

黄芩及其同属近缘种的 DNA 条形码鉴定研究

夏至, 冯翠元, 高致明*, 李贺敏, 张红瑞

河南农业大学农学院 中药材工程技术研究中心, 河南 郑州 450002

摘要: 目的 利用 DNA 条形码鉴定技术, 快速、准确地鉴别黄芩及其同属近缘种(易混品)。方法 提取黄芩及其同属近缘种的 DNA, 对 ITS 和 *psbA-trnH* 序列扩增和测序, 计算物种内种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离。采用相似性搜索法、最近距离法、构建 Neighbor-joining (NJ) 系统聚类树等方法进行鉴定分析。结果 黄芩及其同属近缘种间的 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的遗传距离为 0.067 97~0.088 80 和 0.050 61~0.057 37, 明显大于黄芩种内的遗传距离 0~0.006 40 和 0~0.003 11。ITS 和 *psbA-trnH* 分子系统树显示, 黄芩 8 个居群个体均聚为一单系分支, 支持率均为 100%, 与其 5 个同属近缘种很好地区分开。3 种鉴定方法表明, ITS 和 *psbA-trnH* 序列适合鉴别黄芩及其同属近缘种。结论 ITS 和 *psbA-trnH* 序列可以有效准确鉴别中药材黄芩及其近缘种。

关键词: DNA 条形码; ITS; *psbA-trnH*; 黄芩; 同属近缘种; 鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)01-0107-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.021

Authentication of DNA barcoding of *Scutellaria baicalensis* and its related species

XIA Zhi, Feng Cui-yuan, GAO Zhi-ming, LI He-min, ZHANG Hong-rui

Engineering Technology Research Center for Chinese Medicine of Agronomy College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: **Objective** To fastly and accurately authenticate *Scutellaria baicalensis* and its closely related species using DNA barcoding technique. **Methods** Total genomic DNA was isolated from *S. baicalensis* and its related species. Nuclear DNA ITS and chloroplast gene *psbA-trnH* sequences were amplified and sequenced. The Kimura 2-parameter (K2P) distances were calculated. Identification analyses were performed using BLAST1, nearest distance, and Neighbor-joining (NJ) methods. **Results** The genetic distances of ITS and *psbA-trnH* between *S. baicalensis* and its closely related species were (0.067 97—0.088 80) and (0.050 61—0.057 37), which were obviously higher than those in the intra-species of *S. baicalensis* (0—0.006 40) and (0—0.003 11). The NJ tree of ITS and *psbA-trnH* indicated that the eight geographical populations of *S. baicalensis* formed a monophyletic clade [bootstrap (BS) = 100%]. All the three methods showed that ITS and *psbA-trnH* could discriminate *S. baicalensis* from its closely related species correctly. **Conclusion** ITS and *psbA-trnH* are two efficient barcodes for the authentication of *S. baicalensis* and its related species.

Key words: DNA barcoding; ITS; *psbA-trnH*; *Scutellaria baicalensis* Georgi; related species; authentication

中药材黄芩为唇形科 (Lamiaceae) 黄芩属 *Scutellaria* Linn. 黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的根, 作为国家三级保护野生药材物种, 黄芩药用历史悠久^[1]。《中国药典》2010 年版中黄芩入药部位以根为主, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效, 用于湿温、暑湿、胸闷呕恶、泻痢、黄

疸、肺热咳嗽、胎动不安等^[2]。黄芩属内药用植物种类十分丰富, 在我国分布有 102 种^[3], 除黄芩药用外, 《中国药典》2010 年版收录的黄芩属药用植物还有半枝莲 *S. barbata* D. Don.。此外, 在我国不同地区, 一些黄芩同属的植物也作为黄芩入药。据《中国中药资源志要》记载, 黄芩属能作药用的植物

收稿日期: 2013-05-30

基金项目: 科技部国家星火计划项目 (2012GA750004); 国家自然科学基金面上项目 (31070171, 31270236)

作者简介: 夏至 (1974—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为中药资源及分子鉴定。

Tel/Fax: (0371)63554995 E-mail: xiazhiemail@126.com

*通信作者 高致明, 教授, 主要从事中药资源的规范化种植研究。E-mail: gaozhiming672@sohu.com

网络出版时间: 2013-12-24 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.html>

种类多达43种,如韩信草 *S. indica* L.、甘肃黄芩 *S. rehderiana* Diels 等^[4]。黄芩属植物在我国南北方均有分布,生态适应幅度大,导致该属植物在形态上产生很多变异^[3],栽培和野生黄芩广泛分布于我国西北、东北、华北北部和内蒙古草原东部,种内的遗传变异十分显著,不同种源的黄芩在外观形态上有较大差异^[5],形态鉴别困难,影响中医临床用药安全。目前,黄芩分子鉴定主要集中于黄芩种下栽培类型间的鉴定^[6],与其同属近缘种类(易混品)DNA条形码分子鉴定研究鲜见报道。

中药材的准确鉴定是研究中药材质量和中药安全应用的前提和保障,一直备受关注。国内已经形成中药材四大传统鉴定方法,基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定。但这些传统鉴定方法均有其自身的缺点,基原鉴定和性状鉴定难以区分形态性状相似的近缘种,且药用植物形态性状易受地理生态环境、生长期等因素影响,从而影响鉴定结果的准确性;理化鉴定中的活性成分易受其生理条件、采收时间等因素的影响,同时对化学成分相似的物种也较难区分。近年来,随着分子生物学的快速发展,DNA条形码技术(DNA barcoding)为中药材物种鉴定研究提供了方便快捷的方法。DNA条形码技术是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段对物种进行快速、准确的自动鉴定^[7]。与传统鉴定方法的理论基础不同,DNA条形码技术基于物种基因型的差异,而不是基于环境密切相关的表现型,克服了传统鉴定方法的诸多缺陷,具有鉴定结果准确、可重复性良好、方法通用性强等优点。目前,药用植物的DNA条形码鉴定研究得到快速发展,广泛应用于多个科属药用植物及中药材的鉴定^[8-13]。植物核糖体DNA中的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)和叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段作为国际通用条形码序列,在种间及种下居群间具有进化速率快,变异程度高、区分物种能力强的特点,适用于药用植物与其近缘种类等较低分类阶元的分子鉴定^[13-17]。本研究选用核基因 ITS 片段叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段,通过对黄芩及其同属近缘种6个物种20份个体进行基因片段扩增、测序、并应用DNA条形码技术进行分析,为黄芩药材的准确鉴定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料的收集包括黄芩属6个种,黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi、半枝莲 *S. barbata* D. Don、莠状黄芩 *S. caryopteroides* Hand.-Mazz.、京黄芩 *S. peginensis* Maxim.、韩信草 *S. indica* L. 和异色黄芩 *S. discolor* Wall. ex Benth., 采自河南、河北、江苏、广西等地。由河南农业大学农学院中药材系高致明教授鉴定,凭证标本保存于河南农业大学。采集植物新鲜叶片,经硅胶快速干燥后保存于-80℃冰箱,实验材料详细信息和 GenBank 下载序列信息,见表1。

1.2 方法

1.2.1 样品DNA的提取、扩增和测序 采用北京天根生化植物DNA提取试剂盒提取样品DNA, ITS 序列扩增使用 Wendel 等^[18]设计的引物 ITS1 (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); *psbA-trnH* 序列扩增使用DNA条形码通用引物^[10], 引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR反应条件及扩增程序参考 Xia 等^[19]和 Chen 等^[9]的研究。PCR产物纯化后,用ABI 3730X 测序仪(Applied Biosystems Co., 美国)进行双向测序,测序结果在 GenBank 注册序列号为 KC535508 KC535539,见表1。

1.2.2 数据处理 测序所得的峰图采用 CodonCode Aligner V3.0 软件(CodonCode Co., 美国)对序列峰图进行校对拼接,去除引物区和低质量的序列,利用软件 PAUP* version 4.0b10 计算物种种内种间 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。利用相似性搜索法(BLAST1)、最近距离法(nearest distance)等方法对药材黄芩及其同属近缘种进行鉴定分析。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列信息、序列种内及种间变异分析

黄芩与其同属的近缘种16份样本ITS序列的PCR及测序成功率均为100%。6个物种的ITS序列长度变异较大为594~629 bp,黄芩的ITS序列最长为629 bp,异色黄芩最短为594 bp,其中ITS1序列长度为201~239 bp, 5.8 S 为158 bp, ITS2 序列长度为220~242 bp。6个物种在ITS1区域有43个碱

表 1 样品来源
Table 1 Sources of samples

编号	样品	来源	GenBank 号	
			ITS	<i>psbA-trnH</i>
内类群				
A1	黄芩 <i>S. baicalensis</i>	河南郑州	KC535524	KC535508
A2	黄芩	河北巨鹿	KC535525	KC535509
A3	黄芩	江苏南京	KC535526	KC535510
A4	黄芩	广西南宁	KC535527	KC535511
A5	黄芩	北京	KC535528	KC535512
A6	黄芩	GenBank	AY394651	JF907428
A7	黄芩	GenBank	AB557 593	GQ374140
A8	黄芩	GenBank	FJ609732	HQ680366
B1	半枝莲 <i>S. barbata</i>	河南郑州	KC535529	KC535513
B2	半枝莲	江苏南京	KC535530	KC535514
B3	半枝莲	广西南宁	KC535531	KC535515
B4	半枝莲	GenBank	DQ813302	JQ339248
C1	韩信草 <i>S. indica</i>	河南禹州	KC535532	KC535516
C2	韩信草	河南洛宁	KC535533	KC535517
D1	京黄芩 <i>S. pekinensis</i>	河南卢氏	KC535534	KC535518
D2	京黄芩	河南栾川	KC535535	KC535519
E1	莠状黄芩 <i>S. caryopteroides</i>	河南卢氏	KC535536	KC535520
E2	莠状黄芩	河南栾川	KC535537	KC535521
F1	异色黄芩 <i>S. discolor</i>	广西南宁	KC535538	KC535522
F2	异色黄芩	广西环江	KC535539	KC535523
外类群				
G	薰衣草属 <i>Lavandula</i> Linn.	GenBank	FJ593399	HQ902866

基的插入和缺失,对比黄芩,半枝莲、异色黄芩和莠状黄芩 3 个物种在 ITS1 区域 52 bp 处有一大片段缺失 39 个碱基。在 5.8 S 区域,6 个物种序列完全一致。在 ITS2 区域,6 个物种有 22 个碱基的插入和缺失,对比黄芩,韩信草和京黄芩 2 个物种在 ITS2 区域 435、457、604 bp 处分别有 4、3、4 个碱基的缺失。黄芩的 8 个居群的 ITS 序列长度为 628~629 bp,居群间有 5 个碱基位点的变异。ITS 序列种内种间 K2P 遗传距离结果显示,黄芩与其同属近缘种类种间的遗传距离为 0.067 97~0.088 80,明显大于黄芩种内不同样本间的遗传距离 0~0.006 40(表 2)。因此,核基因 ITS 序列可以用作黄芩与其同属近缘种类(易混品)的分子鉴定。

2.2 *psbA-trnH* 序列信息、序列种内及种间变异分析

黄芩与其同属的近缘种 16 份样本 *psbA-trnH* 序

列的 PCR 及测序成功率均为 100%。6 个物种的 *psbA-trnH* 序列长度变异较大为 313~327 bp,京黄芩的 ITS 序列最长为 327 bp,异色黄芩最短为 312 bp。6 个物种 *psbA-trnH* 序列有 27 个碱基的插入和缺失,对比黄芩,及其同属的近缘 5 个种在 *psbA-trnH* 序列 192 bp 处均有 10 个碱基的缺失,异色黄芩还在 150 bp 处有 4 个碱基的缺失,京黄芩在 264 bp 处有 9 个碱基的插入。黄芩的 8 个居群的 *psbA-trnH* 序列长度为 315~316 bp,居群间有 3 个碱基位点的变异。*psbA-trnH* 序列种内种间 K2P 遗传距离结果显示,黄芩与其同属近缘种类种间的遗传距离为 0.050 61~0.057 37,明显大于黄芩种内不同样本间的遗传距离 0~0.003 11(表 2)。因此,叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列可以用作黄芩与其同属近缘种的分子鉴定。

表 2 基于 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的黄芩及其近缘种的 K2P 遗传距离Table 2 K2P genetic distances of *S. baicalensis* and its closely related species based on ITS and *psbA-trnH* sequences

编号	样品	K2P 遗传距离	
		ITS	<i>psbA-trnH</i>
A1	黄芩 <i>S. baicalensis</i>	0	0
A2	黄芩	0	0
A3	黄芩	0	0
A4	黄芩	0	0
A5	黄芩	0	0.002 75
A6	黄芩	0.006 40	0
A7	黄芩	0	0.002 75
A8	黄芩	0	0.003 11
B1	半枝莲 <i>S. barbata</i>	0.082 92	0.053 93
B2	半枝莲	0.082 92	0.053 93
B3	半枝莲	0.082 92	0.053 93
B4	半枝莲	0.088 80	0.056 34
C1	韩信草 <i>S. indica</i>	0.067 97	0.051 13
C2	韩信草	0.067 97	0.051 13
D1	京黄芩 <i>S. pekinensis</i>	0.075 44	0.050 61
D2	京黄芩	0.075 44	0.050 61
E1	蕈状黄芩 <i>S. caryopteroides</i>	0.080 13	0.056 62
E2	蕈状黄芩	0.080 13	0.056 62
F1	异色黄芩 <i>S. discolor</i>	0.087 43	0.057 37
F2	异色黄芩	0.087 43	0.057 37

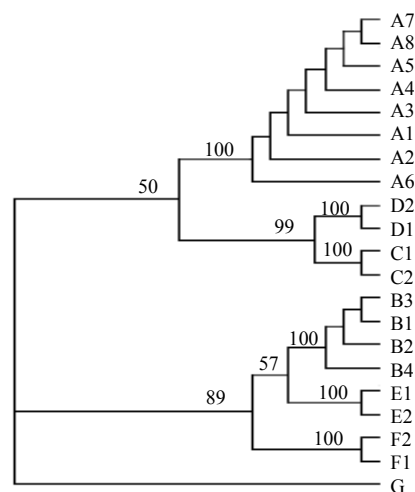
K2P 遗传距离是指每一个物种与黄芩 (KC535524) (KC535508) 之间的遗传距离

K2P genetic distance means the genetic distance between one species and both *S. baicalensis* KC535524 and KC535508

2.3 黄芩与其同属近缘种 (易混品) NJ 树的鉴定

本实验应用 PAUP* version 4.0b10 构建黄芩与其同属近缘种 (易混品) 的 ITS、*psbA-trnH* 序列的 NJ 系统发育树 (图 1、2)。外类群选择根据《中国植物志》研究, 选取与黄芩属近缘的薰衣草属。从 NJ 树可以看出, ITS 序列构建的分子系统树 (图 1), 黄芩的 8 个居群样本聚为一单系分支, 具有 100% 支持率, 半枝莲的 4 个居群样本也聚为一单系分支, 具有 100% 支持率, 其余 4 个物种的各自 2 个居群都聚为一单系分支, 具有较高支持率。依据 ITS 序列构建的分子系统树可将黄芩与其同属近缘种很好地区分开。系统发育关系显示, 黄芩与京黄芩、韩信草聚为一单系分支, 亲缘关系较近, 但支持率较低 50%; 异色黄芩、蕈状黄芩和半枝莲聚为一单系分支, 亲缘关系较近, 支持率为 89%。

psbA-trnH 分子系统树 (图 2), 黄芩 8 个居群样本聚为一单系分支, 具有 100% 支持率, 半枝莲的 4 个居群样本也聚为一单系分支, 具有 75% 支持



分支上部数值表示 NJ 分析对该分支的支持强度 (≥50%)

BS values of NJ (≥50%) were shown above branches, same as below

图 1 基于 NJ 法 (ITS 数据) 构建系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on NJ methods (ITS data)

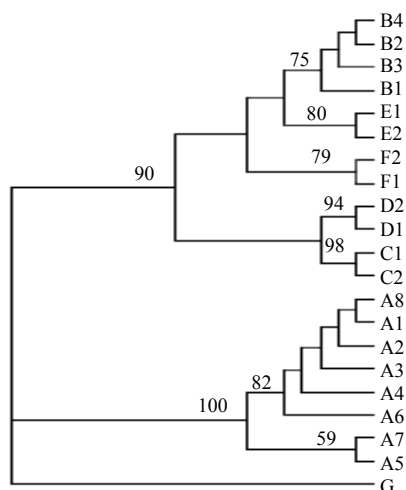


图 2 基于 NJ 法 (*psbA-trnH* 数据) 构建系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on NJ methods (*psbA-trnH* data)

率, 其余 4 个物种的各自 2 个居群都聚为一单系分支, 具有较高支持率。依据 *psbA-trnH* 序列构建的分子系统树可将黄芩与其同属近缘种 (易混品) 很好地区分开。系统发育关系显示, 黄芩 8 个居群单独聚为一支, 京黄芩、韩信草、异色黄芩、莠状黄芩和半枝莲聚为一单系分支, 支持率为 90%。

3 讨论

黄芩系大宗中药材品种, 已有 2 000 多年的药用历史, 除饮片直接用于临床外, 大量用作中成药原料, 根据《全国中成药产品目录》第 1 部统计资料显示, 70% 的中成药都含有黄芩^[20]。然而, 由于黄芩属药用植物种类众多, 多个地区出现药用黄芩的近缘种类替代用药, 导致黄芩临床用药存在不安全因素。本研究应用 DNA 条形码序列核基因 ITS 和叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列对黄芩及其同属近缘种 6 个物种 (20 份个体) 进行鉴定研究, 结果表明 ITS 和 *psbA-trnH* 序列在黄芩 8 个不同居群个体间均存在丰富的变异, 种内 K2P 遗传距离分别为 0~0.006 40 和 0~0.003 11。本研究支持张红瑞等^[6]利用 ISSR 分子标记对黄芩不同居群的遗传多样性进行分析的结果, 表明黄芩不同居群间遗传多样性丰富。对于黄芩与其 5 个同属近缘种之间, 本研究结果显示 ITS 和 *psbA-trnH* 序列差异较大, 其中黄芩与其 5 个同属近缘种之间 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的种间 K2P 遗传距离均远大于黄芩种内居群间 K2P 遗传距离 (表 2)。NJ 树聚类分析结果显示, 黄芩与其同属 5 个近缘种可以很好地区分开 (图 1、2)。因此, ITS 和 *psbA-trnH* 序列可以作为鉴定黄芩与其

同属 5 个近缘种 (易混品) 的条形码序列。

药用植物 DNA 条形码的分子鉴定是基于植物分子系统学发展起来的一门技术, 是区分药用植物正品与伪品的重要手段, DNA 条形码的分子鉴定不仅能准确鉴定中药材正品与伪品, 还能准确构建药用植物与其近缘种类的系统发育关系, 是开展药用植物亲缘学研究的基础和关键^[21]。本研究对黄芩与其同属 5 个近缘种的系统发育关系构建中发现, 在 ITS 分子系统树上, 黄芩与京黄芩和莠状黄芩构成的分支形成姐妹群关系, 支持率较低 (50%), 在 *psbA-trnH* 分子系统树上, 黄芩与其同属 5 个种类并未聚为一支。本研究结果进一步验证了 ITS 和 *psbA-trnH* 序列作为通用 DNA 条形码序列在黄芩属的鉴别能力, 对于实现中药材黄芩的快速准确鉴定具有重要意义。进一步在黄芩属扩大取样范围, 选取 ITS 和 *psbA-trnH* 序列及其他基因片段开展分子系统学, 准确构建黄芩属下系统发育框架, 从分子水平揭示黄芩属各种间的亲缘关系, 不仅可以为黄芩属药用植物的品种选育和引种栽培提供理论依据, 还可为研究药用黄芩种质资源的起源和进化提供参考。

志谢: 中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室系统发生与进化课题组提供本研究分子实验平台, 中国科学院植物研究所标本馆协助查阅标本。

参考文献

- [1] 杨全, 白音, 陈千良, 等. 黄芩资源现状及可持续发展的研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1159-1160.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 中国植物志编委会. 中国植物志 (第 65 卷, 第 2 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [4] 中国药材公司. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [5] 陈君, 杨世林, 程惠珍. 不同种源黄芩生长发育特性初步观察 [J]. 中药材, 2002, 25(11): 777-778.
- [6] 张红瑞, 马彦秋, 高致明, 等. 黄芩种质资源的 ISSR 分析 [J]. 河南农业大学学报, 2012, 46(4): 380-384.
- [7] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270: 313-321.
- [8] 夏至, 张红瑞, 李贺敏, 等. 碎米槿及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20):

- 2904-2909.
- [9] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5: e8613.
- [10] 刘美子, 宋经元, 罗焜, 等. DNA 条形码序列对 9 种蒿属药用植物的鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1393-1397.
- [11] Han J, Shi L C, Yao H, *et al.* Testing potential DNA barcoding regions in the Labiatae medicinal plants [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 407.
- [12] Han J P, Liu C, Li M H, *et al.* Relationship between DNA barcoding and chemical classification of salvia medicinal herbs [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 16-29.
- [13] 李妮, 陈士林, 刘义梅, 等. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1396-1401.
- [14] 于华会, 杨志玲, 杨旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 491-496.
- [15] 赵国平, 新关稔, 石川隆二, 等. 中日当归属药用植物 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1072-1076.
- [16] 夏至, 李贺敏, 张红瑞, 等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1027-1032.
- [17] Han J P, Song J Y, Liu C, *et al.* Identification of Cistanche species (Orobanchaceae) based on sequences of the plastid *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45: 126-130.
- [18] Wendel J F, Schnabel A S, Seelanan T. Bidirectional inter locus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 280-284.
- [19] Xia Z, Wang Y Z, Smith J F. Familial placement and relationships of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae sensu lato) inferred from five different gene regions [J]. *Am J Bot*, 2009, 96(2): 519-530.
- [20] 崔璐, 路俊仙, 林慧彬, 等. 我国黄芩资源及生产现状调查研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2259-2280.
- [21] 陈四保, 彭勇, 陈士林, 等. 中药资源可持续利用—药用植物亲缘学 [J]. 世界科学技术—中药现代化, 2005, 7(6): 97-103.