哇与其易混品在4个螺旋区的茎环数目、大小、位置有所差异,依据 ITS2 二级结构可以直观地进行区分,具体分析如下。

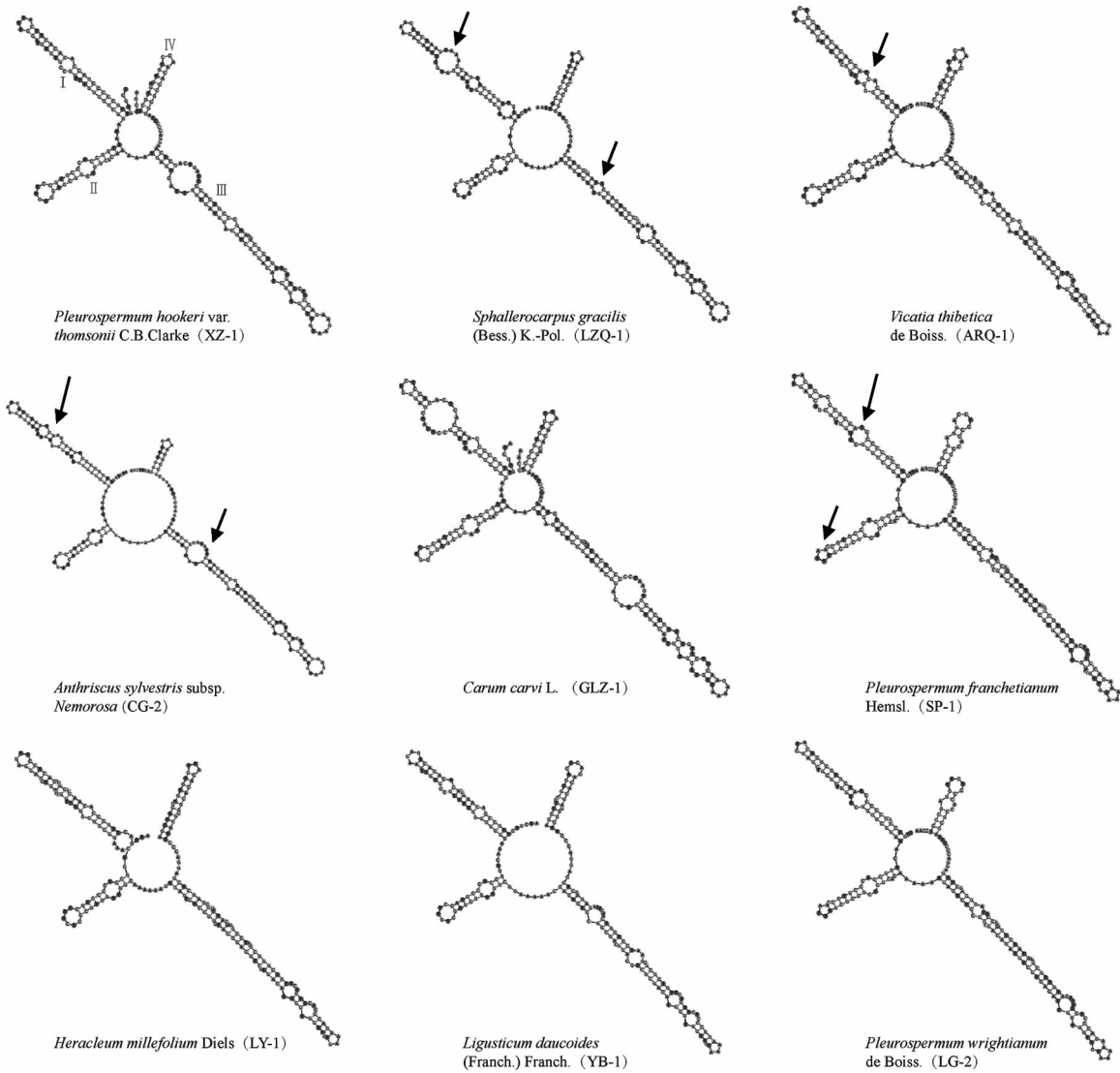


图3 ITS2 二级结构

Fig. 3 ITS2 secondary structure

可以看出所有物种的二级结构都是典型的1环4臂结构:一个中心环和4个螺旋区,每个螺旋上又有茎环结构,其中螺旋Ⅲ最长。通过茎环数目(表6)可区分西藏棱子芹、葛缕子、裂叶独活、羽苞蕈本、瘤果棱子芹,无法区分迷果芹与刺果峨参、西藏凹乳芹与松潘棱子芹,但可以通过茎环的大小及位置对两者进行区分。

迷果芹与刺果峨参在螺旋Ⅰ中均具有四环,但迷果芹第二环大于其余三环且4个环分布较为

均匀,刺果峨参4个环大小相似,且分布较为集中;在螺旋Ⅲ中均具有五环,但迷果芹第一环小于其余四环,刺果峨参第一环大于其余四环,故能区分两者。

西藏凹乳芹与松潘棱子芹在螺旋Ⅰ中均具有三环,但西藏凹乳芹第二环与第三环分布集中,而松潘棱子芹三个环分布较为均匀;在螺旋Ⅱ中均具有两环,但西藏凹乳芹第一环与第二环大小较为接近,而松潘棱子芹第一环明显小于第二环,故能区分两者。

表 6 藏药加哇及其易混品茎环数目

Tab. 6 Number of stem loops of Tibetan medicine Jiawa and its easily mixed species

Name	Helix I	Helix II	Helix III	Helix IV
<i>Pleurospermum hookeri</i> var. <i>thomsonii</i> C. B. Clarke	2	2	5	1
<i>Sphallerocarpus gracilis</i> (Bess.) K. -Pol.	4	2	5	1
<i>Vicatia tibetica</i> de Boiss.	3	2	4	2
<i>Anthriscus sylvestris</i> subsp. <i>Nemorosa</i>	4	2	5	1
<i>Carum carvi</i> L.	3	2	6	1
<i>Pleurospermum franchetianum</i> Hemsl.	3	2	4	2
<i>Heracleum millefolium</i> Diels	3	2	3	1
<i>Ligusticum daucooides</i> (Franch.) Franch.	3	2	5	1
<i>Pleurospermum wrightianum</i> de Boiss.	2	2	5	2

4 讨论

加哇及其混淆品从药材上难以通过传统的鉴别方法将其完全区分,故使用 2020 年版《中国药典》四部通则^[13] 记载的中药材 DNA 条形码分子鉴定法。其不受个体形态和完整性的影响,方法易于统一、标准化,是传统鉴定方法的有效补充^[14]。本研究基于前期的基原鉴定,提取 72 批加哇及其易混品的 DNA,获取 ITS2 序列信息,并从 GenBank 数据库下载 30 条序列,对所有 102 条序列进行比对分析,发现通过 K2-P 遗传距离分析可显著区分除松潘棱子芹与瘤果棱子芹外的所有基原,无法区分的松潘棱子芹与瘤果棱子芹可通过 N-J 树聚类分析及 ITS2 二级结构分析得到区分。此方法利用 ITS2 一级核酸序列分析,并结合了 ITS2 二级结构实现对其物种的鉴定^[8],可以作为 DNA 条形码鉴别中药材的辅助手段。此方法可用于加哇及其混淆品基原种的鉴别,为保障加哇的临床用药安全和疗效提供了参考依据,对其资源的开发利用也有着重要的价值。

通过 K2-P 遗传距离分析发现,松潘棱子芹与瘤果棱子芹之间不具有明显的条形码间距,且在聚类分析中,两支也以 100% 的置信度聚为一大支,可以看出,两者的亲缘关系较为接近,这与植物分类学的观点是一致的:在《中国植物志》中,两者均为伞形科棱子芹属植物,从分子生物学的角度验证了其归属的可信度^[10]。

REFERENCES

[1] Yutuo · Yuandangongbu. *Four Medical Classics*(四部医典)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers,1987:169.

[2] Pharmaceutical Standards of the Ministry of Health of the People's Republic of China: Tibetan Medicine Volume 1(中华人民共和国卫生部药品标准:藏药第一册)[S]. 1995:340.

[3] Sichuan Provincial Standard for Traditional Chinese Medicine(四川省中药材标准)[S]. 2011:284-287.

[4] Volume I of the Standards for Tibetan Medicinal Materials in the Tibet Autonomous Region(西藏自治区藏药材标准第一册)[S]. 2012:54.

[5] Qinghai Provincial Standard for Tibetan Medicinal Materials(青海省藏药材标准)[S]. 2020:107-113.

[6] TIAN R, WU Y, GU W, *et al.* Molecular identification of Erythrinae Cortex and its adulterants based on ITS2 sequence[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2021, 52(1):211-218.

[7] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, *et al.* *Biological identifications through DNA barcodes*[J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270(1512):313-321.

[8] GAO B X, QI J L, ZHONG H, *et al.* Identification of commonly used origins of Tibetan medicine *Lagotidis Herba* based on ITS2 barcode and market analysis[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2022, 53(21):6857-6864.

[9] QI J L, GAO B X, GOU Y, *et al.* Identification of *zanthoxylum armatum* and its closely related species based on ITS2 sequence[J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2021, 23(5):786-791,814.

[10] SUN S Y, CHEN Y, WANG Q R, *et al.* Molecular Identification of *Lysimachia christinae* and its Substitute and Adulterants based on the ITS2 and rbcL Barcodes[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2020, 43(6):1336-1342.

[11] LIU Q, GU W, YANG B, *et al.* Molecular identification of *Cynanchum auriculatum* and its closely related species based on ITS2 sequence[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2018, 49(24):5901-5909.

[12] CHENG B, DILINUER T, YU L T, *et al.* Identification of uighur medicine *ribes nigrum* and its adulterants based on Internal transcribed spacer 2[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2023, 58(3):231-235.

[13] *Ch. P* (2020) Vol IV(中国药典 2020 年版·四部)[S]. 2020:126.

[14] CHEN S L. *Standard DNA Barcodes of Chinese Materia Medica in Chinese Pharmacopoeia*(中国药典中药材 DNA 条形码标准序列)[M]. Beijing: Science Press, 2015: 23.

(收稿日期:2023-02-21)