

畲药搁公扭根基原植物及其同属易混种的 ITS2 条形码鉴别

吕群丹¹, 方洁¹, 潘俊杰¹, 程文亮¹, 姜程曦^{2*}, 程科军^{1,2*}

1. 丽水市农业科学研究院, 浙江 丽水 323000

2. 温州大学生命与环境科学学院, 浙江 温州 325035

摘要:目的 基于 ITS2 条形码序列对畲药搁公扭根及其同属易混种进行分子鉴定, 以保证药材使用的正确性和临床疗效。方法 分别于浙江、广西、江西和安徽等地采集搁公扭根基原植物掌叶覆盆子及其 9 种同属易混种高粱泡、山莓、蓬蘽、茅莓、插田泡、寒莓、东南悬钩子、三花悬钩子和武夷悬钩子样品共 140 份。对采集样品进行基因组 DNA 提取、ITS2 基因片段 PCR 扩增并双向测序、拼接获得相应序列, 基于 HMMer 方法注释获取 ITS2 序列, 同时下载 GenBank 相应物种 ITS2 序列 37 条, 使用 Gene Tool 软件分析 ITS2 序列长度、GC 量、变异位点等情况, 利用 Clustal X 和 MEGA7.0 软件计算种内、种间遗传距离, 构建邻接 (NJ) 系统发育树。结果 搁公扭根及其 9 种同属易混种 ITS2 序列长度为 211~213 bp, GC 量为 52.1%~58.0%; 搁公扭根基原植物与其他物种共有 14 个变异位点, 一处插入/缺失; 搁公扭根种内平均 K2P 遗传距离为 0.007 2, 显著小于其他 9 个易混种, 其中与山莓和武夷悬钩子进化距离最近, 与蓬蘽最远; NJ 进化树中搁公扭根各单倍型序列单独聚为一支, 可与其他物种成功区分。结论 ITS2 序列能够成功鉴别搁公扭根基原植物及其 9 种同属易混种, 为畲药 DNA 条形码分子鉴别提供了有力佐证, 助力畲药流通信息监管。

关键词: 畲药; 搁公扭根; 掌叶覆盆子; ITS2; DNA 条形码鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)13-3102-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.022

Identification of traditional She medicine Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus* using ITS2 barcode

LV Qun-dan¹, FANG Jie¹, PAN Jun-jie¹, CHENG Wen-liang¹, JIANG Cheng-xi², CHENG Ke-jun^{1,2}

1. Lishui Institute of Agricultural Sciences, Lishui 323000, China

2. College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To discriminate traditional She medicine Gegongniugen (the root of *Rubus chingii* Hu) from its confusable species of genus *Rubus* based on ITS2 barcode, and to guarantee the medicine quality and clinical effect of Gegongniugen. **Methods** A total of 140 samples of *R. corchorifolius* L. f., *R. hirsutus* Thunb., *R. parvifolius* L., *R. coreanus* Miq., *R. buergeri* Miq., *R. tsangorum* Hand. -Mazz., *R. trianthus* Focke, *R. jiangxiensis* Z. X. Yu, W. T. Ji et H. Zheng were collected from Zhejiang, Guangxi, Jiangxi, and Anhui provinces. Genomic DNA was extracted from the collected samples, followed by ITS2 sequences amplification through PCR, bi-directional sequencing, assembly and annotation based on HMMer method. At the same time, 37 other sequences of corresponding species were downloaded from GenBank. Sequence characteristics such as lengths, GC contents, and variable sites were analyzed by Gene Tool software while genetic distance calculation and build-up of neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree were carried out through Clustal X and MEGA 7.0. **Results** The lengths of ITS2 sequences of Gegongniugen and its nine confusable species of genus *Rubus* ranged from 211 to 213 bp with GC content of 52.1%—58.0%; These ITS2 sequences had 14

收稿日期: 2018-04-21

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2012C12014-1); 丽水市科技项目 (2016RC12, 2015SJZC06)

作者简介: 吕群丹, 女, 博士, 副研究员, 主要从事中药鉴定、生理生化与基因功能等研究。E-mail: qdlv@zju.edu.cn

*通信作者 姜程曦 (1971—), 男, 博士, 研究员, 主要从事中药资源与质量管理研究。E-mail: jiangchengxi@126.com

程科军 (1981—), 男, 博士, 研究员, 主要从事中药和民族药的药效物质基础及资源利用研究。

Tel: (0578)2028385 E-mail: chengkejun@gmail.com

mutation sites and one insertion/deletion site; The average intra-specific K2P genetic distance of Gegongniugen was 0.007 2, which was significantly lower than the respective inter-specific K2P genetic distance between Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus*. The genetic distances between Gegongniugen and *R. corchorifolius* or Gegongniugen and *R. jiangxiensis* were minimum, while that between Gegongniugen and *R. hirsutus* was maximum. It was obvious in the N-J phylogenetic tree that the ITS2 sequences of Gegongniugen formed into one separate clade, which could be successfully distinguished other nine species.

Conclusion ITS2 sequence can be used as an effective DNA marker to discriminate the original plants of Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus*, which provided an important molecular evidence for the identification of traditional She medicines and contributed to the information supervision of traditional She medicine market.

Key words: traditional She medicine; Gegongniugen (the root of *Rubus chingii* Hu); *Rubus chingii* Hu; ITS2; DNA barcode identification

畲族是我国东南部的一个少数民族, 主要分布在福建、浙江、江西和广东的山区或半山区, 浙江省丽水市景宁畲族自治县是全国唯一的畲族自治县。畲医药是畲族民众在长期生产和生活实践中积累和探索创造的医药经验集成, 是祖国医学宝库的一个重要组成部分, 已被列入国家非物质文化遗产名录。畲族民间用药 90% 以上为植物药, 搯公扭根(又名为上树搯公扭、山狗公、搯工、搯公扭、公公扭等)基原植物为蔷薇科(*Rosaceae*)悬钩子属植物掌叶覆盆子 *Rubus chingii* Hu (又名华东覆盆子), 为最常用的畲药品种之一, 目前收录于《浙江省中药炮制规范》2015 年版中^[1]。虽然畲药搯公扭根与中药覆盆子的基原植物相同, 但两者用药部位和功效差异明显: 搯公扭根的药用部位为根, 用于治疗牙痛、风湿痹痛、目翳、呕逆等; 覆盆子则以果实作为药用部位, 功能主治为补肝肾、助阳、固精、明目等^[1-4]。

掌叶覆盆子主要分布于我国的华东地区, 浙江为主产区。掌叶覆盆子与其同属植物地上部分形态非常接近, 尤其果实极易混淆, 易混种主要有蓬蘽、高粱泡、寒莓、茅莓和插田泡等, 借助传统形态鉴别方法非常困难。掌叶覆盆子与其同属易混种多混生于中低海拔的林缘、山坡、灌丛、路边和沟边等土壤较湿润等生境, 导致在生产和临床应用中误采、误用、混用易混种现象时有发生。目前关于掌叶覆盆子的研究多集中在化学成分、药理作用等方面, 对其物种的鉴定方面研究甚少, 仅见研究人员于 20 世纪末对覆盆子及其市场上常见的混伪品如山莓、茅莓、插田泡的果实外形、组织构造、粉末显微进行了性状特征的传统鉴别^[5-9]。传统鉴别方法对专业学术知识要求高, 需具备大量的形态学鉴定的经验, 易受主观因素影响, 具有局限性。搯公扭根的药用部分为根, 与果实相比, 掌叶覆盆子根与其易混种相似性更高, 更难通过传统鉴别方法进行

准确区分。迄今为止还未有通过传统鉴别方法对掌叶覆盆子及其混淆品根部进行鉴别的文献报道。为保证常用畲药搯公扭根用药的安全性、有效性和适应现代科学研究的需求, 亟需一种客观、简便、高效的现代化鉴定技术进行快速准确鉴定。

DNA 条形码技术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, 是传统形态鉴别方法的辅助手段和有效补充^[10]。DNA 条形码鉴定技术具有简便、高效、准确性高、重复性好、样品需求量少、易于推广等诸多优势, 近年来已在多种中药材及其基原植物的鉴定中得到印证和应用^[11-17]。“中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则”也已收载入《中国药典》2015 年版中作为中药材质量控制的补充方法^[4]。相对于传统中药, 畲药 DNA 条形码分子鉴定工作起步相对较晚, 目前只对“畲药第一味”——食凉茶的基原植物及其近缘易混种开展了相关工作^[18]。ITS2 条形码序列在物种水平上突变位点多, 具有较高的区分度, 且片段较短易于扩增, 为中药材 DNA 条形码分子鉴定体系的核心序列^[10]。本研究将利用 ITS2 条形码序列对搯公扭根基原植物及其常见同属混伪品进行分子鉴别。

1 材料

本研究采集了浙江、江苏、福建、安徽等多个省份搯公扭根基原植物掌叶覆盆子及其混伪品高粱泡 *R. lambertianus* Ser.、山莓 *R. corchorifolius* L. f.、蓬蘽 *R. hirsutus* Thunb.、茅莓 *R. parvifolius* L.、插田泡 *R. coreanus* Miq.、寒莓 *R. buergeri* Miq.、东南悬钩子 *R. tsangorum* Hand. -Mazz.、三花悬钩子 *R. trianthus* Focke 和武夷悬钩子 *R. jiangxiensis* Z. X. Yu, W. T. Ji et H. Zheng^[19] 10 个物种的野生植物资源样本共 140 份, 其中高粱泡、山莓、蓬蘽、茅莓、寒莓为常用畲药品种, 其畲药名分别为寒扭(或冬泡)、三月扭、牛乳扭、山

桃旦根、和落坭泡 (表 1)。采集的植物样本经丽水市食品药品与质量技术监督局主任中药师李水福鉴定为相应物种。本研究同时从 GenBank 数据库下载掌叶覆盆子、高粱泡等 7 个物种的 ITS2 序

列共 37 条 (表 1)。下载的 GenBank 序列均通过 DNA 条形码鉴定网站 (www.tcmbarcode.cn) 进行验证^[20], 验证后不符合相应物种信息的 GenBank 序列不取用。

表 1 搁公扭根及其同属易混种样品信息

Table 1 Sample information of original specie of Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus*

植物名称	兽药名称	序列数*	样本号 (GenBank 登录号)	来源
掌叶覆盆子	搁公扭根、上树搁公扭、山狗公	30 (29+1)	Rch1~Rch29 (GQ434662)	浙江丽水莲都、青田、松阳、景宁、东阳、龙游、开化、淳安, 江西婺源、德兴, 福建寿宁, GenBank
高粱泡	寒扭、冬泡	22 (15+7)	Rl1~Rl15 (EF034132、FJ472904~472905、KU881112~881115)	浙江莲都、青田、松阳、景宁、云和、龙游、开化、泰顺, 安徽休宁, GenBank
山莓	三月扭	16 (15+1)	Rco1~Rco15 (AY083360)	浙江莲都、青田、松阳、景宁、云和、庆元、开化、泰顺, 安徽休宁, 江西婺源, 广西阳朔, GenBank
蓬蘽	牛乳扭	17 (15+2)	Rh1~Rh15 (KU881092、FJ472891)	浙江莲都、青田、松阳、景宁、云和、庆元、开化、泰顺, 安徽休宁, 江西婺源, GenBank
茅莓	山桃旦根	40 (16+24)	Rpl1~Rpl16 (FJ472921、KP241742~241748、KP241750~241761、KU881131~881134)	浙江莲都、青田、松阳、景宁、云和、庆元、龙游, 安徽休宁, 江西婺源, 广西阳朔, GenBank
插田泡	—	11 (10+1)	Rc1~Rc10 (JF980336)	浙江莲都、青田、松阳、龙游, 江西婺源, GenBank
寒莓	落坭泡	10	Rb1~Rb10	浙江莲都、青田、庆元、龙游, 江西婺源
东南悬钩子	—	11 (10+1)	Rts1~Rts10 (KU881192)	浙江莲都、松阳、云和、景宁、开化, 安徽休宁, GenBank
三花悬钩子	—	10	Rtr1~Rtr10	浙江莲都、青田、景宁、龙游, 安徽休宁
武夷悬钩子	无	10	Rj1~Rj10	浙江莲都、松阳、云和、景宁、龙游, 安徽休宁

*表示该物种所获取的序列总数, 括号内 “+” 号前的数字表示从采集样品中 PCR 扩增并测序分析后获得的序列数目, “+” 号后的数字表示从 GenBank 下载的序列数目

*Bold-font numbers in this column (i.e. sequence No.) mean total numbers of obtained sequences of corresponding plant species respectively, numbers before “+” in parentheses mean numbers of sequences obtained through PCR amplification from collected samples of corresponding plant species followed by sequencing and further analyses and the numbers behind “+” in parentheses mean number of sequences corresponding plant species downloaded from GenBank

2 方法

2.1 DNA 提取、PCR 扩增和测序

将搁公扭根及其同属易混种样品用变色硅胶干燥, 取搁公扭根约 30 mg, 用研磨仪 (Retsch MM400, 德国) 研磨 1.5 min (30 次/s) 后用植物 DNA 提取试剂盒 (天根, 中国) 提取总 DNA, 65 °C 水浴 1 h, 其余步骤按照试剂盒说明书进行。ITS2 通用引物 ITS2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTG-AAT-3' 和 ITS3R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTAC-AAT-3'。反应体系为 2×PCR Buffer for KOD FX 25 μL、2 mmol/L dNTPs 5 μL, 正、反向引物 (1.5 pmol/L) 各 1.5 μL、总 DNA 1 μL (30 ng), 其余用

ddH₂O 补至 50 μL。反应条件为 94 °C、2 min; 98 °C、10 s, 56 °C、30 s, 68 °C、45 s, 40 个循环; 68 °C 10 min。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看 PCR 扩增情况, 割取阳性条带, 使用凝胶回收试剂盒 (QIAGEN, 德国) 回收后送样至测序公司 (铂尚有限公司, 上海) 进行双向测序。

2.2 序列分析和处理

应用 CodonCode Aligner V 6.0.2 软件对测序峰图进行校对拼接。得到的全长序列于 ITS2 数据库网站^[21] (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) 通过 HMMer 方法进行注释, 切除两端的 5.8 S 和 28 S 区段得到 ITS2 间隔区序列。采用软件

MEGA^[22] (molecular evolutionary genetics analysis) 7.0 对各 ITS2 序列进行分析,并基于 K2P 模型进行遗传距离等分析,用邻接 (NJ) 法构建系统聚类树,利用 Bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。各物种或各物种主导单倍型 ITS2 序列二维结构通过 ITS2 数据库网站^[21]进行分析获取。各 ITS2 序列的二维码通过基于开源代码 PHP QR Code 的编码方式将各 DNA 条形码序列和其相应物种拉丁名进行编码转换而成,二维码图片可运用各种不同移动终端的二维码扫描软件进行识读^[10,23]。

3 结果与分析

3.1 搁公扭根及其同属易混种 ITS2 条形码序列特征分析

本研究获取了搁公扭根基原植物及其易混种包括高粱泡、山莓、蓬蘽、茅莓、插田泡 10 种悬钩子属植物共 177 条序列,其中 141 条通过从采集的样品 PCR 及测序分析获得,46 条通过 GenBank 数据库下载获得,并对所获取的序列长度、GC 含量、变异位点等情况进行了分析。分析结果表明上述 ITS2 序列长度为 211~213 bp, GC 含量为 52.1%~58.0%;除了插田泡、东南悬钩子、三花悬钩子和武夷悬钩 4 个物种的 ITS2 序列只有 1 个单倍型 (分别为 F1、H1、I1 和 J1) 外,其余物种均具有多个单倍型,其中掌叶覆盆子最多,为 4 个单倍型 (A1~A4),高粱泡、茅莓和寒莓次之,有 3 个单倍型 (B1~B3、E1~E3 和 G1~G3),山莓和蓬蘽均为 2 种单倍型即 C1、C2 和 D1、D2。

其中,搁公扭根共 30 条 ITS2 序列,主导单倍型 A1 类型序列共有 20 条,占所有序列的 66.7%。搁公扭根与其他 9 个易混种共有 14 个变异位点,一处插入/缺失。其中搁公扭根 4 个单倍型中有 2 个变异位点,分别为 150 位点 T-G/A 变异和 206 位点 T-A 变异;有一处插入/缺失,具体为 11 位点缺失了碱基 C。其余 9 个物种 ITS2 序列长度、GC 含量、具体变异位点及变异情况等序列特征见表 2 和图 1。

3.2 搁公扭根及其同属易混种 ITS2 条形码序列进化关系分析

为进一步分析搁公扭根基原植物及其同属易混种 ITS2 序列之间的差异,本研究运用 MEGA 软件对所有获取的序列进行了 K2P 进化距离和聚类分析。分析结果表明搁公扭根种内 K2P 遗传距离为 0.005 0~0.010 0 (平均距离为 0.007 2),与高粱泡、山莓、蓬蘽、插田泡、寒莓、东南悬钩子、三花悬钩子和武夷悬钩子的种间距离分别为 0.034 0~0.055 0 (平均距离 0.044 4)、0.010 0~0.019 0 (平均距离 0.014 4)、0.076 0~0.098 0 (平均距离 0.087 0)、0.040 0~0.050 0 (平均距离 0.048 0)、0.029 0~0.044 0 (平均距离 0.035 9)、0.034 0~0.044 0 (平均距离 0.039 3)、0.039 0~0.049 0 (平均距离 0.044 4) 和 0.010 0~0.019 0 (平均距离 0.014 5),均显著大于搁公扭根的种内距离,表明 ITS2 序列可以成功鉴别搁公扭根及其同源易混种。进化距离分析结果也表明搁公扭根与山莓和武夷悬钩子进化距离最近,与蓬蘽最远 (表 3)。NJ 进化树中

表 2 搁公扭根基原植物及其同属易混种 ITS2 序列特征

Table 2 Sequence characteristics of original specie of Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus*

物种 (单倍型类型)	序列长度/bp	平均 GC 含量/%	变异位点	插入/缺失
掌叶覆盆子 (A1~A4)	211~212	56.68	2	1
高粱泡 (B1~B3)	212	57.83	2	0
山莓 (C1~C2)	211~212	55.60	0	1
蓬蘽 (D1~D2)	211~212	52.60	3	0
茅莓 (E1~E3)	211~212	57.53	2	0
插田泡 (F1)	211	57.30	—	—
寒莓 (G1~G3)	212	56.93	2	0
东南悬钩子 (H1)	213	56.80	—	—
三花悬钩子 (I1)	211	54.50	—	—
武夷悬钩子 (J1)	212	56.60	—	—

	1111111111 1111111111 12222
	11224556679 0011245555 6777888899 90000
	89265397827 8949170157 6137156923 81457
掌叶覆盆子 (A1)	-CCCGGCCTAC ACTACAATCC CGTCCACTCG GGGCT
掌叶覆盆子 (A2)	-..... ..A
掌叶覆盆子 (A3)	-..... ..G.. ..A
掌叶覆盆子 (A4)	--..... ..A.. ..
高粱泡 (B1)	-A.....C.. ..C...G... ..A.G.CT.
高粱泡 (B2)	-A...C..C.. ..C..GG... ..A.G.CT.
高粱泡 (B3)	-A.....C.. ..C..GG... ..A.G.CT.
山莓 (C2)	--T..... ..T... ..
山莓 (C1)	-.T..... ..T... ..
蓬蘽 (D1)	--.TA.TT..T CTC.T.G.TT TACTA....C
蓬蘽 (D2)	--.TA.TT..T CTC.T.G.TT .ACTG..... ..
茅莓 (E1)	-.....C.. ..C...G... ..T.GTCT.
茅莓 (E2)	--.....TC.. ..CC..G... ..T.GTCT.
茅莓 (E3)	--.....C.. ..C...G... ..T.GTCT.
插田泡 (F1)	--..A...C.. ..C...G... ..T.G.CT.
寒莓 (G1)	-A..... ..C...G.T.G.CT. .C...
寒莓 (G2)	-A..... ..C...G.T.G.CT. CC...
寒莓 (G3)	-A..... ..C...G.T.G.CT. .A...
东南悬钩子 (H1)	CA..... ..C...G.T.G.CT. ..CT.
三花悬钩子 (H)	--.....T. ..C.T.G.YT .A..... ..AT.
武夷悬钩子 (J1)	-..... ..CC...

植物名后为各物种单倍型编号; “—” 表示与掌叶覆盆子主导单倍型 A1 相同的碱基

Numbers of sequence haplotypes were listed behind latin names of corresponding species; “—” mean bases identical to dominant haplotype of *Gegongniugen* in same sites

图 1 搁公扭根基原植物及其同属易混种 ITS2 序列比对结果

Fig. 1 Sequence alignment of original specie of *Gegongniugen* and its confusable species of genus *Rubus*

搁公扭根各单倍型序列单独聚为一支, 且与山莓和武夷悬钩子位于同一大分支中, 表明搁公扭根与两者具有较近的亲缘关系, 验证了 K2P 进化距离分析结果 (图 2)。进化距离分析还显示出搁公扭根之外其余 9 个物种的种内距离也显著小于各自物种与其他物种的种间距离 (表 3), 可见, ITS2 可用于鉴别搁公扭根及其同属易混种。山莓、武夷悬钩子的叶片、花、果实等器官与掌叶覆盆子最相近, 分析结果表明三者进化关系最近; 而蓬蘽为复叶, 与单叶的掌叶覆盆子差别较大, 相对容易区分, 分析结果显示两者进化关系最远, 表明本研究的进化距离等分析结果与传统分类学结果基本一致。可见 ITS2 序列应用范围不仅局限于

区分搁公扭根及其同属易混种, 还可用于悬钩子属的分类研究。

3.3 搁公扭根及其同属易混种 ITS2 条形码序列二维码分析

基于中国中医科学院中药研究所陈士林团队编写的程序将本研究各物种主导单倍型 ITS2 序列转换为彩色条形码图片 (图 3), 以不同颜色分别表示不同核苷酸, 条形码上所标数字表示碱基序列长度, 并基于开源代码 PHP QR Code 的编码方式将各物种拉丁名和 ITS2 序列进行编码, 获得各物种二维 DNA 条形码图片 (图 3) [10,23]。右侧的二维码图片可以通过不同的移动终端 (如安卓手机、iPhone) 的多种二维码扫描软件识读其中所含信息,

表 3 搁公扭根基原植物及其同属易混种内及种间 K2P 距离

Table 3 Intra-and inter-specific K2P distance of original specie of Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus*

物种	掌叶覆盆子(A1~A4)	高粱泡 (B1~B3)	山莓 (C1~C2)	蓬蘽 (D1~D2)	茅莓 (E1~E3)	插田泡 (F1)	寒莓 (G1~G3)	东南悬钩子 (H1)	三花悬钩子 (H)	武夷悬钩子 (J1)
掌叶覆盆子 (A1~A4)	0.005~0.010 (0.007 2)									
高粱泡 (B1~B3)	0.034~0.055 (0.044 4)	0.005~0.010 (0.006 4)								
山莓 (C1~C2)	0.010~0.019 (0.014 4)	0.045~0.055 (0.049 8)	0.000 0							
蓬蘽 (D1~D2)	0.076~0.098 (0.087 0)	0.087~0.109 (0.098 1)	0.087~0.098 (0.092 9)	0.014 4						
茅莓 (E1~E3)	0.040~0.060 (0.048 0)	0.010~0.029 (0.017 7)	0.040~0.050 (0.043 0)	0.087~0.098 (0.092 8)	0.000~0.010 (0.060 4)					
插田泡 (F1)	0.040~0.050 (0.044 6)	0.010~0.019 (0.014 4)	0.050~0.050 (0.050 0)	0.076~0.087 (0.081 7)	0.010~0.019 (0.012 9)	0.000 0				
寒莓 (G1~G3)	0.029~0.044 (0.035 9)	0.014~0.029 (0.021 0)	0.039~0.044 (0.041 2)	0.087~0.103 (0.094 5)	0.019~0.034 (0.024 3)	0.019~0.024 (0.021 0)	0.005~0.010 (0.006 4)			
东南悬钩子 (H1)	0.034~0.044 (0.039 3)	0.019~0.029 (0.024 2)	0.045~0.045 (0.044 6)	0.093~0.104 (0.098 2)	0.024~0.034 (0.027 6)	0.024 3	0.014~0.019 (0.016 1)	0.000 0		
三花悬钩子 (H)	0.039~0.049 (0.044 4)	0.055~0.065 (0.060 1)	0.050~0.050 (0.049 8)	0.065~0.076 (0.070 5)	0.060~0.071 (0.063 9)	0.060 4	0.050~0.055 (0.051 4)	0.039 3	0.000 0	
武夷悬钩子 (J1)	0.010~0.019 (0.014 5)	0.044~0.055 (0.049 4)	0.019~0.019 (0.019 3)	0.087~0.098 (0.092 2)	0.050~0.060 (0.053 1)	0.049 6	0.024~0.034 (0.029 3)	0.044 3	0.049 5	0.000 0

括号内为平均 K2P 距离，对应各自上面数值的平均值

Numbers in parentheses mean average K2P distances, corresponding average values of above numbers in their same cells respectively.

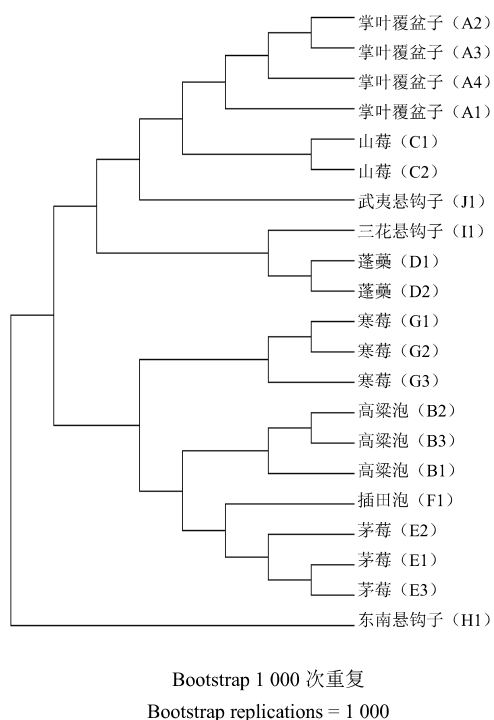


图 2 基于 ITS2 序列构建的搁公扭根基原植物及其同属易混种的 NJ 进化树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree of original specie of Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus* based on ITS2 sequence

实现跨平台快速获取各物种的 DNA 条形码信息，有助于推进兽药二维 DNA 条形码流通监管体系的建立。

3 讨论

药材的准确鉴定是研究药材有效化学成分和依靠传统形态学方法无法准确鉴别。本研究利用基于 ITS2 序列的条形码技术，成功鉴别了搁公扭根及其同属易混种，为该常用兽药的生产、使用和监管提供了有益的参考，为 DNA 条形码鉴定技术在兽药领域的鉴定研究积累了经验。

我国掌叶覆盆子资源分布较广，与其同属多个物种形态相近、生境相同，易与其他同属植物混淆，尤其是兽药搁公扭根使用部位为掌叶覆盆子的根，依靠传统形态学方法无法准确鉴别。兽医药的现代研究起步较晚、技术水平较为落后，在常用兽药的快速准确鉴别方面，迫切需要现代先进的鉴定技术。畜牧民间用药有其独特性，95%以上的兽药均为植物药，且喜用鲜药或自然干燥，少数进行加工炮制^[1-2]，可以很大程度上保证药材的 DNA 不被降解，非常适宜用 DNA 条形码技术进行鉴定。本研究利用基于 ITS2 序列的条形码技术，成功鉴别了搁公扭根及其同属易混种，为该常用兽

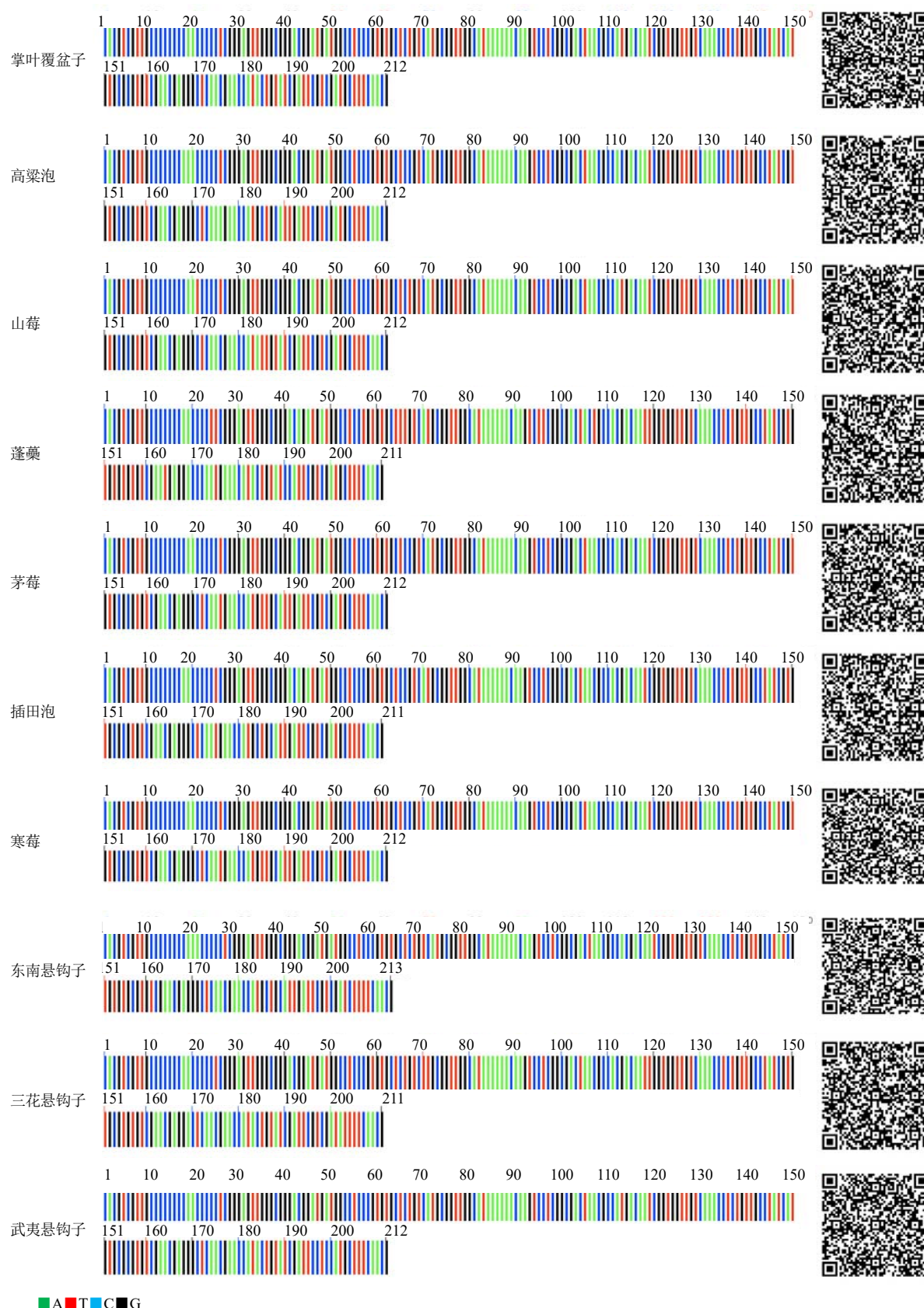


图 3 搁公扭根基原植物及其同属易混种二维 DNA 条形码

Fig. 3 Two-dimensional DNA barcode images of original specie of Gegongniugen and its confusable species of genus *Rubus*

药的生产、使用和监管提供了有益的参考,为DNA条形码鉴定技术在兽药领域的鉴定研究积累了经验。

参考文献

- [1] 程科军,李水福.整合兽药学[M].北京:科学出版社,2017.
- [2] 雷后兴,李水福.中国兽类医药学[M].北京:中国中医药出版社,2008.
- [3] 浙江省食品药品监督管理局.浙江省中药炮制规范[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [4] 中国药典[S].一部.2015.
- [5] 赵建邦.覆盆子及其4种混淆品的性状鉴别[J].中药材,1995,18(10):508.
- [6] 赵建邦.覆盆子及其4种混淆品的显微鉴别[J].中药材,1996,19(9):449-450.
- [7] 顾利红.中药覆盆子类的生药学研究 I [J].中国药科大学学报,1994,25(4):193-198.
- [8] 李昌吉.覆盆子与其伪品山莓的鉴别[J].中国药学杂志,1988,23(1):18.
- [9] 张保国.覆盆子及其混淆品绵果悬钩子的鉴别[J].中国中药杂志,1989,14(4):206.
- [10] 陈士林.中国药典中药材DNA条形码标准序列[M].北京:科学出版社,2015.
- [11] 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.
- [12] 辛天怡,雷美艳,宋经元.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.
- [13] 张彩云,黄珊珊,颜海飞.DNA条形码技术在中药鉴定中的应用进展[J].中草药,2017,48(11):2306-2312.
- [14] 叶方,柳施一,胡培,等.武当山区重楼属植物基于ITS2的种内鉴别研究[J].中草药,2017,48(3):550-558.
- [15] Lv T, Teng R, Shao Q, et al. DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants [J]. *Planta*, 2015, 242(5): 1167-1174.
- [16] Zhu X, Zhang Y, Liu X, et al. Authentication of commercial processed *Glehniae Radix* (Beishashen) by DNA barcodes [J]. *Chin Med*, 2015, 10: 35.
- [17] 王亚丹,韩晓妮,赵玉丹,等.基于ITS2条形码鉴别市售柴胡药材及其混伪品[J].中草药,2017,48(17):3590-3596.
- [18] Ma S, Lv Q, Zhou H, et al. Identification of traditional She medicine Shi-Liang tea species and closely related species using the ITS2 barcode [J]. *Appl Sci*, 2017, 7(3): 195.
- [19] 俞志雄.江西悬钩子属新分类群(英文)[J].云南植物研究,1991,13(3):254-256.
- [20] 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):54-61.
- [21] Schultz J, Müller T, Achtziger M, et al. The internal transcribed spacer 2 database—a web server for (not only) low level phylogenetic analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: W704-W707.
- [22] 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.
- [23] 辛天怡,李西文,姚辉,等.中药材二维DNA条形码流通监管体系研究[J].中国科学:生命科学,2015,45(7):695-702.