

应用ITS2条形码及种子形态鉴定柴胡属种子

戚文涛, 李剑超, 王晨, 罗容, 刘长利*

(首都医科大学 中医药学院, 中医络病研究北京重点实验室, 北京 100069)

[摘要] **目的:**采用传统形态鉴定方法结合DNA条形码分子检测技术准确鉴定柴胡属种子。**方法:**收集41份市售柴胡属种子和GenBank数据库中下载15个品种75条核糖体DNA第二内部转录间隔区(ITS2)序列。利用体视显微镜和游标卡尺进行种子外观形态特征的观察和记录,测定千粒重。提取种子的基因组DNA,采用聚合酶链式反应(PCR)扩增,双向测序得ITS2序列。基于BLAST法,邻接(NJ)系统进化树法, Kimura双参数模型(K2P)遗传距离法和ITS2序列二级结构进行物种鉴定。**结果:**不同基原的柴胡属种子在长、宽、横切面及千粒重等方面存在细微的差别;柴胡种子的ITS2序列有2个种内变异位点,3种单倍型,种内最大遗传距离0.009小于种间最小遗传距离0.032;NJ系统进化树中柴胡和狭叶柴胡分别聚为独立一支,具有良好的单系性;ITS2序列二级结构可以弥补NJ树在变种鉴定方面的不足。41份柴胡属种子样品中有30份柴胡,3份狭叶柴胡,5份三岛柴胡,2份藏柴胡及1份小叶黑柴胡。**结论:**市售柴胡种子存在来源多样、基原混乱的问题。基于ITS2条形码和种子形态鉴定相结合的方法可以准确鉴定柴胡属种子,为制定柴胡种子质量标准,规范柴胡种植,从源头解决柴胡药材质量问题提供科学依据,并为其他药用植物种子或者种子类药材的准确鉴定提供参考。

[关键词] 柴胡属; 种子; 传统形态学; DNA条形码; 核糖体DNA第二内部转录间隔区(ITS2); 二级结构; 聚合酶链式反应(PCR)

[中图分类号] R22;R931;R282;Q523;C37 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)11-0170-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201055

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200206.2002.012.html>

[网络出版日期] 2020-2-7 11:03

Identification of *Bupleurum* Seeds by ITS2 Genetic Barcoding and Seed Morphology

QI Wen-tao, LI Jian-chao, WANG Chen, LUO Rong, LIU Chang-li*

(Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Collateral Disease Theory
Research, School of TCM, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To accurately identify *Bupleurum* seeds by traditional morphological identification method combined with DNA barcoding technique. **Method:** A total of 41 seed samples on the market were collected and 75 ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequences of 15 varieties were downloaded from the GenBank database as experimental materials. The seeds were measured and observed by stereomicroscope and vernier caliper, and their 1 000-grain weights were calculated. Genomic DNA was extracted from the seeds and used as a template, and ITS2 sequences were amplified using polymerase chain reaction (PCR) and bidirectional sequencing. Species identification was conducted based on BLAST method, neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree method, Kimura two-parameter model (K2P) genetic distance method, and secondary structure of ITS2 sequence. **Result:** There were slight differences in the length, width, cross-section, and 1 000-grain weight among *Bupleurum* seeds from different origins. The ITS2 sequences of *B. chinense* seeds had 2 intraspecific variable sites and 3 haplotypes, the maximum intraspecific genetic distance

[收稿日期] 20191130(006)

[基金项目] 首都中医药研究专项重点课题(17ZY06)

[第一作者] 戚文涛,在读硕士,从事中药资源相关研究, Tel:010-83950333, E-mail:qiwentao2011@yeah.net

[通信作者] *刘长利,博士,副教授,从事中药资源相关研究, Tel:010-83910162, E-mail:chaihuzhu666@126.com

(0.009) was far smaller than the minimum interspecific genetic distance (0.032). *B. chinense* and *B. scorzonerifolium* in the NJ phylogenetic tree were clustered into independent branches with good monophyletic property. The secondary structure of ITS2 sequences could make up for the shortcomings of NJ tree in identifying variants. The collected 41 seeds included 30 *B. chinense* seeds, 3 *B. scorzonerifolium* seeds, 5 *B. falcatum* seeds, 2 *B. marginatum* var. *stenophyllum* seeds, and 1 *B. smithii* var. *parvifolium* seeds. **Conclusion:** The *B. chinense* seeds on the market have problems of diverse sources and chaotic origins. Based on the combination of ITS2 genetic barcoding and seed morphological identification, the *Bupleurum* seeds can be accurately identified, which provides scientific bases for establishing the quality standard of *Bupleurum* seeds, standardizing the cultivation of *B. chinense*, and solving the quality problems of *B. chinense* from the source, and provides a reference for the accurate identification of other medicinal plant seeds or seed medicinal materials.

[Key words] *Bupleurum*; seeds; traditional morphology; DNA barcoding; ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 (ITS2); secondary structure; polymerase chain reaction (PCR)

伞形科柴胡属植物主要分布在北半球温带、亚热带地区,约有200属,2500种植物,中国有36种^[1],其中作药用的有25种^[2-3]。柴胡作为我国传统大宗药材,味辛、苦,性微寒,归肝、胆、肺经,具有疏散退热、疏肝解郁、升阳举气的功效,主要用于感冒发热、寒热往来、月经不调等证。2015年版《中国药典》规定柴胡为伞形科植物柴胡和狭叶柴胡的干燥根,习称北柴胡和南柴胡^[4]。近几十年来,随着中药产业的发展,国内外对柴胡的需求量不断增加,野生资源日趋减少,且野生采挖成本较高,人工种植柴胡是解决柴胡药材资源问题的最佳途径之一。柴胡资源在我国分布广泛,各地习用柴胡品种略有不同,目前缺少相应的法定标准或规范,市售柴胡种子和药材存在品种多样、来源不确定和质量不稳定等问题,极不利于“有效、优质、稳定、可控”的柴胡药材生产^[5-9]。因此,加强对柴胡种子(实为柴胡果实的分果,在农业生产上习称种子)的品种鉴定、质量标准建立等方面的研究迫在眉睫。

DNA条形码技术是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的DNA片段来进行物种鉴定的分子诊断新技术,是传统形态鉴别方法的辅助手段和有效补充,可以实现对生物物种的准确、快速鉴别^[10]。植物鉴定中常用的基因包括叶绿体基因组的 *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL* 等序列,核基因组的核糖体DNA内转录间隔区(ITS)和核糖体DNA第二内部转录间隔区(ITS2)序列^[11]。目前,DNA条形码技术在中药材和药用植物种子鉴定中已有应用^[12-16],但关于柴胡属种子的分子鉴定研究少有报道,本研究拟采用ITS2条形码结合传统形态的方法鉴定柴胡属种子,以期准确鉴定柴胡和狭叶柴胡种子的同时,也对市场上常见的藏柴胡、三岛柴胡及小叶黑柴胡的种子

进行研究,为制定柴胡种子质量标准,规范柴胡种植,从源头解决柴胡药材质量问题提供科学依据,并为药用植物种子或者种子类药材的准确鉴别提供参考。

1 材料

SteREO Discovery. V8型体视显微镜(德国Zeiss公司),MM400型球磨机(德国Retsch公司),T100型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司),1-14型离心机(德国Sigma公司)。离心柱型植物基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号R6808],常规琼脂糖G-10(Regular Agarose G-10,西班牙Biowest公司,批号111860),2×KAPA HiFi高保真热启动DNA聚合酶预混液PCR试剂盒(2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit,美国Kapa Biosystems公司,批号005726-1-1),Trans2K Plus II DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司,批号N20927)。

柴胡属种子样品是本课题组于2018年3月至12月从河北安国药材市场、中药材种植基地、科研院所及北京郊区野生柴胡自采收集,共计41份,经首都医科大学中医药学院刘长利副教授鉴定,相关信息见表1。GenBank数据库中下载15种75条ITS2序列,包括当归、防风的ITS2序列各2条,见表2。

2 方法

2.1 种子外观形态特征观察 每份供试种子样品随机选取30粒,用体视显微镜及游标卡尺进行观察和测量,记录供试种子的大小、形状、颜色及表面特征,拍照;从充分混匀的净种子样品中随机抽取3个重复,每个重复500粒种子进行称重,取平均值并估算其千粒重。

表1 柴胡属种子样品信息和ITS2序列登录号

Table 1 Sample information of *Bupleurum* seeds and their accession numbers of ITS2 sequences

| 编号 | 物种 | 采集地 | GenBank 登录号 | 样本量/g |
|-----|---|--------------------|-------------|-------|
| B1 | 柴胡 <i>Bupleurum chinense</i> | 黑龙江省大庆市 | MK258690 | 500 |
| B2 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 陕西省宝鸡市 | MK258691 | 500 |
| B3 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 陕西省商洛市 | MK258692 | 500 |
| B4 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 甘肃省天水市渭南镇 | MK258693 | 500 |
| B5 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山西省运城市绛县 | MK258694 | 500 |
| B6 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 甘肃省定西市渭源县 | MK258695 | 500 |
| B7 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 河南省三门峡市卢氏县 | MK258696 | 500 |
| B8 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山东省莱芜市 | MK258697 | 500 |
| B9 | 三岛柴胡 <i>B. falcatum</i> | 河北省安国市 | MK258698 | 500 |
| B10 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 河南省洛阳市洛宁县 | MK258699 | 500 |
| B11 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 甘肃省定西市陇西县 | MK258700 | 500 |
| B12 | 三岛柴胡 <i>B. falcatum</i> | 河南省嵩县 | MK258701 | 500 |
| B13 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 北京(中柴2号) | MK258702 | 500 |
| B14 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 四川省绵阳市(川北柴1号) | MK258703 | 500 |
| B15 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山东省济南市 | MK258704 | 500 |
| B16 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 河北省承德市 | MK258705 | 500 |
| B17 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山西省(购自安国市) | MK258706 | 500 |
| B18 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 甘肃省定西市 | MK258707 | 500 |
| B19 | 藏柴胡 <i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i> | 甘肃省定西市 | MK258708 | 500 |
| B20 | 藏柴胡 <i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i> | 甘肃省定西市临洮县 | MK258709 | 500 |
| B21 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 甘肃省定西市陇西县 | MK258710 | 500 |
| B22 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 河北省安国市 | MK258711 | 500 |
| B23 | 狭叶柴胡 <i>B. scorzonerifolium</i> | 内蒙古自治区海拉尔(野生) | MK258712 | 500 |
| B24 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 北京市平谷区(野生) | MK258713 | 5 |
| B25 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 北京市平谷区(野生) | MK258714 | 20 |
| B26 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 甘肃省定西市渭源县 | MK258715 | 500 |
| B27 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 河南省三门峡市渑池县 | MK258716 | 500 |
| B28 | 狭叶柴胡 <i>B. scorzonerifolium</i> | 黑龙江省大庆市林甸县 | MK258717 | 500 |
| B29 | 狭叶柴胡 <i>B. scorzonerifolium</i> | 黑龙江省大庆市龙凤区 | MK258718 | 500 |
| B30 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山西省运城市绛县 | MK258719 | 500 |
| B31 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 宁夏回族自治区固原市隆德县 | MK328494 | 500 |
| B32 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山西省(购自安国市) | MK328495 | 500 |
| B33 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山西省长治市长治县 | MK328496 | 500 |
| B34 | 小叶黑柴胡 <i>B. smithii</i> var. <i>parvifolium</i> | 甘肃省农业科学院中药材研究所(兰州) | MK328497 | 15 |
| B35 | 三岛柴胡 <i>B. falcatum</i> | 河北省安国市 | MK328498 | 500 |
| B36 | 三岛柴胡 <i>B. falcatum</i> | 河南省三门峡市 | MK328499 | 500 |
| B37 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山西省(栽培) | MK386702 | 500 |
| B38 | 三岛柴胡 <i>B. falcatum</i> | 河北省邯郸市 | MK386703 | 500 |
| B39 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 山东省(栽培) | MK386704 | 500 |
| B40 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 陕西省(栽培) | MK386705 | 500 |
| B41 | 柴胡 <i>B. chinense</i> | 河北省(栽培) | MK386706 | 500 |

表 2 GenBank 数据库中下载样本的信息

Table 2 Information of samples downloaded from GenBank database

| No. | 物种 | GenBank 登录号 | 数量/条 |
|-----|------------------------------------|--|------|
| 1 | 柴胡 | AY551293, FJ561306, DQ285450, JQ794909, KF573851, AM711597, AB690805, GQ434690, HM114230, KJ716418, KJ716421, DQ285448 | 12 |
| 2 | 狭叶柴胡 | DQ285465, KF573806, JQ794913, HQ687960, KT984186, HM114236, GU570604, HQ687958, JF718838 | 9 |
| 3 | 藏柴胡 | GU570601, KX865159, DQ285466, JF837168, DQ285468, HQ687952, HQ687953 | 7 |
| 4 | 三岛柴胡 | AJ131344, EU001336, JQ794903, HM114237, GU570605, GU570639, KP058322 | 7 |
| 5 | 小叶黑柴胡 | HQ687962, JN571750, HQ824731 | 3 |
| 6 | 黑柴胡 <i>B. smithii</i> | KF573810, GU570637, DQ285455 | 3 |
| 7 | 丽江柴胡 <i>B. rockii</i> | KF573799, FJ385036, DQ285458 | 3 |
| 8 | 大叶柴胡 <i>B. longiradiatum</i> | AY551291, FJ561305, DQ285460, JF738139, JQ794912, GU068047, KJ716417, HQ687941, EU592005 | 9 |
| 9 | 竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> | HQ687955, JN571753, DQ285466 | 3 |
| 10 | 金黄柴胡 <i>B. aureum</i> | KF454535, HQ687903, KF573805, EF101157, KF454528 | 5 |
| 11 | 新疆柴胡 <i>B. exaltatum</i> | KF454525, KF573812, EU220923 | 3 |
| 12 | 锥叶柴胡 <i>B. bicaule</i> | KT984193, HQ824723, HQ824722 | 3 |
| 13 | 紫花鸭跖柴胡 <i>B. commelynoideum</i> | EU001335, KF573850, KF573822, EU220929 | 4 |
| 14 | 防风 <i>Saposhnikovia divaricata</i> | KR232580, AB570260 | 2 |
| 15 | 当归 <i>Angelica sinensis</i> | GU289658, FJ204235 | 2 |

2.2 DNA 提取及 PCR 扩增 取供试种子样品用 75% 乙醇擦拭表面, 挑选籽粒饱满的种子 10 粒(约 10 mg), 置于 2 mL 离心管中, 液氮冷冻, 用球磨仪研磨 1 min(1 800 r·min⁻¹), 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。以提取的基因组 DNA 作为模板, 选择相应引物进行 PCR 反应(ITS2F: 5' - ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'; ITS2R: 5' - GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')。PCR 反应体系为 20 μL, 包括 2×KAPA HiFi 高保真热启动 DNA 聚合酶预混液 10 μL, 引物 ITS2F/R 各 0.6 μL, 基因组 DNA 1 μL, 双蒸水 7.8 μL。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 共计 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。由北京

睿博兴科生物技术有限公司进行双向测序。

2.3 数据处理 应用 SeqMan 7.1 软件对测序所得序列进行剪切和拼接, 去除引物及低质量区。基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法, 去除两端 5.8 S 和 28 S 区段即可获得 ITS2 间隔区序列^[17], 见图 1。利用 DNAMAN 7.0 软件对所得 ITS2 序列进行多重序列比对; 运用 MEGA 7.0 软件计算序列 GC(G 表示鸟嘌呤, C 表示胞嘧啶)含量和种内、种间 Kimura 双参数模型(K2P)遗传距离, 利用邻接法(NJ)构建系统进化树, 同时以自展值(bootstrap)1 000 次重复检验各分支的支持率; 应用 DNAsp 5.0 软件对柴胡和狭叶柴胡的单倍型进行检测。基于 ITS2 数据库(<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>)预测 ITS2 序列的二级结构。



图 1 去除 5.8 S 和 28 S 片段获取的 ITS2 序列示意

Fig. 1 Schematic diagram of ITS2 sequence obtained by removing 5.8 S and 28 S fragments

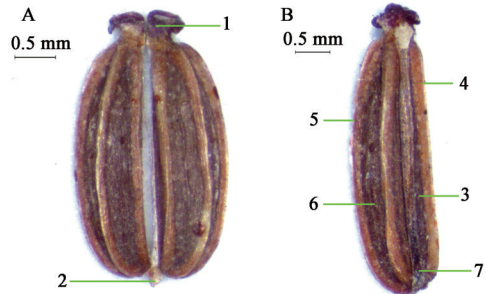
3 结果与分析

3.1 种子形态特征鉴定 对种子形态特征观察发

现, 41 份柴胡属种子的外观形态特征相似, 果实均为双悬果, 顶端花柱基宿存, 基部圆钝; 分果呈卵

形、矩圆形或椭圆形,两端压扁,背部略拱凸,向合生面弯曲,表面有5条主棱(中间背棱1条,两边侧棱各1条,两侧棱和背棱间各有中棱1条),棱槽处有纵皱纹,合生面中央有果柄痕^[18-19],见图2。对比不同基原的柴胡属种子发现,种子均比较细小,外观极其相似,在颜色、长、宽、横切面及千粒重等方面有细小差别;观察30份柴胡种子发现,不同产地的柴胡种子受地理生态环境影响,在长、宽、厚及千粒重等方面略有不同,相比于藏柴胡和三岛柴胡均比较细小,表面棱呈狭翼状;狭叶柴胡种子比较细长,相比于藏柴胡和三岛柴胡要短小,千粒重也较小;对比种子横切面发现,柴胡种子横切面近圆形,其他4种柴胡属种子横切面均为五边形。种子形态特征研究表明,5种柴胡属种子的外观形态特征存

在细微差异,由于种子均比较细小,肉眼鉴定易出现偏差,见表3和图3。



A. 果实; B. 分果(种子); 1. 顶端; 2. 基部; 3. 合生面; 4. 侧棱; 5. 中棱; 6. 棱槽; 7. 果柄痕

图2 柴胡属果实及种子的外观形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *Bupleurum* fruits and seeds

表3 5种柴胡属种子外观形态特征及其参数

Table 3 Morphological characteristics of five *Bupleurum* seeds and their related parameters

| 物种 | 颜色 | 棱 | 合生面 | 横切面 | 长/mm | 宽/mm | 厚/mm | 千粒重/g |
|-------|-----|---------|-----|-----|---------|---------|---------|---------|
| 柴胡 | 棕黑色 | 微凸且呈狭翼状 | 宽 | 近圆形 | 2.0~3.9 | 0.9~1.3 | 1.0~1.4 | 0.7~1.4 |
| 狭叶柴胡 | 暗褐色 | 凸起且粗钝 | 稍宽 | 五边形 | 3.0~3.9 | 0.9~1.0 | 0.8~1.0 | 0.8~1.0 |
| 三岛柴胡 | 暗棕色 | 凸起且粗钝 | 稍宽 | 五边形 | 3.1~4.2 | 1.2~1.6 | 1.0~1.3 | 1.2~1.7 |
| 藏柴胡 | 棕黄色 | 凸起且粗细不一 | 窄 | 五边形 | 4.1~6.7 | 0.9~1.2 | 0.8~1.1 | 1.8~2.0 |
| 小叶黑柴胡 | 棕黑色 | 凸起且稍粗钝 | 稍宽 | 五边形 | 2.0~3.4 | 0.9~1.2 | 0.8~1.2 | 0.9~1.0 |



A, B. 柴胡; C, D. 狭叶柴胡; E, F. 三岛柴胡; G, H. 藏柴胡; I, J. 小叶黑柴胡

图3 5种柴胡属种子的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of five *Bupleurum* seeds

3.2 基于ITS2序列物种鉴定 将测序所得41条ITS2序列提交至GenBank数据库获取登录号,见表1。在GenBank数据库和ITS2数据库中分别进行局部序列比对基本检索工具(BLAST)分析,结果表明ITS2序列能够准确鉴定出种子的基原,41条ITS2

序列中30条为柴胡,3条为狭叶柴胡,5条为三岛柴胡,2条为藏柴胡,1条为小叶黑柴胡。柴胡属种子的ITS2序列特征见表4。其中柴胡种子的ITS2序列有31,193两种内变异位点,共有3种单倍型,依次为单倍型H1(包括40条序列),单倍型H2(1条B15序列),单倍型H3(1条AB690805序列);狭叶柴胡ITS2序列有1个种内变异位点,2种单倍型[单倍型A1(包括11条序列)和单倍型A2(1条DQ285465序列)]。柴胡等13种柴胡属物种的ITS2序列差异碱基位点主要集中在22,31,32,35,42,64,141,144,149,169,179,183,186,191,195,216 bp等,其中藏柴胡中分布较多的差异位点;柴胡属物种与防风、当归的ITS2序列除部分保守位点外完全不一样,见图4。

3.3 柴胡与狭叶柴胡的种内、种间遗传距离及NJ树 基于K2P模型计算ITS2序列遗传距离,柴胡种内平均遗传距离0.001,种内最大遗传距离0.009,与柴胡属其他品种的种间最小遗传距离0.032,故柴胡种间最小遗传距离大于种内最大遗传距离;狭叶柴胡种内平均遗传距离0.001,种内最大遗传距离0.004,与柴胡属其他品种的种间最小K2P遗传

表 4 柴胡属种子的 ITS2 序列特征

Table 4 ITS2 sequence characteristics of *Bupleurum* seeds

| 品种 | ITS2 长度 /bp | GC 含量/% | 种内变异 位点数/个 | 种内信息 位点数/个 | 品种 | ITS2 长度 /bp | GC 含量/% | 种内变异 位点数/个 | 种内信息 位点数/个 |
|-------|-------------|---------|------------|------------|--------|-------------|---------|------------|------------|
| 柴胡 | 221 | 58.4 | 2 | 0 | 竹叶柴胡 | 219 | 60.7 | 0 | 0 |
| 狭叶柴胡 | 221 | 60.7 | 1 | 0 | 金黄柴胡 | 220 | 60.0 | 2 | 1 |
| 三岛柴胡 | 221 | 59.4 | 0 | 0 | 新疆柴胡 | 221 | 59.7 | 0 | 0 |
| 藏柴胡 | 218 | 60.6 | 6 | 1 | 锥叶柴胡 | 221 | 59.3 | 0 | 0 |
| 小叶黑柴胡 | 221 | 59.7 | 0 | 0 | 紫花鸭跖柴胡 | 221 | 58.4 | 0 | 0 |
| 黑柴胡 | 221 | 59.4 | 2 | 0 | 防风 | 214 | 55.6 | 0 | 0 |
| 丽江柴胡 | 221 | 57.6 | 0 | 0 | 当归 | 217 | 55.3 | 0 | 0 |
| 大叶柴胡 | 221 | 59.6 | 2 | 1 | | | | | |

```

柴胡      CCTAAAG. CATTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGGGGACGAAAAGTACCTCCCG 74
狭叶柴胡 CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGGGGACGAAAAGTACCTCCCG 74
藏柴胡    CCTAAAG. CATTGCCCTCCCGCTCTCGCTGCTAGTGAAGTTGTTGAGTTCGGGGACGAAAAGTACCTCCCG 74
三岛柴胡  CCTAATAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAAGCCAGTCATTTGCTGTTCCGGGGACGAAAAGTACCTCCCG 74
小叶黑柴胡 CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGGGGACGAAAAGTACCTCCCG 74
黑柴胡    CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGGGGACGAAAAGTACCTCCCG 74
大叶柴胡  CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAATCCGAGTCGTTGCTGTTCCGGGGACGAAAATGACCTCCCG 74
金黄柴胡  CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCACTCAAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGGGG. CGGAAAAGTACCTCCCG 73
丽江柴胡  CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGGGGACGAAAATGACCTCCCG 74
新疆柴胡  CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGTGGGGACGAAAATGACCTCCCG 74
紫花鸭跖柴胡 CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGGGGACGAAAAGTACCTCCCG 74
竹叶柴胡  CCTAAAG. CATTGCCCTCCCGCTCTCGCTGCTAGTGAAGTTGTTGAGTTCGGGGACGAAAAGTACCTCCCG 74
锥叶柴胡  CCTAAAG. CTTTGCCCTCCCGAGCTCGCTCAAAGCCAGTCGTTGCTGTTCCGGGGACGAAAATGACCTCCCG 74
当归      CCGATCATCTTTGCCACA. ACCACTCACTCTCGTGGAGCTGACTGATGGGG. CGGAAAATGGCTCCCG 73
防风      CCGATCTCTTTGCCACAGACCCTCACACT. GAGAAGTTGTAGGTTGGGG. CGGAAATGACCTCCCG 73
    
```

```

柴胡      TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCCCGGAGTCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGTCGTTACGC 149
狭叶柴胡 TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGCTCCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGC 149
藏柴胡    TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAG. TCTCCGAGATCGGTAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACTA 147
三岛柴胡  TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGC 149
小叶黑柴胡 TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGTCATTACGC 149
黑柴胡    TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGTCATTACGC 149
大叶柴胡  TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGC 149
金黄柴胡  TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGTCATTACGC 148
丽江柴胡  TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGC 149
新疆柴胡  TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGC 149
紫花鸭跖柴胡 TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGTCATTACGC 149
竹叶柴胡  TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACTA 149
锥叶柴胡  TCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGAGATCGGAAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGC 149
当归      TCCTCGTCTGCGGCTGGCGGAAAAAGTGAAGTCTCCGCGA. CGGACGTCGTCACATTGGTGGTTGAA. AATA 145
防风      TACCTTGTCTGCGGCTGGCGGAAAAACGAGTCTCCGCGA. CGGATGTCGTCACATCGGTGGTTGAA. AAGA 145
    
```

```

柴胡      ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAAAATCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
狭叶柴胡 ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAAAATCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
藏柴胡    ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCTCGTT. CTACGCGAGCGACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 218
三岛柴胡  ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
小叶黑柴胡 ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
黑柴胡    ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
大叶柴胡  ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
金黄柴胡  ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCCACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 221
丽江柴胡  ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTAACTCTGTGAGCAACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
新疆柴胡  ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
紫花鸭跖柴胡 ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
竹叶柴胡  ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCTCGTT. CTACGCGAGCGACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 220
锥叶柴胡  ACCTCTTGGCATATTGCGCTCAGCCGTTTACTCTGTGAGCAACAGCGACCCCTTTGGCGCCGCCAGGTCGG 222
当归      CCCTCATGTTCTTCCGCGGAATCCGCTCATCTTGTAGGAGCTCAAGGACCCCTTAGGGCCGACACACTTTGTG 218
防风      CCCTCTTCTTTCTCCGCGGAATCCCTCTCATCTTAGAGAGATCCAGGACCCCTTAGGCACGACACTCTGTG 218
    
```

图 4 柴胡属种子的 ITS2 多重序列比对

Fig. 4 Multiple alignment in ITS2 sequences of *Bupleurum* seeds

距离 0.023, 故狭叶柴胡种间最小遗传距离大于种内最大遗传距离。通过 K2P 遗传距离分析可知, ITS2 序列可准确鉴定柴胡和狭叶柴胡种子。

基于 ITS2 序列构建 NJ 系统进化树, 见图 5。结果表明混伪品中防风、当归和柴胡属其他物种分别

单独聚类, 说明其与柴胡属物种的亲缘关系较远较易区分。柴胡属内 13 个物种又单独聚为 11 小支, 其中藏柴胡(又名窄竹叶柴胡)与小叶黑柴胡分别为竹叶柴胡、黑柴胡的变种, 分别单独聚为一支, 其它各支支持率较高, 具有良好的单系性。NJ 树聚类

分析表明,ITS2序列NJ系统进化树适用于亲缘关系较近的柴胡属内各品种的鉴定,可准确鉴定柴胡和狭叶柴胡种子,但对变种的鉴定效果不佳。

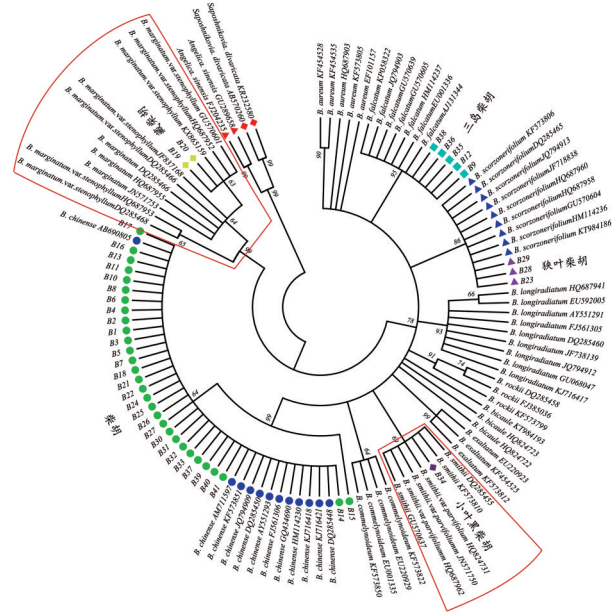
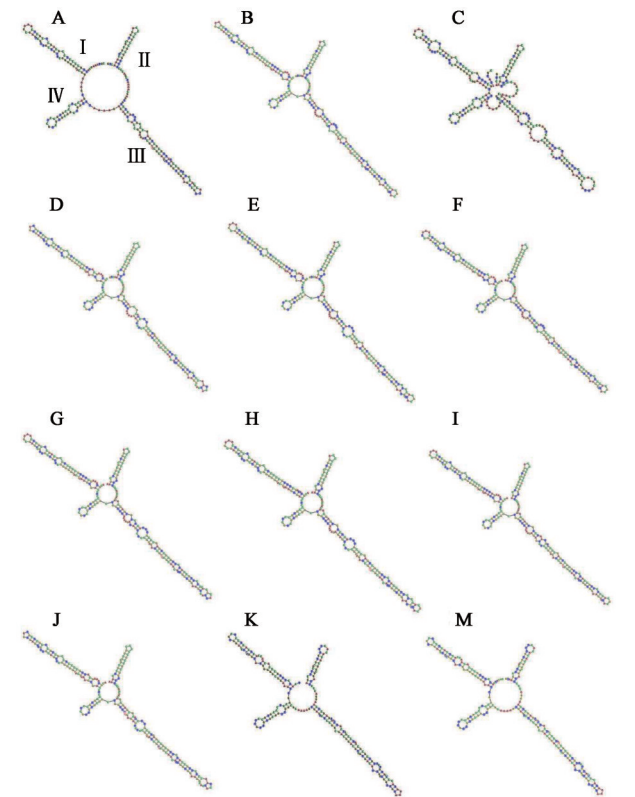


图5 基于ITS2序列构建的柴胡属种子NJ树
Fig. 5 NJ tree of *Bupleurum* seeds based on ITS2 sequences

3.4 柴胡属种子ITS2序列二级结构比较 柴胡属种子的ITS2序列二级结构见图6。结果显示所有物种的ITS2二级结构均由1个中心环和4个螺旋区组成,每个螺旋上又有大小不等、数目各异的茎环结构。其中柴胡的中心环较大,螺旋II区有1个环,IV区有2个环,能够区别于其他物种;三岛柴胡的中心环结构比较复杂也容易区分。狭叶柴胡、藏柴胡、小叶黑柴胡、丽江柴胡、大叶柴胡、竹叶柴胡、紫花鸭跖柴胡及金黄柴胡的二级结构在螺旋II区和IV区较为保守,螺旋I区和III区存在差异。狭叶柴胡在I区有4个环,III区有7个环;藏柴胡在I区有5个环,III区有7个环;小叶黑柴胡在I区有4个环,III区有8个环;丽江柴胡在I区有4个环,III区有8个环;大叶柴胡在I区有5个环,III区有7个环;竹叶柴胡在I区有5个环,III区有7个环;紫花鸭跖柴胡在I区有4个环,III区有9个环。藏柴胡、大叶柴胡及竹叶柴胡柴在螺旋I区和III区的茎环数目虽然相等,但环的大小、环与环之间的距离都有不同。混伪品防风、当归与柴胡的最大区别在于螺旋II区,柴胡只有1个环,防风、当归均有2个环;与狭叶柴胡的区别在于中心环的大小和III、IV区中茎环个数的差异,狭叶柴胡III区有7个环,防风、当归则有4个环;狭叶柴胡IV区仅有1个环,防风和当归则

有2个环。防风、当归和柴胡属其他物种的最大区别在于III区,二者均具有4个环,少于柴胡属其他物种在III区的茎环个数。同时,藏柴胡作为竹叶柴胡的变种,两者二级结构在III区中的茎环大小和间距不相同,可以准确鉴别变种。说明ITS2序列二级结构能够准确鉴定柴胡属种子,还可准确鉴定出变种,可作为ITS2序列NJ进化树鉴定的有效补充。



A. 柴胡;B. 狭叶柴胡;C. 三岛柴胡;D. 藏柴胡;E. 小叶黑柴胡;F. 大叶柴胡;G. 紫花鸭跖柴胡;H. 金黄柴胡;I. 丽江柴胡;J. 竹叶柴胡;K. 防风;M. 当归

图6 部分柴胡属种子的ITS2二级结构
Fig. 6 ITS2 secondary structures of some *Bupleurum* seeds

4 讨论

4.1 柴胡属种子DNA基因组的提取 获取高质量的基因组DNA是进行DNA条形码研究的关键环节和必要前提。为避免污染、提高鉴定的准确性和稳定性,实验前用75%乙醇擦拭种子表面,自然晾干;但种子类样品内含丰富油脂及酚类、多糖类物质,研磨时极易被氧化,损失较大,故本实验采用液氮冷冻并用球磨仪快速研磨粉碎,并用试剂盒快速提取;由于柴胡属种子细小,为提高提取的DNA浓度,适当的增加样本量至10粒,约10 mg。

4.2 ITS2序列及种子形态鉴定柴胡属种子的可行性 2015年版《中国药典》规定柴胡药材正品基原

为柴胡和狭叶柴胡,故准确鉴定柴胡和狭叶柴胡种子是研究的重点。作为DNA条形码技术的鉴别序列,首要标准就是要有足够的种间变异,可将不同物种区分开来,同时又要有较小的种内差异,可将同一物种聚为同一类。在本研究中,不同物种ITS2序列的GC含量、种内变异位点和信息位点各异;ITS2序列比对发现,柴胡属不同物种间存在多个差异碱基位点;K2P遗传距离分析发现,柴胡和狭叶柴胡种子ITS2序列的种间最小遗传距离显著大于种内最大遗传距离,说明ITS2序列可作为柴胡属种子DNA条形码鉴定序列。基于ITS2序列构建的NJ进化树中,不同物种表现出良好的单系性,且各支支持率较高,但不能准确鉴定藏柴胡和竹叶柴胡这样的变种,结合ITS2序列二级结构的中心环和螺旋区的不同,能够准确鉴定柴胡属内的种和变种,说明ITS2条形码可以准确鉴定柴胡种子、狭叶柴胡种子及其他市场上常见的藏柴胡、三岛柴胡及小叶黑柴胡种子等。同时结合种子外观形态特征的不同,能够更加准确和稳定地鉴定出柴胡属种子的基原。

4.3 DNA条形码鉴定柴胡属种子的意义 在本研究41份供试种子样品中,33份种子为柴胡药材的正品基原(柴胡种子30份,狭叶柴胡种子3份),其他柴胡属种子8份,说明市售柴胡种子存在来源多样、基原混乱等问题。柴胡属种子比较细小,外观形态特征存在细微差异,但肉眼鉴定易出现偏差;柴胡资源在我国分布广泛,各地习用品种存在不同,除柴胡和狭叶柴胡外,市场上常见的还有三岛柴胡、藏柴胡、锥叶柴胡等柴胡属其他品种;目前尚缺少相应的法律法规规范柴胡种子种苗的生产和销售。这些因素造成柴胡种子种苗市场的不规范,最终导致市售柴胡药材质量参差不齐、来源多样,严重影响了柴胡药材的质量稳定和临床用药安全,所以从源头着手,准确鉴定柴胡属种子的基原,保证柴胡和狭叶柴胡种子的质量至关重要。DNA条形码技术具有快速、准确、微量及通用性强的特点,不受发育阶段、物质形态、环境条件的影响,可以鉴别细小、外观性状相似的样品,弥补了传统鉴别方法的不足,在中药鉴定领域具有广阔的应用前景^[20]。

[参考文献]

[1] KUANG H X, SUN S W, YANG B Y, et al. New megastigmane sesquiterpene and indole alkaloid glucosides from the aerial parts of *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80: 35-38.

[2] 梁镇标. 柴胡属药用植物资源调查及基于代谢组学的质量评价研究[D]. 广州:南方医科大学,2012.

[3] 黄涵签,王潇晗,付航,等. 柴胡属药用植物资源研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2989-2996.

[4] 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.

[5] 陈亚双,孙世伟. 柴胡的化学成分及药理作用研究进展[J]. *黑龙江医药*, 2014, 27(3): 630-633.

[6] 马艳芝,客绍英. 不同柴胡种质资源的ISSR和ITS序列分析[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2015, 43(1): 193-200.

[7] 姚入宇,陈兴福,张宝林,等. 我国柴胡的种质资源现状与育种研究展望[J]. *中草药*, 2013, 44(10): 1349-1353.

[8] 赵香妍,刘长利. 中药柴胡的研究概况与发展趋势[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(4): 201-204.

[9] 康玮. 北方地区栽培柴胡的品种及质量研究[D]. 北京:北京中医药大学,2011.

[10] 陈士林,庞晓慧,罗煜,等. 生物资源的DNA条形码技术[J]. *生命科学*, 2013, 25(5): 458-466.

[11] 王川易,郭宝林. 中药分子鉴定方法评述[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(3): 237-242.

[12] 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.

[13] 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): 37-45.

[14] 石林春,金钺,赵春颖,等. 基于DNA条形码技术的知母种子基原鉴定[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12): 21-27.

[15] 李雪. 辽藁本DNA条形码鉴定及规范化种植技术研究[D]. 北京:中国农业大学,2015.

[16] CHAO Z, ZENG W P, LIAO J, et al. DNA barcoding Chinese medicinal *Bupleurum* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(13): 1767-1773.

[17] KELLER A, SCHLEICHER T, SCHULTZ J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.

[18] 周修腾,杨光,周凌锋,等. 南北柴胡果实特征及显微鉴别研究[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(10): 79-82.

[19] 王长宝,马祥光,何兴金. 伞形科柴胡属部分物种的果实特征及系统学意义[J]. *植物科学学报*, 2011, 29(4): 399-408.

[20] 辛天怡,雷美艳,宋经元,等. 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.

[责任编辑 刘德文]