

· 资源与鉴定 ·

基于 ITS2 序列的中药材苍术种苗 DNA 条形码鉴定

刘金欣^{1,2}, 李耿³, 陈彩霞², 魏妙洁¹, 王燕¹, 赵春颖¹, 石林春^{2*}

(1. 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;

2. 中国医学科学院, 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193; 3. 中日友好医院, 北京 100029)

[摘要] **目的:**建立基于 DNA 条形码技术的中药材苍术种苗鉴定方法。**方法:**收集中药材苍术及其易混品原植物样品 28 份,构建苍术种苗鉴定参考核糖体内部转录间隔区 2(ITS2)条形码数据库。从河北、山东、山西、内蒙古、辽宁及湖北等苍术主产地收集苍术种苗 52 份。通过提取基因组 DNA,聚合酶链式反应(PCR)扩增,双向测序获得其 ITS2 条形码序列。应用 PUAP 4.0 软件计算种内、种间遗传距离,利用 MEGA 7.0 软件构建邻接树,对中药材苍术种苗进行 DNA 条形码鉴定。**结果:**中药材苍术及其易混品原植物 ITS2 条形码序列具有稳定的序列差异,邻接树呈现单系性,可以明显区分苍术及其易混品;基于标准参考数据库,42 份苍术种苗为朝鲜苍术(80.8%),7 份苍术种苗为苍术(13.5%),3 份苍术种苗为白术(5.7%)。**结论:**基于 ITS2 序列可以准确区分中药材苍术及其混伪品种苗。苍术种苗基原物种鉴定结果以朝鲜苍术为主,提示苍术临床用药存在潜在安全风险。

[关键词] 苍术; 种苗; DNA 条形码; 核糖体内部转录间隔区 2; 朝鲜苍术

[中图分类号] R282;R931;R284;Q523 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0034-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020034

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1930.082.html>

[网络出版时间] 2017-11-02 19:30

Identification of DNA Barcoding of *Atractylodis Rhizoma* Seedlings by ITS2 Sequence

LIU Jin-xin^{1,2}, LI Geng³, CHEN Cai-xia², WEI Miao-jie¹, WANG Yan¹, ZHAO Chun-ying¹, SHI Lin-chun^{2*}

(1. Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation of Chinese Medicine, Chengde Medical University,

Chengde 067000, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical

Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

3. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** In order to guarantee the species correction of *Atractylodis Rhizoma* seedlings, a molecular identification method with internal transcribed spacer 2 (ITS2) as DNA barcode has been tested. **Method:** Here, 28 original plant specimens of *Atractylodis Rhizoma* and their common adulterants have been collected to construct its standard reference ITS2 sequence database. Fifty-two *Atractylodis Rhizoma* seedlings have been collected from Hebei province, Shandong province, Shanxi province, Inner Mongolia autonomous region, Liaoning province and Hubei province to verify their original species. Their ITS2 sequences have been obtained after DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and bi-directional sequencing. The intra-species and inter-species genetic distances were calculated by PUAP 4.0 software. The neighbor-joining (NJ) trees were constructed by MEGA 7.0 software. **Result:** The stable sequence divergence has been found between ITS2 barcode

[收稿日期] 20170614(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303158,81703659);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)

[第一作者] 刘金欣,博士,讲师,从事中药资源相关研究,Tel:18932892367,E-mail:liujx_23@163.com

[通信作者] *石林春,博士,副研究员,从事中药资源相关研究,Tel:13810857601,E-mail:linchun_shi@163.com

sequences of *Atractylodis Rhizoma* and their common adulterants, their NJ trees showed monophyly. With the help of standard reference ITS2 sequence database, we found 42 *Atractylodis Rhizoma* seedlings were from *Atractylodes koreana*, 7 *Atractylodis Rhizoma* seedlings were from *A. lancea*, 3 *Atractylodis Rhizoma* seedlings were from *A. macrocephala*. **Conclusion:** *Atractylodis Rhizoma* seedlings are mainly come from *A. koreana*. This result is consistent with market survey of medicinal resources, suggesting that *Atractylodis Rhizoma* has safety risk. The DNA barcoding method based on the ITS2 sequence can accurately distinguish between *Atractylodis Rhizoma* seedlings and their adulterants seedlings.

[**Key words**] *Atractylodis Rhizoma*; seedling; DNA barcoding; internal transcribed spacer 2; *Atractylodes koreana*

苍术具有燥湿健脾、祛风散寒、明目的功效,临床用于治疗湿阻中焦、脘腹胀满、泄泻、水肿、脚气痿躄、风湿痹痛、风寒感冒、夜盲、眼目昏涩^[1-2]。苍术素等挥发油成分被认为是苍术的主要药理活性成分^[3],现代药理研究表明苍术具有抑制胃酸分泌、抗心律失常、抑菌抗炎、降血糖、抗缺氧等作用^[4]。苍术是藿香正气水、如意金黄散等中成药的重要组成部分,资源需求量大,野生药材已濒临枯竭,栽培种植规模逐渐扩大,湖北、江苏、内蒙古、河北等地为该药材的主产地^[5]。苍术栽培有种苗(分株繁殖、根茎繁殖)和种子繁殖 2 种方式,以种苗繁殖为主。近年来,随着苍术市场价格走高,其栽培面积不断扩大,但正品苍术种苗货源有限,致使苍术种苗掺假现象时有发生。

DNA 条形码技术利用基因组中一段通用的标准短序列进行物种鉴定^[6],不依赖鉴定对象的形态特征,不受鉴定对象生长发育阶段的影响,是近年来新兴的种子种苗鉴定方法,已应用于多种中药材种子种苗的鉴定研究^[7-9]。张改霞等^[7]基于核糖体内部转录间隔区 2 (ITS2) 条形码对 27 份药用植物羌活种子样品进行分子鉴定,结果表明 3 份样品不属于 2015 年版《中国药典》规定的羌活正品基原种子。张娜娜等^[8]以泽泻种子为研究对象,利用中药材 DNA 条形码鉴定系统区分不同产地泽泻的基原物种,20 份四川产泽泻种子样本序列为泽泻,其他产区 36 份样本均为东方泽泻。方海兰等^[9]收集了 19 份重楼种子,7 份重楼种苗,以 ITS 为条形码进行基原物种鉴定,结果表明有 20 份样品为非 2015 年版《中国药典》基原物种,甚至有重楼属以外的种属。以上研究表明中药材种子种苗混伪品掺杂问题严峻,市场亟待规范,DNA 条形码技术可为中药材种子种苗鉴定提供可靠的技术保障。本实验以 ITS2 序列为条形码,通过构建苍术及其易混品标准参考序列数据库,对从主产地收集的 52 份苍术种苗

进行基原物种鉴定,尝试建立基于 DNA 条形码技术的苍术种苗鉴定方法。

1 材料

MM400 型球磨仪(德国 Retsch 公司),1-14 型离心机(德国 Sigma 公司),NanoDrop 2000 型超微量分光光度计和 ABI 3730XL 型测序仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),T100 型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Bio-Rad 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)。

2016 年 5 ~ 10 月,从辽宁省、吉林省、河南省、山东省、湖北省、江苏省收集中药材苍术及其易混品原植物样品 28 份,其中苍术 *Atractylodes lancea* 原植物样品 6 份,朝鲜苍术 *A. koreana* 原植物样品 13 份,白术 *A. macrocephala* 原植物样品 9 份,均由承德医学院中药研究所赵春颖教授鉴定,标本存放于承德医学院中药研究所河北省中药研究与开发重点实验室。为考察苍术生产用种苗的物种来源情况,于 2016 年 12 月—2017 年 3 月从河北省、山东省、山西省、内蒙古自治区、辽宁省及湖北省等苍术主产地收集苍术种苗 52 份,由于苍术种苗缺乏完整的植物形态特征,难以利用形态学方法鉴定,种苗实验样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 DNA 提取,PCR 扩增及序列测定 将所收集的苍术种苗活体快速运输到实验室,在实验室除去泥沙,清洗干净,置于 40 °C 烘箱彻底烘干。取烘干的苍术种苗 20 ~ 30 mg,用 MM400 型球磨仪研磨 2 min(30 次/s),使用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,DNA 提取操作步骤依说明书并略作修改。采用 NanoDrop 2000 型超微量分光光度计测定 DNA 浓度及质量。PCR 扩增依照中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则^[10],内部转录间隔区 2 (ITS2) 序列扩增正向引物 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3';

表 1 苍术种苗实验样品的编号及产地

Table 1 Number and locality of *Atractylodes Rhizoma* seedlings

编号	产地	编号	产地
SCZ006	河北省承德市平泉县	SCZ042	湖北省黄冈市英山县
SCZ007	河北省承德市围场县	SCZ043	河北省秦皇岛市青龙县
SCZ008	河北省承德市围场县	SCZ044	河北省秦皇岛市青龙县
SCZ009	河北省承德市围场县	SCZ045	河北省秦皇岛市青龙县
SCZ012	湖北省黄冈市英山县	SCZ046	内蒙古赤峰市喀喇沁旗
SCZ013	河北省承德市隆化县	SCZ047	内蒙古赤峰市喀喇沁旗
SCZ015	河北省承德市隆化县	SCZ048	山东省烟台市牟平区
SCZ016	河北省承德市高新区	SCZ049	山东省烟台市牟平区
SCZ017	河北省承德市高新区	SCZ050	山东省烟台市牟平区
SCZ018	河北省承德市高新区	SCZ051	山西省忻州市宁武县
SCZ019	河北省承德市双桥区	SCZ052	辽宁省抚顺市新宾县
SCZ020	河北省承德市双桥区	SCZ053	辽宁省抚顺市新宾县
SCZ021	河北省承德市双桥区	SCZ054	辽宁省抚顺市新宾县
SCZ022	河北省承德市滦平县	SCZ055	山西省晋中市榆社县
SCZ023	河北省承德市滦平县	SCZ056	山西省晋中市榆社县
SCZ026	河北省承德市滦平县	SCZ057	山西省晋中市榆社县
SCZ027	河北省承德市滦平县	SCZ059	河北省承德市丰宁县
SCZ029	河北省承德市滦平县	SCZ060	河北省承德市丰宁县
SCZ030	河北省承德市滦平县	SCZ061	山西省运城市垣曲县
SCZ031	河北省承德市滦平县	SCZ062	山西省运城市垣曲县
SCZ033	河北省承德市滦平县	SCZ064	河北省承德市隆化县
SCZ036	山西省大同市浑源县	SCZ065	河北省承德市隆化县
SCZ037	山西省大同市浑源县	SCZ066	河北省承德市隆化县
SCZ038	辽宁省抚顺市新宾县	SCZ067	内蒙古赤峰市喀喇沁旗
SCZ040	辽宁省抚顺市新宾县	SCZ068	内蒙古赤峰市喀喇沁旗
SCZ041	湖北省黄冈市英山县	SCZ069	内蒙古赤峰市喀喇沁旗

反向引物 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。扩增体系 (25 μL) 为 PCR mix 12.5 μL , 正、反向引物各 1 μL , 模板 2 μL , 双蒸水 8.5 μL 。ITS2 序列扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经纯化后使用 ABI 3730XL 型测序仪进行双向测序, 测序峰图质量判断依照中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则^[10] 和国际 DNA 条形码协会植物工作组推荐的标准^[11]。

2.2 序列拼接、遗传距离计算及邻接树构建 测序峰图利用 CodonCode Aligner v7.0.1 去除低质量区域、校对拼接和引物序列切除; 基于隐马尔可夫模型 (hidden Markov model, HMM), 使用 HMMER v3.1 软件去除 5.8S rRNA 和 28S rRNA 区段获得 ITS2 序

列^[12]; 利用 Muscle 3.8 进行多序列比对^[13]; 应用 PUAP 4.0 软件计算种内、种间遗传距离^[14]; 利用 MEGA 7.0 进行邻接 (NJ) 树构建^[15]。

2.3 苍术及其易混伪品的参考数据库 苍术及其易混伪品 ITS2 序列长度均为 229 bp。朝鲜苍术共 13 条序列, 分为 2 个单倍型 A1 和 A2, 有 4 个变异位点; 与白术、苍术相比, 种间最小遗传距离 0.017 7, 种间平均遗传距离 0.023; 种内平均遗传距离 0.005 1, 种内最大遗传距离 0.013 2。苍术共 6 条序列, 分为 3 个单倍型 B1, B2 和 B3, 有 3 个变异位点; 与朝鲜苍术、白术相比, 种间最小遗传距离 0.017 7, 种间平均遗传距离 0.023 5; 种内平均遗传距离 0.005 3, 种内最大遗传距离 0.008 8。白术共 9 条序列, 分为 2 个单倍型 C1 和 C2, 有 2 个变异位点; 与朝鲜苍术、苍术相比, 种间最小遗传距离 0.017 8, 种间平均遗传距离 0.025 4; 种内平均遗传距离 0.001 7, 种内最大遗传距离 0.004 4。由 NJ 树可知, 朝鲜苍术、苍术、白术均聚为独立的枝, 具有较高的支持率, 可相互区分。见图 1。

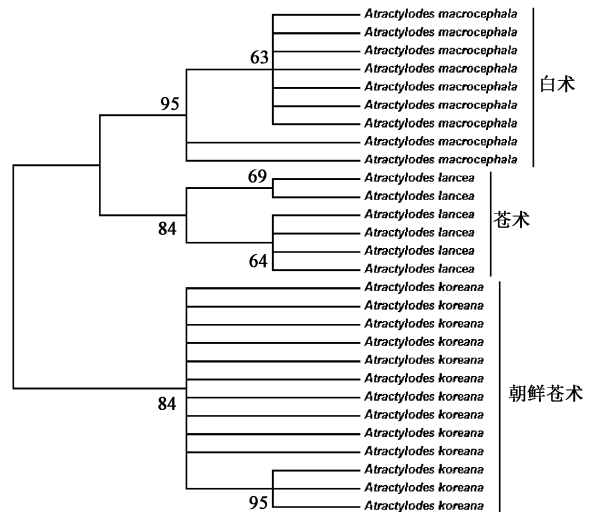


图 1 基于 ITS2 构建的苍术及其易混品 NJ 树

Fig. 1 NJ tree for *Atractylodes Rhizoma* and their adulterants based on ITS2 sequences

2.4 基于 ITS2 序列的苍术种苗基原物种鉴定 52 份苍术种苗样品均可获得较高质量 DNA, DNA 质量浓度均 $> 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 均处于 1.7 ~ 2.0, 说明 DNA 的质量浓度和纯度均较高; 所有样品均可成功进行 PCR 扩增、序列测定和序列拼接, 5.8S rRNA 区的保守序列为 CGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA, 28S rRNA 区的保守序列为 CGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACC, 可基于隐马尔可夫模型使用 HMMER v3.1b2 软件成功去除 5.8S rRNA

不齐^[19],特别是野生资源紧缺、市场价值高的中药材品种,已成为种子种苗掺伪的重灾区。近年来随着苍术价格持续走高,野生资源逐渐枯竭,但苍术“野生变家种”技术尚未完全成熟,北苍术自身种苗产量有限,野外采集的种苗不足以满足种植需求,相当数量种苗购自苍术栽培较久的东北地区,而东北苍术栽培物种以地方习用品关苍术和朝鲜苍术为主,导致了当前苍术种苗混乱的情况。本研究所收集52份苍术种苗中仅13.5%为2015年版《中国药典》规定的正品基原物种,验证了这一情况。朝鲜苍术与苍术的化学成分具有明显差异,挥发油中苍术酮的含量较高,高达31.18%,而 β -桉叶醇含量较低^[20],两者在药理活性上存在差异,苍术栽培过程中引入朝鲜苍术种苗将给苍术药材市场及苍术的临床应用带来潜在的安全风险。

[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,2015:161-162.

[2] SHI Z, CHEN Y L, CHEN Y S, et al. *Flora of China*. volume 20-21 [M]. Beijing: Science Press & Missouri Botanical Garden Press (St. Louis), 2011:40.

[3] 赵青红, 郭兰萍, 黄璐琦, 等. 苍术挥发油成分变异及其与遗传变异的关系[J]. 资源科学, 2008, 30(5): 765-769.

[4] 邓爱平, 李颖, 吴志涛, 等. 苍术化学成分和药理的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3904-3913.

[5] 郭兰萍, 黄璐琦, 阎洪, 等. 基于地理信息系统的苍术道地药材气候生态特征研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 565-569.

[6] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物DNA条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 方海兰, 夏从龙, 段宝忠, 等. 基于DNA条形码的中药材种子种苗鉴定研究——以重楼为例[J]. 中药材, 2016, 39(5): 986-990.

[10] 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.

[11] Group C P W, Hollingsworth P M, Forrest L L, et al. A DNA barcode for land plants[J]. P Natl Acad Sci USA, 2009, 106(31): 12794-12797.

[12] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8 S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene, 2009, 430(1): 50-57.

[13] Edgar R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(5): 1792-1797.

[14] Swofford D L. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)* [M]. version 4. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002: 27.

[15] 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.

[16] 郭巧生. 中国药用植物种子原色图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 372-373.

[17] 陈靓, 吴亚男, 单会娇, 等. 五味子与南五味子药材的DNA条形码鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 66-71.

[18] 王凤云, 蒋颖诗, 赖小平. 基于ND2基因序列的燕窝DNA条形码鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13): 36-40.

[19] 崔红艳, 周海, 胡发龙, 等. 陇西中药材种子种苗市场现状及其发展对策[J]. 中国现代中药, 2014, 16(10): 848-851.

[20] 姚慧娟, 姚慧敏, 卜书红, 等. 朝鲜苍术挥发油成分GC-MS分析[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(3): 148-151.

[责任编辑 刘德文]