

· 资源与鉴定 ·

基于 DNA 条形码技术的知母种子基原鉴定

石林春^{1,2}, 金钺¹, 赵春颖³, 王秋玲¹, 谢利德³, 刘金欣^{1,3*}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 药用植物研究所 国家中医药管理局中药资源保护重点实验室, 北京 100193; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 3. 承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:建立基于中药材 DNA 条形码技术的知母种子基原鉴定方法,保障知母种子基原的真实性。方法:收集知母的 30 份基原植物样品和 9 份生药材样品,获取其参考 DNA 条形码序列,采用克隆测序方法验证参考序列的准确性。收集 51 份待检测知母种子样品,获取其 DNA 条形码序列,基于 BLAST 法、遗传距离法和邻接(NJ)系统发育树法进行物种鉴定。结果:对于基原植物和生药材样品,由于基因组内存在异质性,核糖体 DNA 第 2 内部转录间隔区(ITS2)序列无法稳定获得,但可成功获得 *psbA-trnH* 序列。知母 *psbA-trnH* 序列分为 6 个单倍型,有 3 个变异位点,2 处插入/缺失,种内变异最大值 0.003 5,种间变异最小值 0.1,在 NJ 系统发育树上聚为独立的支。共获得 153 条知母种子的 *psbA-trnH* 序列,经 BLAST 法、遗传距离法和 NJ 系统发育树法鉴定均为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides*。结论:*psbA-trnH* 是知母种子鉴定的适合条形码序列,可用于知母种子的真实性鉴定。所收集 51 份知母种子样品的基原均符合 2015 年版《中国药典》(一部)相关项下规定,未发现伪品。

[关键词] 知母; 种子; DNA 条形码; *psbA-trnH*; 鉴定; 基原植物

[中图分类号] R282;F124.5;R931;Q785 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0021-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181201

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1332.016.html>

[网络出版时间] 2018-03-27 14:33

Species Identification of Anemarrhena Rhizoma Seeds by DNA Barcoding Technique

SHI Lin-chun^{1,2}, JIN Yue¹, ZHAO Chun-ying³, WANG Qiu-ling¹,
XIE Li-de³, LIU Jin-xin^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Hebei Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a DNA barcoding based method for guarantee the species authenticity of Anemarrhena Rhizoma seeds. **Method:** Thirty original plant materials and nine raw materials have been collected for obtaining the reference DNA barcode sequences. The clone sequencing technique was employed to confirm the reliability of reference sequences. Fifty-one samples of Anemarrhena Rhizoma seeds pending to test have been collected, and DNA barcodes of these samples were obtained for taxonomic assignment by BLAST method, genetic distance method and neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree method. **Result:** For the original

[收稿日期] 20171214(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81641136,81703659);河北省教育厅青年拔尖人才项目(BJ201602);河北省自然科学基金项目(H2017406031);河北省中医药管理局项目(2017077);河北省三三三人才项目(A2017002090)

[第一作者] 石林春,博士,副研究员,从事中药资源相关研究,E-mail:linchun_shi@163.com

[通信作者] *刘金欣,博士,讲师,从事中药资源相关研究,E-mail:liujx_23@163.com

plants and raw materials, their internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequences could not be obtained stably as a result of intra-genomic heterogeneity. Meanwhile, their *psbA-trnH* sequences could be successfully obtained. Their *psbA-trnH* sequences could be divide into six haplotypes, including three variation sites and two insertions/deletions. The maximum intra-specific distance was 0.003 5, whereas the minimum inter-specific distance was 0.1. Their *psbA-trnH* sequences were composed of one clade at the NJ dendrogram. There were 153 *psbA-trnH* sequences have been obtained and all can be assigned to be *Anemarrhena asphodeloides* with BLAST method, genetic distance method and NJ phylogenetic tree method. **Conclusion:** The DNA barcoding technology is a reliable method for species identification of *Anemarrhena Rhizoma* seeds. All the samples of *Anemarrhena Rhizoma* seeds pending to test are in accordance with the origin of that ruled on the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* and no adulterant has been detected.

[**Key words**] *Anemarrhena Rhizoma*; seeds; DNA barcoding; *psbA-trnH*; identification; original plant

知母为临床常用药材,据 2015 年版《中国药典》记载^[1],知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* 的干燥根茎。味苦、甘,性寒,归肺、胃、肾经,具清热泻火、滋阴润燥的功能,常用于治疗外感热病、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘。知母的有效成分主要为芒果苷、知母皂苷、菝葜皂苷等皂苷类成分,具有多种药理活性,例如抑制中枢神经系统和交感神经系统、降糖、降脂、抗动脉粥样硬化、抑制癌细胞的生长并诱导其凋亡^[2-3]。知母是传统中药汤剂桂枝芍药知母汤和百合知母汤的主要组成药味,也是知柏地黄丸、二母宁嗽丸、健步丸等 200 余种现代中药的处方成分。知母为多年生草本植物,主要分布于我国北方地区,生于山地、干燥丘陵或草原地带^[4]。知母药材的栽培范围较广,主产地包括河北、河南、山东、山西等省^[5]。知母质量以河北所产为佳,易县、涞源为传统西陵知母(毛知母)和广昌知母(知母肉)的道地产区^[6]。知母栽种以种子繁殖为主,第一年孕籽,第二年移栽,第三或第四年出售商品。知母种子的真伪优劣是知母生产的源头和基础问题,使用错误鉴定的知母种子不仅会造成严重的经济损失,还会给知母的临床安全用药带来潜在风险。

我国中药材种子鉴定尚缺乏法定的标准检验规程^[7],常参照《农作物种子检验规程真实性和品种纯度鉴定》进行鉴定^[8],传统鉴定方法有形态鉴定法、基于理化性质的快速鉴定法、幼苗鉴定法和田间小区种植鉴定法。形态鉴定法^[9]常借助放大镜、显微镜、扫描电镜等工具完成对种子形状、颜色、长宽厚度、背面、腹面、突起、种脐、胚乳、子叶、胚根等细微特征观察,是当前运用最广泛的种子鉴定方法。陈瑛主编^[10]的《实用中药种子技术手册》记载了 650 种中药种子的形态特征,编制了中药种子形态

鉴定检索表。形态鉴定法依赖鉴定者的专业知识和经验积累,对近源物种的识别存在困难。DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、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,已在药用植物的基原鉴定和中药材(生药材及部分饮片)的物种鉴定中普及应用^[11],同时为中药材种子种苗的物种鉴定带来新的机遇^[12-16]。例如张改霞等^[13]基于核糖体 DNA 第 2 内部转录间隔区(ITS2)条形码对药用植物羌活种子进行分子鉴定研究,结果表明 DNA 条形码技术可以准确鉴别羌活种子的基原。将 DNA 条形码技术扩展到中药材种子种苗鉴定领域,从源头上保证了中药材种植的物种准确,对推动中药材种子种苗标准化具有重要意义。本实验拟采用 DNA 条形码技术对知母种子的基原进行鉴定,以保障该药味临床用药的安全性和有效性。

1 材料

T100 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),1-14 型离心机(德国 Sigma 公司),MM400 型球磨仪(德国 Retsch 公司),NanoDrop 2000 型微量分光光度计和 ABI 3730XL 型测序仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。植物 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],PCR MasterMix 试剂(北京艾德莱生物科技有限公司)。

共收集实验样品 90 份,包含基原植物样品 30 份,生药材样品 9 份,待检测种子样品 51 份。基原植物和生药材样品经中国医学科学院药用植物研究所王秋玲副研究员和承德医学院赵春颖教授鉴定,见表 1。待鉴定种子样品来自于知母的主产地、主要分布区和药材市场,见表 2。此外,采集吊兰族植物吊兰 *Chlorophytum comosum* 的原植物样品 3 份作为外类群。

表 1 基原植物样品和生药材样品的采集信息和 *psbA-trnH* 序列登录号

Table 1 Specimen information and *psbA-trnH* accessions of original plant samples and raw material samples

样品编号	物种名称	样品类型	采集部位	采集地	登录号
ZMP001	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	基原植物	叶片	药用植物研究所	MG545304
ZMP002	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	药用植物研究所	MG545305
ZMP003	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	药用植物研究所	MG545306
ZMP004	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	药用植物研究所	MG545307
ZMP005	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	承德医学院	MG545308
ZMP006	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	承德医学院	MG545309
ZMP007	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	承德医学院	MG545310
ZMP008	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	承德医学院	MG545311
ZMP009	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省安国市	MG545312
ZMP010	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省安国市	MG545313
ZMP011	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省安国市	MG545314
ZMP015	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545315
ZMP016	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545316
ZMP017	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545317
ZMP018	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545318
ZMP019	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545319
ZMP020	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545320
ZMP021	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545321
ZMP022	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545322
ZMP023	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545323
ZMP024	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545324
ZMP025	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545325
ZMP026	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	叶片	河北省滦平县	MG545326
ZMPS027	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	种子	承德医学院	MG545289
ZMPS028	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	种子	承德医学院	MG545290
ZMPS029	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	种子	承德医学院	MG545291
ZMPS030	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	种子	承德医学院	MG545292
ZMPS031	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	种子	河北省安国市	MG545288
ZMPS032	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	种子	河北省安国市	MG545293
ZMPS033	<i>A. asphodeloides</i>	基原植物	种子	河北省安国市	MG545294
ZMM001	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	北京同仁堂	MG545295
ZMM002	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	北京同仁堂	MG545296
ZMM003	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	北京同仁堂	MG545297
ZMM004	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	河北安国药市	MG545298
ZMM005	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	河北安国药市	MG545299
ZMM006	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	安徽亳州药市	MG545300
ZMM007	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	安徽亳州药市	MG545301
ZMM008	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	广西玉林药市	MG545302
ZMM009	<i>A. asphodeloides</i>	生药材	根茎	广西玉林药市	MG545303
DLP01	<i>Chlorophytum comosum</i>	基原植物	叶片	药用植物研究所	MG745399
DLP02	<i>C. comosum</i>	基原植物	叶片	药用植物研究所	MG745340
DLP03	<i>C. comosum</i>	基原植物	叶片	药用植物研究所	MG745341

表 2 待检测种子样品的采集信息和 *psbA-trnH* 序列登录号

Table 2 Specimen information and *psbA-trnH* accessions of seed samples pending to be test

样品编号	采集地	登录号	样品编号	采集地	登录号
ZMS001	安徽亳州市	MG545327, MG545328, MG545329	ZMS130	河北省安国市石佛镇	MG545413, MG545414, MG545415
ZMS105	河北省安国市石佛镇	MG545330, MG545331, MG545332	ZMS131	河北省安国市石佛镇	MG545416, MG545417, MG545418
ZMS106	河北省易县西陵镇	MG545333, MG545334, MG545335	ZMS132	河北省安国市石佛镇	MG545419, MG545420, MG545421
ZMS107	河北省隆化县蓝旗镇	MG545336, MG545337, MG545338	ZMS133	河北省平泉县平泉镇	MG545422, MG545423, MG545424
ZMS108	河北省安国市明官店乡	MG545339, MG545340, MG545341	ZMS134	河北省平泉县平泉镇	MG545425, MG545426, MG545427
ZMS109	河北省易县西陵镇	MG545342, MG545343, MG545344	ZMS135	河北省易县坡仓乡	MG545428, MG545429, MG545430
ZMS110	河北省安国市明官店乡	MG545345, MG545346, MG545347	ZMS136	河北省安国市伍仁桥镇	MG545431, MG545432, MG545433
ZMS111	河北省易县西陵镇	MG545348, MG545349, MG545350	ZMS137	河北省平泉县平泉镇	MG545434, MG545435, MG545436
ZMS112	河北省易县西陵镇	MG545351, MG545352, MG545353	ZMS138	河北安国药市	MG545437, MG545438, MG545439
ZMS113	河北省易县坡仓乡	MG545357, MG545358, MG545359	ZMS139	河北安国药市	MG545440, MG545441, MG545442
ZMS114	河北安国药市	MG545363, MG545364, MG545365	ZMS140	河北省易县塘湖镇	MG545443, MG545444, MG545445
ZMS115	河北安国药市	MG545366, MG545367, MG545368	ZMS141	河北安国药市	MG545446, MG545447, MG545448
ZMS116	河北安国药市	MG545371, MG545372, MG545373	ZMS142	河北省易县塘湖镇	MG545449, MG545450, MG545451
ZMS117	河北安国药市	MG545374, MG545375, MG545376	ZMS143	河北省易县塘湖镇	MG545452, MG545453, MG545454
ZMS118	河北安国药市	MG545377, MG545378, MG545379	ZMS144	山东省邹城市太平镇	MG545455, MG545456, MG545457
ZMS119	河北安国药市	MG545380, MG545381, MG545382	ZMS145	河北省安国市明官店乡	MG545458, MG545459, MG545460
ZMS120	河北省易县塘湖镇	MG545383, MG545384, MG545385	ZMS146	河北安国药市	MG545461, MG545462, MG545463
ZMS121	河北省隆化县蓝旗镇	MG545386, MG545387, MG545388	ZMS147	河北省安国市伍仁桥镇	MG545464, MG545465, MG545466
ZMS122	河北省隆化县蓝旗镇	MG545389, MG545390, MG545391	ZMS148	河北省安国市伍仁桥镇	MG545467, MG545468, MG545469
ZMS123	河北省易县坡仓乡	MG545392, MG545393, MG545394	ZMS149	河北省易县坡仓乡	MG545470, MG545471, MG545472
ZMS124	河北省隆化县蓝旗镇	MG545395, MG545396, MG545397	ZMS150	河北安国药市	MG545473, MG545474, MG545475
ZMS125	河北安国药市	MG545398, MG545399, MG545400	ZMS151	河北省易县坡仓乡	MG545476, MG545477, MG545478
ZMS126	河北省易县坡仓乡	MG545401, MG545402, MG545403	ZMS152	河北省易县坡仓乡	MG545479, MG545480, MG545481
ZMS127	河北省平泉县平泉镇	MG545404, MG545405, MG545406	ZMS153	河北安国药市	MG545482, MG545483, MG545484
ZMS128	河北安国药市	MG545407, MG545408, MG545409	ZMS154	河北安国药市	MG545485, MG545486, MG545487
ZMS129	河北安国药市	MG545410, MG545411, MG545412			

2 方法

2.1 DNA 提取, PCR 扩增, 电泳检测和序列测定

叶片样品用硅胶快速干燥后称取约 20 mg, 生药材样品用酒精擦拭药材表面, 刮去外表皮, 取药材约 45 mg, 加入样品量 10% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)-40, 种子样品取单粒种子。所有类型样品均使用球磨机研磨 2 min (30 次/s), 充分研磨后使用植物基因组 DNA 提取试剂盒完成 DNA 提取, 操作步骤依试剂盒说明书并调整水浴条件为 56 °C 过夜。DNA 质量经检验合格后使用 PCR 仪进行序列扩增。核糖体 DNA 第 2 内部转录间隔区 (ITS2) 和 *psbA-trnH* 序列的扩增引物、反应体系和扩增条件参照中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则^[11]。PCR 产物经纯化后, 使用测序仪进行双向测序。PCR 直接测序失

败的, 采用克隆方法测序。

2.2 序列注释、遗传距离计算、邻接 (neighbor-joining, NJ) 树构建和 BLAST 分析

测序峰图利用 CodonCode Aligner V7.0.1 去除低质量区域和校对拼接。ITS2 和 *psbA-trnH* 序列注释使用 HMMER v3.1 软件^[17]。多序列比对使用 Muscle 3.8 软件^[18]。种内、种间遗传距离计算使用 PUAP 4.0 软件^[19]。NJ 树构建使用 MEGA 7.0 软件^[20], 距离模型采用 Kimura 双参数模型 (K-2P), 置信度计算采用 1 000 次 Bootstrap 检测。物种鉴定采用 BLAST 法、遗传距离法和 NJ 系统发育树法^[21]。

3 结果

3.1 DNA 提取, PCR 扩增和双向测序

DNA 提取结果表明硅胶干燥叶片、生药材和种子样品 (单粒)

均可获得较理想的 DNA, DNA 质量浓度均 > 50 mg·L⁻¹, 不同波长处的吸光度 A 比例 (A_{260 nm}/A_{280 nm}) 处于 1.6 ~ 2.1, DNA 质量可以满足后续 PCR 要求。使用 ITS2 序列和 *psbA-trnH* 序列通用引物, 所有样品均可成功进行 PCR 扩增。测序结果表明所有样品的 *psbA-trnH* 序列均可获得较高质量的双向测序结果。部分叶片和生药材样品可获得 ITS2 序列双向测序结果, 但种子样品均无法获得高质量的 ITS2 序列双向测序结果, 存在较严重的同源序列干扰。对 6 份种子样品进行克隆测序分析, 表明知母种子的 ITS2 序列在基因组内存在较为严重异质化, 存在一段长度为 13 bp 的插入/缺失区域, 见图 1。由于知母种子样品无法获得稳定的 ITS2 序列测序结果, 故后续采用 *psbA-trnH* 序列对知母种子进行基原物种鉴定分析。

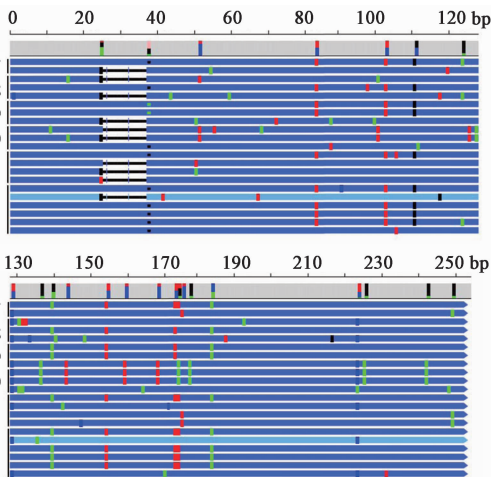


图 1 知母种子 ITS2 序列的基因组内异质性分析
Fig.1 Intra-genomic heterogeneity analysis for ITS2 sequences of *Anemarrhena Rhizoma* seeds

3.2 知母 *psbA-trnH* 参考序列的确定及其序列特征分析 共获得知母 *psbA-trnH* 序列 39 条, 来自基原植物和生药材样品, 分为 6 个单倍型 H1 ~ H6, 比对后长度 581 bp, 有 3 个变异位点, 分别是 108 位点 C-A 变异, 154 位点 T-A 变异, 214 位点 A-G 变异; 有 2 处插入/缺失, 分别为 85 ~ 91 位点 TCCCTTT, 124 ~ 128 位点 TAAGT, 均为串联重复序列单元数目差异的变异; 有 3 个长度 > 7 bp 的多聚胸腺嘧啶 (PolyT) 结构, 为 144 ~ 153 位点, 419 ~ 427 位点和 455 ~ 465 位点的 PolyT 结构, Poly 结构碱基的数目采用克隆测序方法进行验证, 共获得 17 条克隆序列, 见图 2。知母种内变异平均值 0.001 8 ± 0.001 5, 种内变异最大值 0.003 5; 种间变异平均值 0.101 3 ± 0.002 3, 种间变异最小值 0.1。在 NJ 系统发育树上, 知母

均为独立的支, Bootstrap 支持率 100%, 见图 3。

ZMP001-C01	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP001-C03	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGA-T TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP001-C04	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP001-C05	ATTTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP002-C01	A-TTTTTTTT TTTAATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP002-C03	A-TTTTTTTT TTTAATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP002-C04	A-TTTTTTTT TTTAATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP002-C05	A-TTTTTTTT TTTAATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP003-C01	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP003-C02	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP003-C03	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP003-C04	A-TTTTTTTT TTTAATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP003-C05	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP004-C01	ATTTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP004-C02	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP004-C03	A-TTTTTTTT TTTAATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
ZMP004-C05	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGA-T TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT
	PolyT region I	PolyT region II	PolyT region III
	A-TTTTTTTT TTT-ATTCCA	CAAAAGGATT TTTTTTTAGT	CTCC-TTTTTT TTTTTTACAT

图 2 基于克隆测序方法验证知母 *psbA-trnH* 序列的 PolyT 结构碱基数目
Fig.2 Validation of PloyT structures for *psbA-trnH* sequences of *Anemarrhena Rhizoma* by cloning and sequencing method

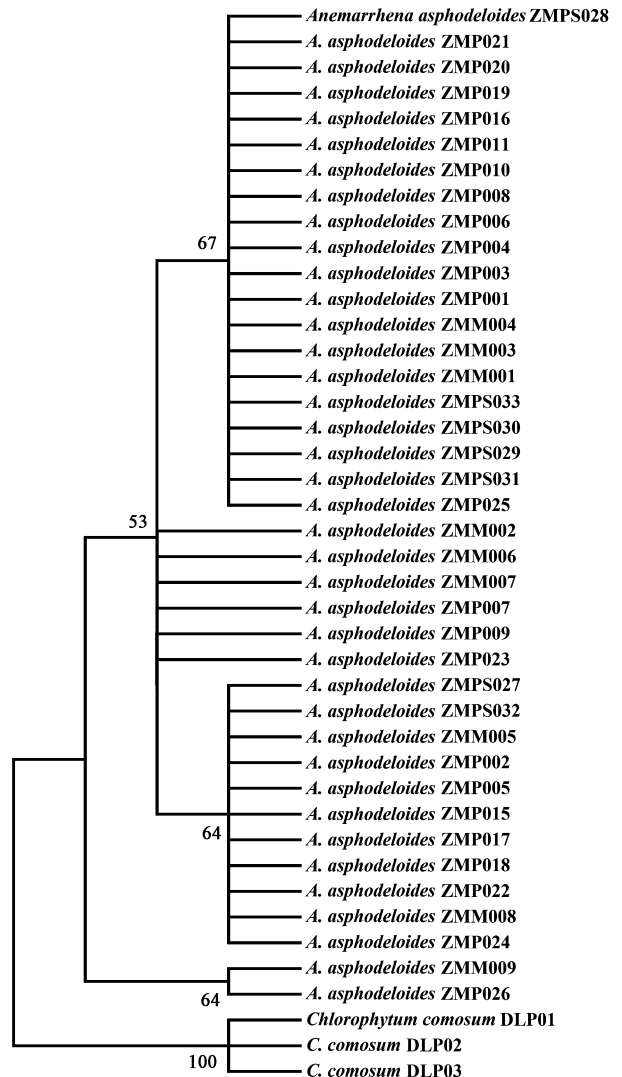


图 3 以吊兰为外类群构建的知母 *psbA-trnH* 序列 NJ 系统发育树
Fig.3 NJ phylogenetic tree of *Anemarrhena Rhizoma* using *psbA-trnH* sequences with *Chlorophytum comosum* as outer group

3.3 基于 *psbA-trnH* 序列的待检测种子基原物种鉴定 共收集待检测知母种子样品 51 份,每份样品挑取 3 粒种子分别进行 *psbA-trnH* 条形码序列获取,共获得 153 条 *psbA-trnH* 序列。将获得的知母 *psbA-trnH* 参考序列提交到中药材 DNA 条形码鉴定系统 (www.tcmbarcode.cn),完成待检测种子的 BLAST 鉴定分析,结果表明待检测种子的 153 条 *psbA-trnH* 序列的最相似物种均为知母 *A. asphodeloides*,见图 4 (A);将待检测种子的 153 条 *psbA-trnH* 序列分别与

知母 *psbA-trnH* 参考序列进行遗传距离计算,结果表明所有序列的遗传距离最小值均为 0,小于知母 *psbA-trnH* 参考序列的种内变异最大值 0.003 5,表明待检测种子的基原物种均为知母 *A. asphodeloides*,见图 4(B)。将待检测种子的 153 条 *psbA-trnH* 序列逐一与知母的 *psbA-trnH* 参考序列进行 NJ 系统发育树构建,结果表明所有序列均和知母的 *psbA-trnH* 参考序列聚为共同的支,表明待检测种子的基原物种均为知母 *A. asphodeloides*,见图 4(C)。

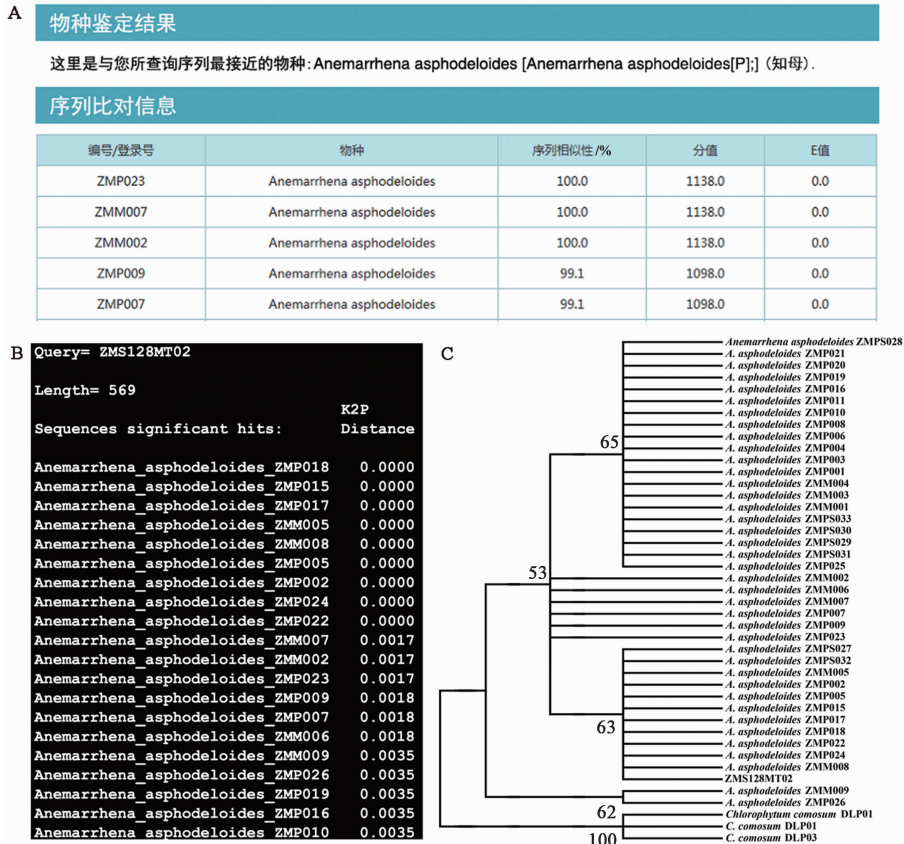


图 4 基于 BLAST 法 (A), 遗传距离法 (B) 和 NJ 系统发育树法 (C) 的待检测知母种子基原鉴定 [以 ZMS128 样品的第 2 次抽样 (ZMS128MT02) 为例]

Fig. 4 Taxonomic assignment of *Anemarrhena* Rhizoma seeds by BLAST method (A), genetic distance method (B) and NJ phylogenetic tree method (C) [Taking second sampling specimen of ZMS128 (ZMS128MT02) as an example]

4 讨论

随着中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则纳入 2015 年版《中国药典》^[22], 中药材 DNA 条形码分子鉴定法的研究已经深入到中药材生产的源头, 即中药材种子种苗的鉴定研究^[12]。与基原物种和中药材鉴定相比, 药用植物种子 DNA 条形码的鉴定研究具有以下特点: ①种子鉴定研究基础薄弱。种子是所有种子植物特有的繁殖器官, 是由胚珠经传粉受精形成。种子的结构包括胚、胚乳和种皮 3 个部分。传统植物分类学主要依照植物的根、茎、叶、

花、果等形态特征进行物种鉴定, 传统中药鉴定学中的性状鉴定和显微鉴定的主要研究对象是生药材和饮片, 当前尚缺乏系统的植物种子形态特征分类研究。②起始质量普遍较小。除少数种子外, 用于药用植物种植生产的种子个体普遍较小, 单粒种子的质量很难达到 DNA 提取的起始质量要求 (基原植物通常为 20 ~ 30 mg, 生药材一般为 30 ~ 50 mg)。以本研究的知母种子为例, 种子长 7.5 ~ 12.0 mm, 宽 2.1 ~ 4.2 mm。千粒质量 7.5 ~ 8.1 g, 单粒知母种子质量仅 7.5 ~ 8.1 mg^[9]。③遗传背景更加复

杂。药用植物种子来源复杂,生产中常包含不同分布区的野生种子,不同产地的繁育留种,以及从实生选种、芽变选种和杂交育种途径获得的新种质资源,这些种子经种植后会形成更加复杂遗传背景的种子。④实验工作量加大。参考《农作物种子检验规程·真实性和品种纯度鉴定》^[8],种子的真实性检验需要设置重复,种子检验的工作量将会显著增加,对实验室的自动化水平将会提出新的要求。

根据中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则^[11],中药材 DNA 条形码分子鉴定通常是以核基因组 ITS2 为主体条形码序列,以叶绿体 *psbA-trnH* 为辅助序列。相较于中药材,*psbA-trnH* 在中药材种子 DNA 条形码鉴定研究具有更重要的地位。药用植物通常为异花传粉植物,异花传粉植物的种子常由不同植株的雄配子(精子)和雌配子(卵细胞)受精后发育而成,种子的核基因组是包含 2 套遗传信息的杂合基因组,核基因组重组给 ITS2 序列的测序带来了潜在的影响。在本研究中,知母种子样品均无法获得高质量的 ITS2 测序结果,克隆测序结果表明知母种子的基因组内存在较高的异质性 ITS2 序列拷贝。*psbA-trnH* 片段是进化速率最快的叶绿体间隔区^[23],基于两侧 *psbA* 序列和 *trnH* 序列设计的通用引物具有较高的 PCR 扩增成功率。相较于植物的核基因组序列,植物的 *psbA-trnH* 序列来自于卵细胞的前质体基因组,具有单亲遗传的特性。在本研究中,所有的知母种子样品均可成功获得 *psbA-trnH* 序列,弥补了知母种子 ITS2 序列获取失败对 DNA 条形码鉴定的影响,表明 *psbA-trnH* 序列在中药材种子 DNA 条形码鉴定研究中具有重要意义。

[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,2015:212-213.
[2] 王颖异,郭宝林,张立军. 知母化学成分的药理研究进展[J]. 科技导报,2010,28(12):110-115.
[3] 吉星,冯毅凡. 知母中皂苷类成分研究进展[J]. 中草药,2010,41(4):680-683.
[4] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 14 卷[M]. 北京:科学出版社,1980:40.
[5] 肖培根. 新编中药志. 第 1 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2001:596-601.
[6] 王强,徐国钧. 地道药材图典[M]. 福州:福建科学技术出版社,2003:91-92.
[7] 魏建和,陈士林,程惠珍,等. 中药材种子种苗标准化工程[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2005,7(6):104-108.

[8] GB/T 3543. 5-1995. 农作物种子检验规程·真实性和品种纯度鉴定[S]. 北京:中国标准出版社,1995:74-81.
[9] 郭巧生,王庆亚,刘丽. 中国药用植物种子原色图鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2009:412.
[10] 陈瑛. 实用中药种子技术手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1999.
[11] 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.
[12] 刘金欣,潘敏,张改霞,等. 基于 ITS2 序列的中药材桔梗种子 DNA 条形码鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2016,18(2):174-178.
[13] 张改霞,金钺,贾静,等. 药用植物羌活种子 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):390-395.
[14] 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.
[15] 刘金欣,魏妙洁,李耿,等. 黄芩 ITS2 条形码数据库构建及其种子的 DNA 条形码鉴定方法建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(9):34-42.
[16] 张娜娜,辛天怡,金钺,等. 基于中药材 DNA 条形码系统的泽泻种子鉴别研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2016,18(1):18-23.
[17] Wheeler T J, Eddy S R. nhmmer;DNA homology search with profile HMMs[J]. Bioinformatics, 2013, 29(19):2487-2498.
[18] Edgar R C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity[J]. BMC Bioinformatics, 2004, doi: 10.1186/1471-2105-5-113.
[19] Swofford D L. PAUP *. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods) [M]. version 4. Massachusetts; Sinauer Associates, 2002:27-30.
[20] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7):1870-1874.
[21] Ross H A, Murugan S, Li W L. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation[J]. Syst Biol, 2008, 57(2):216-230.
[22] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:382-385.
[23] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region[J]. PLoS One, 2007, 2(6):e508.

[责任编辑 刘德文]