

· 基础研究 ·

基于性状鉴别和 DNA 条形码联用的
虎尾海马生药学研究[△]来梦茹¹, 方昀¹, 葛宇清², 黄真¹, 张光霁¹, 程汝滨^{1*}

1. 浙江中医药大学 药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学 第一临床医学院, 浙江 杭州 310053

[摘要] **目的:** 采用性状-线粒体 COI 条形码联用的方法对市售海马药材伪品虎尾海马 *Hippocampus comes* 进行生药学研究, 提供主要海马药材伪品虎尾海马的性状和分子的鉴定特征, 为海马药材的鉴定提供新方法。**方法:** 利用外观性状鉴别方法对虎尾海马典型性状特征进行研究; 扩增获得虎尾海马样品的 COI 条形码序列, 比较各序列的碱基组成、GC 含量、变异率等, 分析虎尾海马与常见海马药材的正品和伪品序列, 明确其种内和种间遗传距离; 利用 NJ(neighbor-joining)法构建虎尾海马与常见海马样品的系统进化发育树, 分析其亲缘关系。**结果:** 虎尾海马最典型性状鉴别特征为尾部有交替出现的花斑, 头冠低小且有 5 个显著的圆形突起; 虎尾海马样品的 COI 序列长度为 649 bp, 碱基 GC 平均含量为 39.73%, 种内的平均遗传距离为 0.001 1, 其种内遗传距离远小于与另外 8 种海马药材的种间遗传距离, 存在显著的条形码间隔; NJ 系统发育树显示虎尾海马与其他海马药材各自聚为一支, 其分支支持率为 100%, 与刺海马的亲缘关系最近。**结论:** 基于性状鉴别-线粒体 COI 条形码的生药学研究方法能够准确鉴定虎尾海马, 与其他海马进行准确区分, 为虎尾海马的快速鉴定提供了新的手段, 对改善市售海马混乱的流通现状、控制和提高海马药材质量具有重要意义。

[关键词] 虎尾海马; COI 序列; DNA 条形码; 分子鉴定**[中图分类号]** R282.74; R282.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1173-08**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20190217003**Pharmacognosical Identification of *Hippocampus comes* Based on the Combination of the Morphological Characteristics and DNA Barcodes**LAI Meng-ru¹, FANG Yun¹, GE Yu-qing², HUANG Zhen¹, ZHANG Guang-ji¹, CHENG Ru-bin^{1*}

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. The First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

[Abstract] **Objective:** To investigate pharmacognosically the seahorse adulteration *Hippocampus comes* using the combination of morphological characteristics and DNA barcodes, and provide key features and new method for the quick identification of *H. comes* and other hippocampus species. **Methods:** The typical characteristics of *H. comes* were obtained based on morphological observation according to classification and identification methods in traditional pharmacognosical research. DNA barcoding technology was applied to provide specific molecular identification marker for *H. comes*. After the amplification of COI sequence from *H. comes* species, the base composition, GC content and proportion of variable sites were calculated using the MEGA 7.0. The intra-specific and inter-specific divergence and barcoding gap were analyzed and a phylogenetic analysis tree was constructed by the neighbor-joining (NJ) methods. **Results:** The most typical features of *H. comes* were striped tail and low coronet with 5 distinct points. The length and GC contents of COI sequence were 649 bp and 39.73%, respectively. The average genetic distance among 20 samples of *H. comes* was 0.001 1, and the maximum intra-specific distance was far less than the minimum inter-specific distance, with an obvious barcoding gap. The NJ phylogenetic tree showed that 20 samples of *H. comes* formed a clade with a 100% bootstrap value, and *H. comes* is closely related to *H. histrix*. **Conclusion:** The pharmacognosical identification based on the combination of the morphological characteristics and DNA barcodes can identify *H. comes* accurately

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002-4-4); 浙江省新苗人才计划项目(752214F00803)

* [通信作者] 程汝滨, 副研究员, 研究方向: 中药资源开发与活性评价; Tel: (0571) 61768180, E-mail: biotcheng@hotmail.com

and quickly. Our results provided a novel method for the identification of *H. comes*, which has significant impacts for the clinical medication safety control and trading of hippocampus species in Chinese medicinal material market.

[**Keywords**] *Hippocampus comes*; COI sequence; DNA barcoding; molecular identification

海马在中国素有“南方人参”之称,早在《神农本草经》中就有记载,传统中医药学认为其既善补肾壮阳益精,治肾阳虚衰之证,又能活血散结、消肿止痛、治微瘕积聚和疮肿等症^[1]。2015 年版《中华人民共和国药典》收录了 5 种药用海马,分别为小海马 *Hippocampus mohnikei*、大海马 *H. kuda*、刺海马 *H. histrix*、线纹海马 *H. kelloggi*、三斑海马 *H. trimaculatus* 的干燥体,但对其性状描述较为简略^[2]。在中医药大健康产业发展背景下,对海马等传统的名贵滋补类中药的需求量日益增加。但天然海马的产量本身不高,加之气候和环境变化,导致我国海马药材的生产量远不能满足需求量,其中 70% 以上的海马药材资源需要依靠进口。由于海马动物种类繁多,亲缘关系和品种性状相近,不易区分,导致近年来市场上的海马品种较为混乱,掺伪掺假现象越来越频繁,严重影响了海马药材临床用药安全^[3-5]。

虎尾海马 *H. comes* 作为流通在中药市场上的药用海马伪品之一,主要分布于菲律宾、印度尼西亚、马来西亚、泰国、新加坡等东南亚地区的近岸海域^[6-7]。因过度捕捞和环境破坏,其在部分地区数量已经减少了 70%^[8-9]。在药材市场中,虎尾海马常被作为刺海马的伪品之一流通使用,关于虎尾海马的研究处于起步阶段,相关的文献资料较少。不同海马干燥体的外观差异不明显,鉴别难度较大,且海马药材常以药材粉末形式流通,为海马品种的鉴别带来了极大的困难,故亟需建立有效的鉴定方法来改善市售海马的流通现状,提高海马药材的质量。

目前对虎尾海马的生药学鉴定研究尚未见相关报道,本文拟利用性状鉴别联合 DNA 条形码鉴定技术对虎尾海马进行系统的生药学研究,提供虎尾海马典型的性状和分子鉴别特征,为虎尾海马的快速准确鉴定提供技术保证,为后续的海马药材销售市场规范和法规制定提供参考,为海马药材用药安全管理奠定基础。

1 材料

1.1 药材

本实验共收集海马药材样品 28 份,分别购自安徽亳州、浙江磐安、山东威海的药材市场和海马养殖厂,包括虎尾海马样品 20 份,三斑海马样品 4 份,直立海马样品 4 份。经浙江中医药大学第一临床医学院葛宇清副研究员鉴定,分别为虎尾海马、三斑海马和直立海马。将所用样品做好标记,于干燥封口袋中避光保存,样品保存于浙江中医药大学药学院。同时在 GenBank 数据库中下载 26 条 COI 序列(线纹海马 *H. kelloggi* 4 条,大海马 *H. kuda* 4 条,刺海马 *H. histrix* 4 条,棘海马 *H. spinosissimus* 4 条,太平洋海马 *H. ingens* 4 条,小海马 *H. mohnikei* 4 条,拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* 和刁海龙 *Solegnathus hardwickii* 各 1 条)。为保证下载序列与物种对应关系的正确性,本文对 GenBank 数据库获取的 26 条 COI 序列一一进行了 NCBI-BLAST 同源性比对分析,结果表明引用序列与其他同种海马的 COI 序列同源性达 98% 以上,确保了引用序列的准确性。样本来源及其 DNA 条形码序列详细信息见表 1。

表 1 海马样品来源及 COI 序列信息

序号	物种	拉丁名	单倍型	长度/bp	GC 碱基含量/%	样品来源	GenBank 登录号
1	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A1	649	39.6	安徽亳州	MK287950
2	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A2	649	39.9	安徽亳州	MK287951
3	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287952
4	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287953
5	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287954
6	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287955
7	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287956
8	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287957
9	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287958

续表 1

序号	物种	拉丁名	单倍型	长度/bp	GC 碱基含量/%	样品来源	GenBank 登录号
10	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287959
11	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A4	649	39.4	安徽亳州	MK287960
12	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287961
13	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287962
14	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287963
15	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A4	649	39.4	安徽亳州	MK287964
16	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287965
17	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287966
18	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A5	649	39.6	安徽亳州	MK287967
19	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A3	649	39.8	安徽亳州	MK287968
20	虎尾海马	<i>H. comes</i>	A6	649	39.6	安徽亳州	MK287969
21	三斑海马	<i>H. trimaculatus</i>	B1	649	40.2	浙江磐安	MH346182
22	三斑海马	<i>H. trimaculatus</i>	B1	649	40.2	浙江磐安	MH346183
23	三斑海马	<i>H. trimaculatus</i>	B2	649	40.4	浙江磐安	MH346184
24	三斑海马	<i>H. trimaculatus</i>	B3	649	40.1	浙江磐安	MH346185
25	直立海马	<i>H. erectus</i>	C1	649	42.7	山东威海	MH337328
26	直立海马	<i>H. erectus</i>	C1	649	42.7	山东威海	MH337329
27	直立海马	<i>H. erectus</i>	C2	650	42.9	山东威海	MH337330
28	直立海马	<i>H. erectus</i>	C3	648	42.4	山东威海	MH337331
29	线纹海马	<i>H. kelloggi</i>	D1	649	40.5	GenBank	KP140102
30	线纹海马	<i>H. kelloggi</i>	D2	649	40.4	GenBank	KP140103
31	线纹海马	<i>H. kelloggi</i>	D2	649	40.4	GenBank	KP140104
32	线纹海马	<i>H. kelloggi</i>	D2	649	40.4	GenBank	KP140105
33	大海马	<i>H. kuda</i>	E1	648	40.3	GenBank	GU805014
34	大海马	<i>H. kuda</i>	E1	648	40.3	GenBank	GU805015
35	大海马	<i>H. kuda</i>	E1	648	40.3	GenBank	GU805016
36	大海马	<i>H. kuda</i>	E1	648	40.3	GenBank	GU805017
37	刺海马	<i>H. histrix</i>	F1	649	40.1	GenBank	KP140018
38	刺海马	<i>H. histrix</i>	F1	649	40.1	GenBank	KP140019
39	刺海马	<i>H. histrix</i>	F1	649	40.1	GenBank	KP140020
40	刺海马	<i>H. histrix</i>	F1	649	40.1	GenBank	KP140021
41	棘海马	<i>H. spinosissimus</i>	G1	649	39.9	GenBank	KP140225
42	棘海马	<i>H. spinosissimus</i>	G2	649	39.8	GenBank	KP140226
43	棘海马	<i>H. spinosissimus</i>	G3	649	40.1	GenBank	KP140227
44	棘海马	<i>H. spinosissimus</i>	G1	649	39.9	GenBank	KP140228
45	太平洋海马	<i>H. ingens</i>	H1	649	40.5	GenBank	GQ502148
46	太平洋海马	<i>H. ingens</i>	H2	649	40.7	GenBank	GQ502149
47	太平洋海马	<i>H. ingens</i>	H2	649	40.7	GenBank	GQ502150
48	太平洋海马	<i>H. ingens</i>	H2	649	40.7	GenBank	GQ502151
49	小海马	<i>H. mohnikei</i>	I1	633	39.2	GenBank	KX689224
50	小海马	<i>H. mohnikei</i>	I2	633	39.5	GenBank	KX689225
51	小海马	<i>H. mohnikei</i>	I3	633	39.3	GenBank	KX689226
52	小海马	<i>H. mohnikei</i>	I3	633	39.3	GenBank	KX689227
53	拟海龙	<i>S. biaculeatus</i>	J1	651	46.4	GenBank	GQ502179
54	刁海龙	<i>S. hardwickii</i>	K1	649	45.3	GenBank	KP140480

1.2 试剂

无水乙醇(西陇化工有限公司);海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司);琼脂糖粉(Solarbio);50×TAE缓冲液[生工生物工程(上海)股份有限公司];DL2000 DNA Marker(TaRaKa公司);6×Loading Buffer(TaRaKa公司);溴化乙锭染料(Solarbio);10×PCR buffer(TaRaKa公司);dNTP Mix(TaRaKa公司);r-Taq酶(TaRaKa公司);引物COI由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.3 主要仪器设备

多功能精密电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];恒温金属浴锅(上海培清实验仪器有限公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一有限公司);超微量分光光度计(美国Amersham公司);微波炉(青岛海尔有限公司);PCR仪、离心机[宝生物工程(大连)有限公司]。

2 方法

2.1 DNA提取

将20个虎尾海马样品进行编号,用75%乙醇擦拭尾部,分别剪取约5 mg的尾部组织于EP管中,样本的基因组总DNA均用DNA提取试剂盒(Takara公司)提取,按照试剂盒说明书进行提取。用超微量分光光度计检测样本DNA的纯度和浓度,置于-20℃保存。

2.2 PCR扩增及测序

在COI序列通用扩增引物LC01490/HCO2198的基础上^[10],结合海马属已知COI基因的序列特点,优化设计了虎尾海马的COI基因的扩增引物COI-F和COI-R,其中引物的序列信息如下,正向引物COI-F:5'-TTCTCAACTAATCACAAAGACATCGGCA-3';反向引物COI-R:5'-ACTTCAGGRTGTCCRAAGAATCAG-AATAAG-3'。以样品DNA作为模板,对样品的COI序列进行PCR扩增,查阅文献并结合实际实验情况加以验证,优化确定最佳扩增体系与反应程序进行扩增^[11]。采用的50 μL PCR扩增体系:10×PCR buffer 5 μL, r-Taq酶0.5 μL, dNTP Mix 5 μL, 上游引物(F)1 μL, 下游引物(R)1 μL, 模板DNA 5 μL, 加ddH₂O补足至50 μL。PCR反应程序:95℃预变性5 min, 95℃变性45 s, 52℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 33个循环;72℃延伸15 min, 4℃保存。

扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳检测,参照DNA maker电泳条带读出PCR产物的大小和质量(检查条带是否含有杂带以及是否明亮单一),纯化后寄往上海桑尼生物科技有限公司测序,样品均采用ABI3730 XL测序仪双向测序。

2.3 数据处理与序列分析

通过提取DNA、PCR扩增和产物测序,将测序结果在BLAST中进行比对。去除上下游引物序列,用Clustal W进行序列比对,两两产生同源性,将20条虎尾海马样品的COI序列结果提交至GenBank数据库,登录号详见表1。利用MEGA 7.0软件计算所测COI序列碱基组成和长度,基于K2P双参数模型计算并分析碱基变异位点、信息位点、转换/颠换、种内及种间遗传距离等;通过邻接法构建系统进化树(NJ树),分析虎尾海马与其他海马之间的亲缘关系。

3 结果

3.1 性状特征鉴别

虎尾海马与线纹海马、大海马、三斑海马和小海马的形态区别明显,但与刺海马较为相似,容易混淆,因此常被作为刺海马伪品在市场上流通。研究观察表明,虎尾海马最大体长18.7 cm,体表多为褐色,体上棘状突起较为明显,呈钮状,尖端大多黑色,体环11个,尾环多为35~36个。头冠矮小,顶端有5个明显的圆形突起,吻长不及头长1/2,鼻刺显著,具双颊棘。体轻,骨质坚硬,气微腥,味微咸。虎尾海马的体表多花斑,尾部有交替出现的斑纹,似老虎的尾巴,虎尾海马因此而得名,这一特点是虎尾海马最典型的鉴别特征,也是与刺海马的重要区别点。虎尾海马干燥体形态如图1所示。

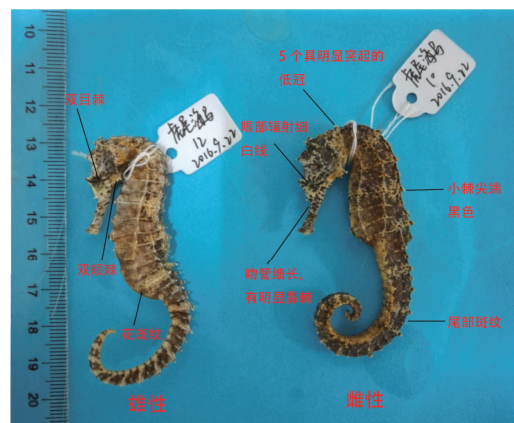
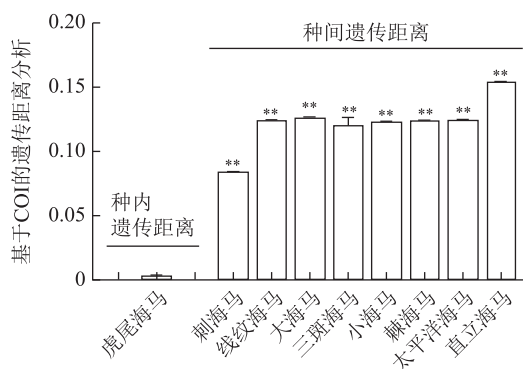


图1 虎尾海马干燥体形态

3.2 条形码序列和遗传距离分析

本研究对 20 个虎尾海马样品的 COI 基因进行了 PCR 扩增及测序, 采用 MEGA 7.0 软件对 COI 序列的长度、GC 含量、碱基变异位点、信息位点、转换/颠换等进行分析。结果表明, 虎尾海马的 COI 序列全长 649 bp, 其中 A、C、G、T 碱基平均含量分别为 27.13%、22.80%、16.93%、33.14%, G + C 平均含量为 39.73%, 明显低于 A + T 平均含量 60.27%。COI 基因序列在虎尾海马不同个体之间存在一定的种内变异率, 其中保守位点 643 bp, 变异位点 6 bp, 变异率为 0.92%。在 20 个虎尾海马样品中 COI 序列的信息位点为 1 bp, 转换值为 1, 不存在颠倒现象。通过虎尾海马 COI 序列的单倍型数目分析发现, 虎尾海马 COI 序列存在 6 种单倍型, 其中主导地位的单倍型为 A3, 占样品总量的 70%, 提示 COI 条形码序列在虎尾海马种内存在一定的变异率, 可用于后续的种群和地理进化关系研究。

将获得的 20 个虎尾海马样品 COI 序列和其他 8 种正伪品海马样品的 COI 序列进行分析, 基于 K2P 参数模型计算虎尾海马 COI 基因的种内和种间遗传距离(见图 2)。结果表明, COI 条形码序列在虎尾海马的最大种内遗传距离远小于其最小的种间遗传距离, 虎尾海马 COI 序列的种内遗传距离为 0.000 ~ 0.004 9, 种内平均遗传距离为 0.001 1, 虎尾海马与其他 8 种海马样品的种间遗传距离为 0.085 7 ~ 0.158 4, 其中与直立海马的种间遗传距离最大(0.158 4), 与刺海马的种间遗传距离最小(0.085 7), 种间的平均遗传距离为 0.123 9。虎尾海马 COI 序列最小种间遗传距离是其最大种内遗传



注: ** $P < 0.01$ 。

图2 虎尾海马与其他海马 COI 序列遗传距离分析

距离的 17.5 倍, 存在显著条形码间隙 (barcoding gap), 因此通过分析不同海马样品的 COI 序列, 可将虎尾海马与其他不同海马品种明显区分。

3.3 NJ 树聚类分析

为进一步确定 COI 序列在虎尾海马和其他海马正伪样品间的鉴定能力, 本文以 K2P 为参数模型, 基于 COI 序列采用邻接法构建虎尾海马、8 种其他正伪品海马和 2 种海龙的 NJ 树, 并通过 bootstrap (1000 次重复) 检验各分支支持率。图 3 结果表明, 虎尾海马的 20 个样品聚成一个大分支, 其分支支持率为 100%, 明显与其他 8 种海马和 2 种海龙区分开。此外, 虎尾海马内部存在一定的分支亚群, 但其分支支持率较低, 且进化树结构不稳定。虎尾海马与刺海马聚集成一分支, 其支持率为 95%, 说明虎尾海马与刺海马的亲缘关系较近, 可作为刺海马的替代品用于后续的研究和开发。通过 COI 序列的 NJ 树聚类分析, 可将虎尾海马与其他的海马品种明显区分, 为虎尾海马的鉴定提供了快速准确的方法。

4 讨论

本文对虎尾海马的性状特征和 DNA 条形码进行了系统研究, 明确了虎尾海马与常见正伪品海马样品间最显著的鉴别特征, 对条形码 COI 序列在虎尾海马种内种间的变异率、遗传距离和 NJ 树聚类进行了分析, 为虎尾海马快速准确鉴定技术的开发奠定了基础。

传统的中药材鉴定方法包括性状鉴别、显微鉴定、粉末鉴定和理化鉴别等。前期文献报道不同海马药材粉末显微鉴定过程中, 发现不同海马品种来源的皮肤碎片、横纹肌纤维、骨碎片和胶原纤维等显微结构多样, 但种间差异不具有统计学意义, 无法准确鉴别海马的种类^[12]。因此, 本研究采用了性状鉴定和分子鉴定联用技术, 对中药市场上常见的海马伪品虎尾海马进行生药学研究。实验结果表明, 20 条虎尾海马样品中存在 6 种单倍型, 说明 COI 条形码序列在虎尾海马种内存在一定的变异率, 可用于后续的种群和地理进化关系研究。虎尾海马的 COI 序列总长度 649 bp, 碱基 A + T 的含量大于碱基 G + C 的含量, 同时 4 种碱基中 G 的含量较其他 3 种碱基低, 这与脊椎动物线粒体 DNA 特点一致^[13]。

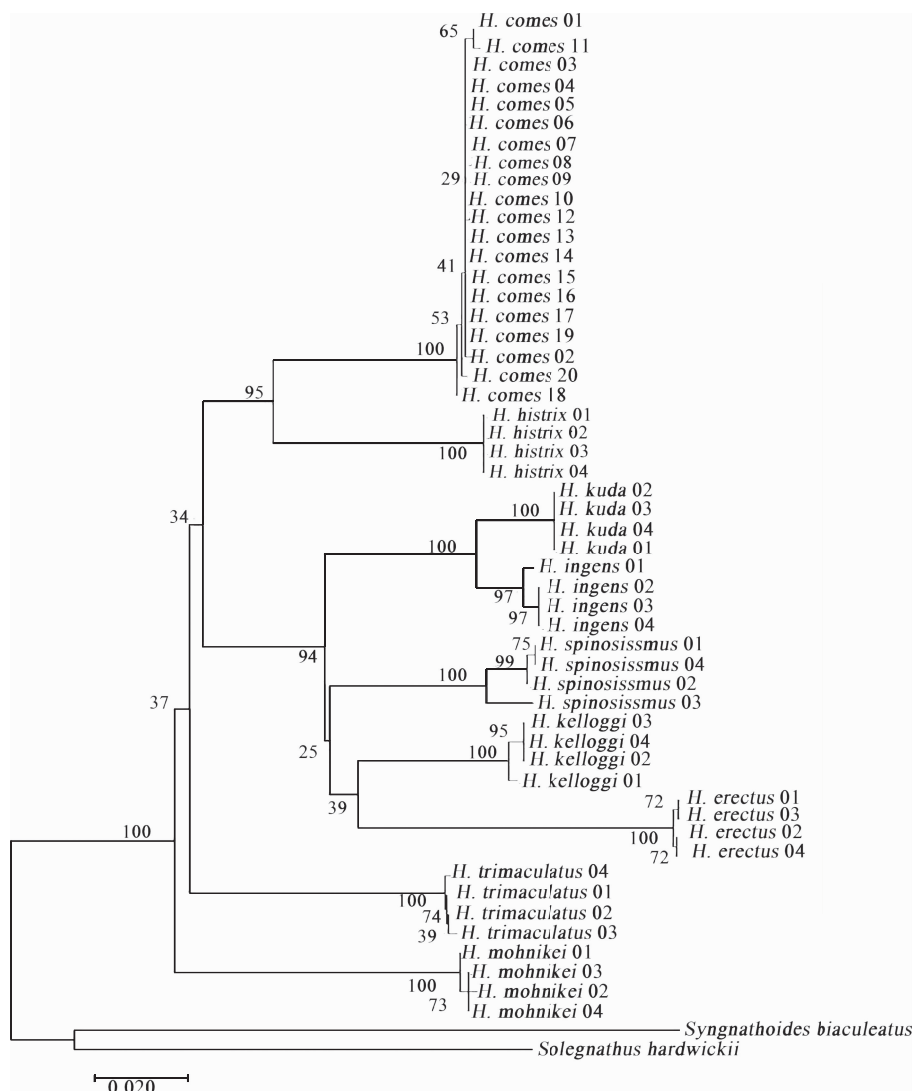


图3 基于 COI 序列构建的虎尾海马系统发育树

DNA 条形码(DNA Barcoding)是一种新兴的生物分类学技术,近年来在中药材鉴定及相关领域有迅速的发展和应用。构建中药材 DNA 条形码分子鉴定数据库,有利于对中药材的准确快速鉴定,为保证临床用药安全提供坚实基础^[14-15]。其中,COI 基因是动物药 DNA 条形码序列的首选序列,具有 PCR 扩增效率高、进化速率快、种间遗传大于种内遗传等特点^[16]。张辉等^[17]选取了《中华人民共和国药典》中 45 个动物药材进行研究,结果表明 COI 序列作为 DNA 条形码适用于《中华人民共和国药典》中动物药材的鉴定,在药用动物的分类鉴定中可被广泛应用。赵群等^[18]研究了 6 种蟾蜍及 4 种易混淆品的 COI 线粒体基因 DNA 序列,证明 COI 条形码能够准确鉴定中华蟾蜍。张红印等^[19]研究了 5 个物种 50 份蜈蚣样品,证实 COI 条形码序列可以准确鉴定蜈

蚣及其混伪品。石林春等^[20]研究了 13 个物种 68 份蛇蛻原药材样品,说明 COI 条形码不仅可以鉴定中药材蛇蛻的 3 种基原,而且可以区分蛇蛻及其易混伪品。张改霞等^[21]对 21 个物种 211 条海马及其混伪品的 COI 序列进行分析,证明 COI 序列能够作为 DNA 条形码准确鉴定海马及其混伪品。基于上述研究结果的启发与指导,故本文采用 COI 基因作为鉴别虎尾海马及其他正伪品海马的 DNA 条形码。研究结果表明,COI 序列在虎尾海马的种内种间遗传距离存在显著条形码间隙,NJ 树聚类分析表明,虎尾海马单独聚为一支,且节点支持率均达到 100%,结果说明了通过 COI 条形码序列,可准确区分虎尾海马与其他市场常见的正伪品海马,也进一步证实了 COI 条形码在动物类中药分类鉴定中的通用性和准确性。本文的研究为 COI 条形码准确鉴定动物药虎

尾海马提供了分子依据,扩充了DNA条形码数据库中药用动物序列,并为建立海马分子鉴定技术流程奠定了基础。

COI条形码序列作为一种线粒体基因,被广泛应用于分类鉴定、系统发育关系和种群遗传结构的研究中。海马作为重要的海洋药用动物,其均属于海龙科海马属动物,其亲缘关系较近,利用单一条形码在鉴定过程中有时无法准确区分,影响分子鉴定的准确性。蒋超等^[4]研究表明,COI序列进行NJ聚类分析时,管海马、太平洋海马、西非海马、吻海马、短吻海马和南非海马等共同聚为一大支,形成管海马复合体,而无法相互区分。Chang等^[22]已经完成了虎尾海马的线粒体全序列测定工作,为其后续的鉴定与进化分析研究奠定了基础。与单个线粒体条形码基因相比,线粒体全序列包含的遗传信息更丰富、变异位点和序列更多样,故可通过不同药材品种间的线粒体全序列比对,确定物种间最显著的差异序列,为后续的DNA条形码开发奠定基础^[23-24]。课题组长期致力于中药资源的开发和分子鉴定等方面的工作,近年来在海马等海洋动物类药材的分类鉴定和DNA条形码开发等领域做了部分工作。为建立适用于海马药材分子鉴定的技术体系,课题组通过获得线粒体全基因组序列,建立海马及其混伪品的系统发育关系,明确不同海马来源的分子进化地位,筛选速度适中的可用于区分近缘海马的DNA条形码分子标签。目前,课题组已完成包括线纹海马、棘海马、南非海马、欧洲海马和驼背海马在内的7种海马线粒体基因组全序列,为规范海马中药材市场的技术开发奠定基础,也为我国海马资源的遗传多样性保护、资源开发与利用、海马良种选育提供了数据支撑^[25-30]。

虎尾海马作为常见海马药材之一,来源广,数量多,养殖存活率相对于其他海马较高,具有良好的开发应用前景^[31]。作为海马属的模式物种之一,虎尾海马的全基因组测序工作已经完成^[32]。测序和分析结果表明,相比于其他硬骨鱼基因组,虎尾海马基因组中蛋白质和核苷酸的进化速率最快,其丢失了大量的顺式调控元件,这些缺失可能在海马的演化革新中发挥重要作用。虎尾海马的全基因组信息,有助于揭示了海马特形体形和独特生活方式的形成原因,也为海马资源的药用价值开发和濒危资源保护技术运用提供指导。本文在性状鉴定和分子鉴定实验的基础上,对虎尾海马的性状和DNA条形

码鉴定技术进行了系统开发,为虎尾海马后续开发过程中品种的准确鉴定提供了技术保证,也为海马药源的扩展和养殖品种的引进开发提供了科学参考和数据支撑。

参考文献

- [1] 许实波,许东晖,吕军仪,等.我国海马中药材的研究开发前景[J].中草药,2002,33(1):80-82.
- [2] 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,2015:293.
- [3] 温琬莲.中药海马的品种与DNA条形码鉴定研究[D].成都:成都中医药大学,2014.
- [4] 蒋超,刘富艳,金艳,等.基于形态和DNA序列分析的海马类药材商品基原调查[J].中国中药杂志,2018,43(23):4553-4561.
- [5] 温琬莲,李军德,万德光,等.海马市场调查与基原动物鉴定研究[J].中国中药杂志,2013,38(7):969-972.
- [6] LOURIE S A, POLLOM R A, FOSTER S J. A Global Revision of the Seahorses *Hippocampus Rafinesque* 1810 (Actinopterygii: Syngnathiformes): Taxonomy and Biogeography with Recommendations for Further Research[J]. Zootaxa, 2016, 4146(1):1.
- [7] MORGAN S K, VINCENT A C J. The ontogeny of habitat associations in the tropical tiger tail seahorse *Hippocampus comes* Cantor, 1850[J]. J Fish Biol, 2010, 71(3):701-724.
- [8] MORGAN S K, LOURIE S A. Threatened Fishes of the World: *Hippocampus comes* Cantor 1850 (Syngnathidae) [J]. Environ Biol Fish, 2006, 75(3):311-313.
- [9] PERANTE N C, PAJARO M G, MEEUWIG J J, et al. Biology of a seahorse species, *Hippocampus comes* in the central Philippines[J]. J Fish Biol, 2010, 60(4):821-837.
- [10] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3(5):294-299.
- [11] 胡噪,杜鹤,崔丽娜,等.海马、海龙基于COI条形码的DNA分子鉴定[J].吉林中医药,2012,32(3):272-273.
- [12] 陈璐.中药海马的鉴别与质量标准研究[D].上海:第二军医大学,2015.
- [13] 张莉,最刘旺.龟鳖类线粒体全基因组的比较研究[J].生命科学研究,2007,11(3):258-262.
- [14] 陈梦,方韵,程汝滨,等.线粒体DNA标记在动物类药材分子鉴定中的应用进展[J].中草药,2018,49(13):3134-3142.
- [15] 辛天怡,雷美艳,宋经元.中药材DNA条形码鉴定研究进展[J].中国现代中药,2015,17(2):170-176,184.

- [16] 李琪,邹山梅,郑小东,等. DNA条形码及其在海洋生物中的应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2010,40(8):43-47.
- [17] 张辉,姚辉,崔丽娜,等. 基于COI条形码序列的《中国药典》动物药材鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2013,15(3):371-380.
- [18] 赵群,张恬,高波,等. 中华蟾蜍DNA条形码鉴定[J]. 中国现代中药,2017,19(1):11-15,20.
- [19] 张红印,陈俊,贾静,等. 中药材蜈蚣及其混伪品DNA条形码鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2208-2211.
- [20] 石林春,陈俊,刘冬,等. 基于COI条形码的中药材蛇蜕及其易混伪品的DNA分子鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2014,16(2):284-287.
- [21] 张改霞,刘金欣,贾静,等. 基于COI条形码的海马药材及其混伪品分子鉴定[J]. 中国药理学杂志,2015,50(17):1469-1473.
- [22] CHANG C H, LIN H Y, JANG-LIAW N H, et al. The complete mitochondrial genome of the tiger tail seahorse, *Hippocampus comes* (Teleostei, Syngnathidae) [J]. Mitochondr DNA, 2013, 24(3):199-201.
- [23] 刘杰,田晓轩,崔英,等. 药用动物乌梢蛇线粒体基因组全序列分析[J]. 天津中医药大学学报,2016,35(3):187-191.
- [24] CHENG R, ZHENG X, MA Y, et al. The Complete Mitochondrial Genomes of Two Octopods *Cistopus chinensis* and *Cistopus taiwanicus*: Revealing the Phylogenetic Position of the Genus *Cistopus* within the Order Octopoda [J]. PLoS One, 2013, 8(12):e84216.
- [25] CHENG R, LIAO G, GE Y, et al. Complete mitochondrial genome of the great seahorse *Hippocampus kelloggi* Jordan & Snyder, 1901 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. Mitochondr DNA A DNA Mapp Seq Anal, 2017, 28(2):227-228.
- [26] WANG Z, GE Y, CHENG R, et al. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Hippocampus spinosissimus* Weber, 1913 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. Mitochondr DNA A DNA Mapp Seq Anal, 2017, 28(3):303-304.
- [27] GE Y, ZHU L, CHEN M, et al. Complete mitochondrial genome sequence for the endangered Knysna seahorse *Hippocampus capensis*, Boulenger 1900 [J]. Conserv Genet Resour, 2018, 10(3):461-465.
- [28] CHEN M, ZHU L, CHEN J, et al. The complete mitochondrial genome of the short snouted seahorse *Hippocampus hippocampus*, Linnaeus 1758 (Syngnathiformes: Syngnathidae) and its phylogenetic implications [J]. Conserv Genet Resour, 2018, 10(4):783-787.
- [29] CHENG R, FANG Y, GE Y, et al. Complete mitochondrial genome sequence of the Jayakar's seahorse *Hippocampus jayakari* Boulenger, 1900 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. Mitochondr DNA Part B, 2017, 2(2):593-594.
- [30] LAI M, SUN S, CHEN J, et al. Complete mitochondrial genome sequence for the seahorse adulteration *Hippocampus camelopardalis* Bianconi 1854 [J]. Mitochondr DNA Part B, 2019, 4(1):432-433.
- [31] BUEN-URSUA SMA, AZUMA T, ARAI K, et al. Improved reproductive performance of tiger tail seahorse, *Hippocampus comes*, by mysid shrimp fed singly or in combination with other natural food [J]. Aquacult Int, 2015, 23(1):29-43.
- [32] LIN Q, FAN S, ZHANG Y, et al. The seahorse genome and the evolution of its specialized morphology [J]. Nature, 2016, 540(7633):395-399.

(收稿日期: 2019-02-17 编辑: 王丽英)