

# 白及与其混伪品 ITS2 序列二级结构比较与鉴别

陈美君, 李峰庆, 吕蒙, 刘珈羽, 陈鸿平, 刘友平\*  
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

**[摘要]** **目的:**利用 DNA 条形码技术通过 ITS2 序列对白及及其混伪品进行快速、准确鉴别。**方法:**采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取白及及其混伪品基因组 DNA,对全部收集样品的 ITS2 序列进行 PCR 扩增和测序,所得序列经 Codon Code Aligner 拼接后,利用 MEGA7.0 软件进行数据分析计算物种间种内 Kimura2-parameter(K2P)遗传距离。采用最近距离法及基于 ITS2 序列构建 Neighbor-joining(NJ)系统聚类树,结合 ITS2 序列二级结构相对比的方法鉴别分析。**结果:**K2P 遗传距离及 NJ 聚类树均显示只能鉴别出白及属与其他科属物种,区分不开白及属内 3 个物种,结合 ITS2 二级结构进一步鉴定,可将白及属的各个种及其他科属混伪品准确地鉴别出来。**结论:**利用 ITS2 序列作为 DNA 条形码,结合 ITS2 序列的二级结构可以有效地鉴定白及及其混伪品。

**[关键词]** 白及; 混伪品; DNA 条形码; ITS2; 二级结构

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0046-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150046

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0915.028.html>

**[网络出版时间]** 2017-05-11 9:15

## Comparison and Identification of Secondary Structure of ITS2 Sequence in Bletillae Rhizoma and Its Counterfeits

CHEN Mei-jun, LI Feng-qing, LYU Meng, LIU Jia-yu, CHEN Hong-ping, LIU You-ping\*  
(Chengdu University of Chinese Medicine College Pharmacy, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To fast and accurately identify ITS2 sequences of Bletillae Rhizoma and its counterfeits using DNA barcode technology. **Method:** The genomic DNA was extracted by plant genomic DNA extraction kit, and the ITS2 sequences of all collected samples were amplified and measured. The sequences were spliced by Codon Code Aligner and analyzed by MEGA7.0 software to calculate interspecies Kimura2-parameter (K2P) genetic distance. The neighbor-joining (NJ) system clustering tree was constructed by using the nearest distance method and ITS2 sequences, and the method was compared with the ITS2 sequences. **Result:** K2P genetic distance and NJ clustering tree only identified Bletillae Rhizoma from other species, but failed to distinguish Bletillae Rhizoma and the other three in the genus. The secondary structure of ITS2 could be used to further accurately identify Bletillae Rhizoma and other species. **Conclusion:** ITS2 sequences can be used as DNA barcode, and combined with the secondary structure of ITS2 sequence to effectively identify Bletillae Rhizoma and its counterfeits.

**[Key words]** Bletillae Rhizoma; counterfeit; DNA barcode; ITS2; secondary structure

**[收稿日期]** 20170313(007)

**[基金项目]** 四川省科技厅科技支撑计划项目(2016SZ0038);成都市科技局科技项目(2014-HM01-00407-SF)

**[第一作者]** 陈美君,在读硕士,从事中药化学成分与质量标准化研究,Tel:15308091445,E-mail:275474711@qq.com

**[通讯作者]** \*刘友平,博士,研究员,从事中药化学成分与质量标准化研究,Tel:028-61800103,E-mail:liuyouping00@163.com

中药白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* 的干燥块茎。具有收敛止血,消肿生肌之功效。用于咯血,吐血,外伤出血,疮疡肿毒,皮肤皲裂<sup>[1]</sup>。主产于贵州、四川、云南、安徽、浙江、甘肃及长江以南地区。近年来随着白及的应用范围不断扩大,用量不断增加,而白及资源遭自然及人为因素破坏,野生白及资源濒临枯竭,造成市面上供不应求,受白及植株繁殖困难影响,人工栽培白及也未能改善这一现状,导致白及价格居高不下,市面上充斥大量混伪品<sup>[2]</sup>。历版《中国药典》中白及药材基源均记载为兰科植物白及 *B. striata* 的干燥块茎,而黄花白及 *B. ochracea*,小白及 *B. formosana* 记载于四川、甘肃<sup>[3-4]</sup>等地方标准中作为地方习用品使用,二者皆为白及同属植物,药材外观性状相似度较高,常混做白及使用;独蒜兰 *Pleione bulbocodioides*,苞舌兰 *Spathoglottis pubescens*,竹叶兰 *Arundina graminifolia* 等为白及同科植物,其植物的干燥根茎与白及药材外形较相似,故也经常混入白及药材中使用。因大量混品与伪品混入,使白及药材的有效性 & 安全性无法控制。为了全面控制和提升白及药材质量,有必要对白及及其混伪品的鉴别进行深入研究。

传统的中药鉴定方法主要有性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定等,这些方法简便、直接,但主观性强,其准确性取决于鉴定者的经验。DNA 条形码是利用基因组中一段公认的标准短序列来进行物种鉴定的分子诊断新技术,不受样品的形态性状以及研究者的专业水平限制,避免了主观人为的判断和客观条件的影响,具有操作简单,重复性高等特点而尤其适合药用植物鉴定<sup>[5]</sup>。2010 年,陈士林等<sup>[6]</sup>对 6 000 余份药用植物样本进行 DNA 条形码

序列筛选,首次提出以 ITS2 为核心, *psbA-trnH* 为补充序列的药用植物条形码鉴定体系。ITS2 序列的鉴别能力已在多种药用植物和药材的鉴定中得到了验证和应用。同时 ITS2 序列能够形成特定的茎环二级结构,从而具有鉴别物种的分子形态特征的能力。

目前白及鉴定研究主要有性状、显微及理化<sup>[7-8]</sup>等方法,但采用这些传统鉴定方法很难区分市场上白及及其混伪品。有学者利用 ISSR<sup>[8-11]</sup>, SRAP<sup>[12]</sup> 分子标记技术分析白及种质资源的遗传多样性;也有对以 nr DNA ITS, *LFY* 同源基因内含子 2, 叶绿体 *ycf1* 基因序列对白及属植物及其混伪品进行鉴定能力比较,结果发现核基因 nr DNA ITS 序列以及叶绿体基因 *ycf1* 序列的鉴定效率均为 100%, 推荐以 nr DNA ITS 序列主、叶绿体 *ycf1* 序列为辅作为鉴定白及属的 DNA 条形码<sup>[13]</sup>。陈黎等<sup>[14]</sup>采用 ITS2 序列对白及及其混伪品进行鉴别,但所鉴定的样品中只有同科或其他科混伪品,未涉及到白及亲缘性较近的同属其他 3 个种植物。本研究利用 DNA 条形码,首次对白及属内 3 个种及其混伪品进行了比较研究,旨在为该药材的质量控制、临床安全用药及合理开发利用提供分子依据。

### 1 材料

本研究所用样品从四川、贵州等地的药材市场收集以及从农户自种、小型私人中药材种苗公司采集,共 40 批样品,具体信息见表 1。样品经成都中医药大学药学院生药学专业严铸云教授通过外观形状无法准确鉴定,且显微、理化等鉴定方法均不能准确鉴定,故采用 ITS2 序列应用 DNA 条形码技术进行准确鉴定。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

品种名	样品编号	拉丁名	Genbank 号	样品来源	收集时间
白及	<i>B. striata</i> KJ405411	<i>Bletilla striata</i>	KJ405411	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> KJ405414	<i>B. striata</i>	KJ405414	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> kJ405417	<i>B. striata</i>	kJ405417	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> kJ405418	<i>B. striata</i>	kJ405418	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> kp751383	<i>B. striata</i>	kp751383	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> kp751384	<i>B. striata</i>	kp751384	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> kp751385	<i>B. striata</i>	kp751385	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> kp751386	<i>B. striata</i>	kp751386	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> KJ405412	<i>B. striata</i>	KJ405412	Genbank	-
白及	<i>B. striata</i> KJ405410	<i>B. striata</i>	KJ405410	Genbank	-
白及	CD4	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2010-03-15

续表 1

品种名	样品编号	拉丁名	Genbank 号	样品来源	收集时间
白及	CD6	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-03-15
白及	CD7	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-03-15
白及	CD10	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-03-15
白及	CD11	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-06-28
白及	CD12	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-06-28
白及	CD13	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-06-28
白及	CD16	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-06-28
白及	CD18	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-06-28
白及	CD19	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-03-05
白及	CD20	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-07-05
白及	CD21	<i>B. striata</i>	-	成都荷花池	2016-07-05
白及	GY	<i>B. striata</i>	-	四川广元	2016-11-19
白及	GZ-2	<i>B. striata</i>	-	贵阳贵钢	2016-06-28
白及	GZ-4	<i>B. striata</i>	-	贵阳贵钢	2016-06-28
白及	GZ-5	<i>B. striata</i>	-	贵阳贵钢	2016-04-23
白及	GZ-7	<i>B. striata</i>	-	贵州六盘水	2016-07-05
白及	GZ-8	<i>B. striata</i>	-	贵州六盘水	2016-11-19
黄花白及	<i>B. ochracea</i> KP751394	<i>B. ochracea</i>	KP751394	Genbank	-
黄花白及	<i>B. ochracea</i> KP751389	<i>B. ochracea</i>	KP751389	Genbank	-
黄花白及	<i>B. ochracea</i> KP751392	<i>B. ochracea</i>	KP751392	Genbank	-
黄花白及	<i>B. ochracea</i> KP751393	<i>B. ochracea</i>	KP751393	Genbank	-
黄花白及	<i>B. ochracea</i> KP751395	<i>B. ochracea</i>	KP751395	Genbank	-
黄花白及	CD1	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-03-15
黄花白及	CD2	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-03-15
黄花白及	CD3	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-06-28
黄花白及	CD5	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-06-28
黄花白及	CD8	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-06-28
黄花白及	CD9	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-07-05
黄花白及	CD14	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-05-04
黄花白及	CD15	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-05-04
黄花白及	CD17	<i>B. ochracea</i>	-	成都荷花池	2016-05-05
黄花白及	GZ-3	<i>B. ochracea</i>	-	贵阳贵钢	2016-05-05
黄花白及	GZ-9	<i>B. ochracea</i>	-	贵州六盘水	2016-05-07
黄花白及	DJY1	<i>B. ochracea</i>	-	四川都江堰	2016-05-07
黄花白及	DJY2	<i>B. ochracea</i>	-	四川都江堰	2016-05-07
黄花白及	GY01	<i>B. ochracea</i>	-	四川广元	2016-01-29
黄花白及	JN01	<i>B. ochracea</i>	-	四川成都	2016-03-30
黄花白及	LQY01	<i>B. ochracea</i>	-	四川成都	2016-03-15
黄花白及	SM01	<i>B. ochracea</i>	-	四川阿坝	2016-03-15
黄花白及	XD02	<i>B. ochracea</i>	-	四川绵阳	2016-03-15
黄花白及	XD03	<i>B. ochracea</i>	-	四川绵阳	2016-03-15
小白及	<i>B. formosana</i> KP751398	<i>B. formosana</i>	KP751398	Genbank	-
小白及	<i>B. formosana</i> KP751396	<i>B. formosana</i>	KP751396	Genbank	-

续表 1

品种名	样品编号	拉丁名	Genbank 号	样品来源	收集时间
小白及	<i>B. formosana</i> kP751397	<i>B. formosana</i>	kP751397	Genbank	-
小白及	<i>B. formosana</i> KP751399	<i>B. formosana</i>	KP751399	Genbank	-
小白及	<i>B. formosana</i> KP751400	<i>B. formosana</i>	KP751400	Genbank	-
小白及	GZ-6	<i>B. formosana</i>	-	贵州六盘水	2016-07-05
小白及	PZ1	<i>B. formosana</i>	-	四川彭州	2016-05-04
小白及	XD01	<i>B. formosana</i>	-	四川绵阳	2016-03-30
华白及	<i>B. sinensis</i> KP751402	<i>B. sinensis</i>	KP751402	Genbank	-
华白及	<i>B. sinensis</i> KP751401	<i>B. sinensis</i>	KP751401	Genbank	-
竹叶兰	<i>A. graminifolia</i> AF461461	<i>A. graminifolia</i>	AF461461	Genbank	-
竹叶兰	<i>A. graminifolia</i> JN114438	<i>A. graminifolia</i>	JN114438	Genbank	-
竹叶兰	<i>A. graminifolia</i> JN114439	<i>A. graminifolia</i>	JN114439	Genbank	-
独蒜兰	<i>P. bulbocodioides</i> KJ405404	<i>P. bulbocodioides</i>	KJ405404	Genbank	-
独蒜兰	<i>P. bulbocodioides</i> KJ405406	<i>P. bulbocodioides</i>	KJ405406	Genbank	-
独蒜兰	<i>P. bulbocodioides</i> KM092328	<i>P. bulbocodioides</i>	KM092328	Genbank	-
独蒜兰	<i>P. bulbocodioides</i> KJ405405	<i>P. bulbocodioides</i>	KJ405405	Genbank	-
独蒜兰	<i>P. bulbocodioides</i> KM092329	<i>P. bulbocodioides</i>	KM092329	Genbank	-
舌苞兰	<i>S. pubescens</i> KM025162	<i>S. pubescens</i>	KM025162	Genbank	-
舌苞兰	<i>S. pubescens</i> KP751403	<i>S. pubescens</i>	KP751403	Genbank	-
舌苞兰	<i>S. pubescens</i> KP751404	<i>S. pubescens</i>	KP751404	Genbank	-

Retsch MM400 型球磨仪(德国莱驰公司);T100 型聚合酶链式反应(PCR)仪, GelDox XR 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);JY-300C 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);BI3730XL 型测序仪(美国 Applied Bio-systems 公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒(通用型), I-5™ 2 × High-Fidelity Master Mix, 6 × Loading buffur, DL2000DNA Maker 引物均为北京擎科新业生物技术有限公司生产与合成;ddH<sub>2</sub>O(天根生物技术有限公司);异丙醇为分析纯。

## 2 方法

**2.1 样品 DNA 的提取** 取药材适量,75%乙醇进行表面消毒后,用刀片刮取内部药材约 20 mg,加液氮冷冻,用球磨仪加入一粒小钢珠研磨 40 s(50 Hz·s<sup>-1</sup>)后,采用改良植物 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA,DNA 沉淀剂改为 -20 °C 冷冻异丙醇<sup>[15]</sup>,其他步骤均按试剂盒提取方法。

**2.2 PCR 扩增及测序** 扩增、测序引物一致,正向引物 ITS2F:5'-ATGCGATACTTGCTGTGAAT-3';反向引物 ITS3R:5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'(21 bp)。PCR 扩增体系为 25 μL,体系包括酶 12.5 μL,正向引物和反向引物各 1 μL,DNA 模板

0.5 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。扩增程序:98 °C,变性 2 min;98 °C,变性 10 s;65 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 20 s;10 个循环,每个循环退火温度降 1 °C,至 55 °C;98 °C 变性 10 s;55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s;72 °C 延伸 3 min。PCR 扩增产物的测序工作由成都擎科生物技术有限公司进行单向测序。

**2.3 数据处理方法** 测序所得的峰图采用 Codon Code Aligner V5.0 软件(Codon Code Co.,USA)对序列峰图进行校对拼接,去除引物区和低质量的序列,获得 ITS2 序列。利用 MEGA7 计算物种内种间 Kimura 2-parameter(K2P)遗传距离,构建邻接(Neighbor-joining,NJ)系统发育树,利用 Bootstrap(BS)(1 000 次重复)检验各分支的支持率。采用软件 RNA Structure 获得 ITS2 序列二级结构。

## 3 结果与分析

**3.1 白及其混伪品 ITS2 序列种内种间比较** 白及种内不同来源的 ITS2 序列比对后,长度为 259 bp,种内变异位点有 20 个,信息位点包含 17 个。白及种内最大 K2P 距离为 0.057,种内平均 K2P 距离为 0.022;黄花白及种内不同来源的 ITS2 序列比对后,长度为 259 bp,种内变异位点有 2 个,信息位点包含 2 个;小白及种内不同来源的 ITS2 序列比对



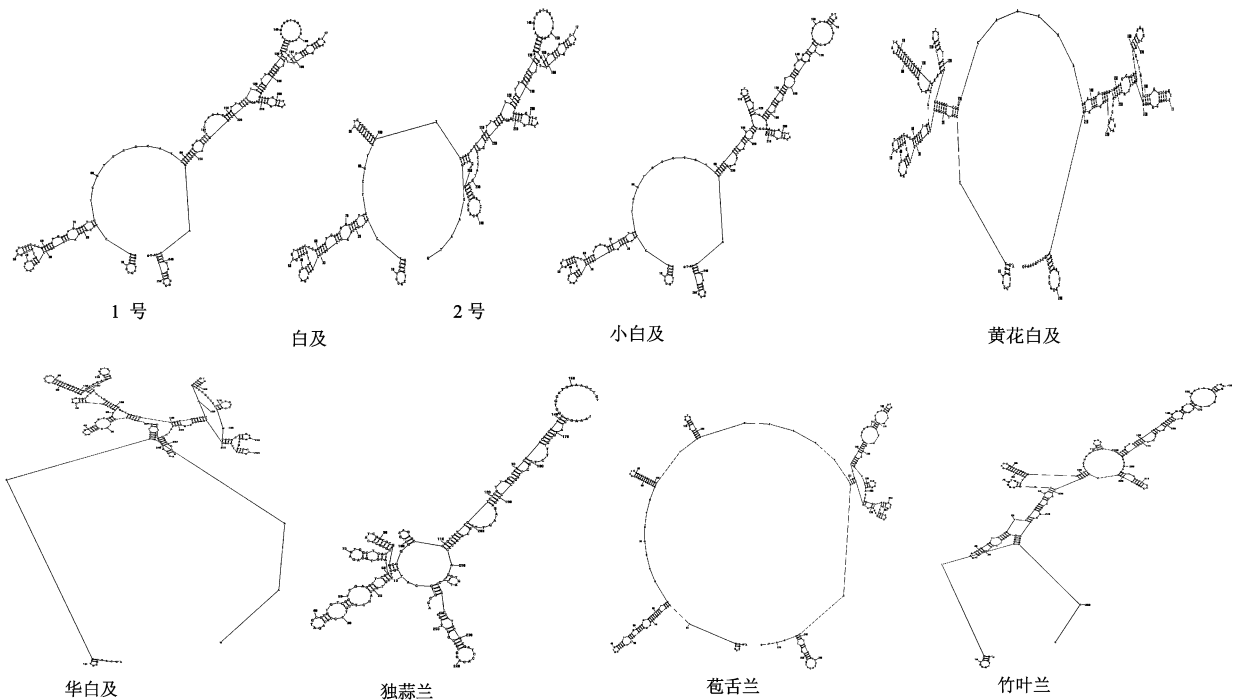


图 2 白及其混伪品的 ITS2 二级结构比较

Fig. 2 Comparison on ITS2 secondary structure between *Bletillae Rhizoma* and its adulterants counterfeits

#### 4 结论与讨论

本研究收集了白及正品以及混伪品共 40 个样,又从 GenBank 上下载了这些物种的相关序列 33 条,利用目前被广泛认可的 DNA 条形码 ITS2 序列片段,对白及其混伪品进行鉴别,白及的 ITS2 条形码序列长度为 259 bp,白及与小白及、黄花白及之间的亲缘关系较近,二者种间距离均在白及种内距离范围内,而与华白及、竹叶兰、舌苞兰、独蒜兰之间的最小种间距离均大于白及种内最大距离,表明单从遗传距离来看只能鉴别出白及属与其他科属物种,区分不开白及属内 3 个物种;在基于邻接法构建的系统聚类树中,除华白及外,白及属其他 3 种表现出了单系性,而同时又与其他科属混伪品明显区分开,鉴别结果与遗传距离结果一致;结合 ITS2 二级结构进一步鉴定,可将白及属的各个种及其他科属混伪品准确地鉴别出来。因此,利用 ITS2 序列作为 DNA 条形码,结合 ITS2 序列的二级结构可以有效地鉴定白及其混伪品。

白及属植物共 6 个种,在我国主要分布白及、黄花白及、小白及与华白及 4 个种,均作为药材使用,其中白及、黄花白及、小白及 3 个种植物因生长环境条件、地理因素较相似,亲缘性较高,使药材鉴定较困难。现有报道陈黎等<sup>[14]</sup>以 ITS2 对白及其混伪品进行 DNA 条形码鉴别,但其只能准确鉴定白及属与其他科属之间,而白及属内 4 个物种之间的鉴定

未涉及,且未进行二级结构研究比较;陈士林等<sup>[16]</sup>曾采用 ITS2 序列对白及其混伪品、近缘种植物小白及、杜鹃兰、独蒜兰、云南独蒜兰进行鉴定研究,通过对种间序列变异,ITS2 序列 NJ 树及 ITS2 二级结构分析可知,采用 ITS2 序列能对白及进行准确鉴定,但其样品量较少,白及样品只有 3 个,小白及样品只有 1 条,而杜鹃兰、独蒜兰、云南独蒜兰等样品均只有 1~3 个。本研究样品量大,在对混伪品的鉴别中重点对白及近缘种同属其他 3 个品种进行鉴定,结果 ITS2 序列能准确鉴定 4 种,结果与陈等相一致。

本研究所用样品收集或采集于四川、贵州、云南 3 省的药材市场、小型中药种苗公司或农户自种,结合聚类分析与二级结构对试验所用样品进行鉴别,结果所收集的样品为白及、黄花白及、小白及 3 个种,其他科属的混伪品未收集到,表明目前市场上白及的混伪品主要来自于同属的黄花白及、小白及,而来自其他科属(如百合科知母、黄精、玉竹,兰科独蒜兰、山慈菇,鸢尾科射干等)的白及传统混伪品未见。白及属华白及在聚类分析、二级结构及种间距离分析等都与同属的白及、黄花白及、小白及差异较大,猜想这与华白及生长范围小,资源濒临灭绝,进化程度不一致等有关。

#### [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,2015:103.
- [ 2 ] 汪庆平,张东华. 颇具开发价值的白及资源[J]. 资源开发与市场,2000,16(4): 216.
- [ 3 ] 甘肃省食品药品监督管理局. 甘肃中药材标准(2008版)[M]. 兰州:甘肃文化出版社,2008:12.
- [ 4 ] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准(2010版)[M]. 成都:四川科学技术出版社,2011:583.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] 黄群莲,熊军,王玲,等. 白及与伪品白及的鉴别[J]. 中国药业,2009,18(20):73.
- [ 8 ] 张晓莉,武正强. 白及与小白及的比较鉴别[J]. 中国药师,2001,4(6):476.
- [ 9 ] HE Z J, LV L F, YANG L Y, et al. Genetic diversity of *Bletilla* Rchb. f. germplasms by ISSR analysis [J]. Southwest China J Agric Sci, 2008, 21(4):1081-1085.
- [ 10 ] WANG C, TIAN M. Seventeen novel microsatellite markers for a valuable medicinal plant *Bletilla striata* and cross-amplification in *B. ochracea* [J]. Conserv Genet Resour, 2015, 7(3): 715-716.
- [ 11 ] 李景超,雷春梅,郝世霞,等. FPPF 利用 ISSR 分析浙产白及种质资源的遗传多样性[J]. 中华中医药学刊,2013(2):294-297.
- [ 12 ] 孙宇龙. 白及的假鳞茎诱导、遗传资源鉴定与评价的研究[D]. 南京:南京师范大学,2015.
- [ 13 ] 吴劲松,张宇思,刘薇,等. 白及属药用植物 DNA 条形码的确立及其应用[J]. 药学学报,2014,49(10): 1466-1474.
- [ 14 ] 陈黎. 鄂西北白及产地适宜性与品质评价研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2014.
- [ 15 ] 辛天怡,姚辉,罗焜,等. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究[J]. 药学学报,2012,47(8):1098-1105.
- [ 16 ] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:173-175.

[责任编辑 邹晓翠]