

基于 ITS2 序列鉴别道地药材岷县当归及其混伪品

刘新星¹, 欧巧明¹, 石有太¹, 辛天怡², 宋经元², 罗俊杰^{1*}, 崔文娟¹

1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070

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

摘要: **目的** 利用核糖体 rRNA 基因内转录间隔区 (ITS2) 序列, 对甘肃道地药材岷县当归 (岷归) 及其混伪品和近缘属药材进行鉴定分析。 **方法** 对供试材料 ITS2 序列进行 PCR 并双向测序, 所得序列经 Codon Code Aligner 校对拼接后, 利用 MEGA 6.0 对序列进行分析比对, 计算种内、种间遗传距离, 利用邻接法 (NJ) 构建系统聚类树, 并应用 ITS2 数据库网站预测其 ITS2 二级结构。 **结果** 经 PCR 扩增测序, 15 份甘肃栽培当归与标准样品岷归 1 号序列比对无差异, 序列长度 230 bp, GC 含量为 55.46%, 37 份当归混伪品与近缘属药材 ITS2 序列长度为 228~233 bp, GC 含量为 51.53%~65.65%。岷归与混伪品、近缘属药材共 53 条序列中共检测到变异位点 220 个, 保守位点 10 个, 信息位点 213 个。根据 K2P 遗传距离计算, 岷县当归种内遗传距离明显小于种间遗传距离, 基于 ITS2 序列构建的 NJ 树和网站预测的 ITS2 二级结构, 均能将岷归与其混伪品和近缘属药材区分。 **结论** ITS2 序列可作为当归鉴定的 DNA 条形码, 为当归市场的健康可持续发展提供有效的技术手段。

关键词: 当归; SSR; 分子标记; ITS2; 核糖体 rRNA

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)20-4877-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.026

Identification of *Angelica sinensis* and its adulterants based on ITS2 sequence

LIU Xin-xing¹, OU Qiao-ming¹, SHI You-tai¹, XIN Tian-yi², SONG Jing-yuan², LUO Jun-jie¹, CUI Wen-juan¹

1. Gansu Provincial Academy of Agricultural Sciences Institute of Biotechnology, Lanzhou 730070, China

2. Institute of Medicinal Plant Development of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Objective In this study, *Angelica sinensis* and its adulterants, close relatives were analyzed by ITS2 sequences to investigate the genetic structure from Min County, Gansu Province. **Methods** In this study, the internal transcribed spacer 2 (ITS2) regions of samples were amplified by PCR and sequenced bi-directionally. Obtained sequences were assembled using Codon Code Aligner. The genetic distances were computed by MEGA 6.0 in accordance with the kimura 2-parameter (K2P) model and the phylogenetic tree was constructed by Neighbor-joining (NJ) method. Moreover, the secondary structure of ITS2 was predicted using ITS2 database websites. **Results** The ITS2 region was 230 bp and base composition was GC content of 55.46% of *A. sinensis* in Min County. In its adulterants and close relatives of *A. sinensis*, the ITS2 region ranged in size from 228—233 bp and base composition was with G + C content ranged from 51.53%—65.65%. A total of 220 polymorphic sites were detected from 53 sequences, in which parsimony informative sites were up to 213. By K2P model, the intra-specific genetic distances of *A. sinensis* in Min County were smaller than inter-specific ones of *A. sinensis* and its adulterants in ITS2 regions. NJ tree and secondary structure results could distinctly differentiate quality product and adulterants. **Conclusion** ITS2 sequence can accurately identify the authenticity of *A. sinensis*, which provide a effective technology for the healthy and sustainable development in *A. sinensis* market.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; SSR; molecular marker; ITS2; rRNA

《中国药典》2015 年版收载的当归来源仅为当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 其余品种与当归在功效上均有较大差异, 严重影响用药安全^[1]。甘肃省栽培的当归为伞形科当归属植物当归的干燥根, 被列为上品, 为临床常用中药。《中国

植物志》中提到: “当归主产甘肃东南部, 以岷县产量多, 质量好, 其次为云南, 四川、陕西、湖北等省, 均为栽培”。岷县当归又称“岷归”, 远销东南亚、欧美国家及我国港澳台地区, 被欧洲人誉为“中国妇科人参”, 早在 1 500 年前, 岷归已是极为

收稿日期: 2018-03-28

基金项目: 甘肃省农业科学院科技支撑计划 (2016GAAS59); 甘肃省农业科学院中青年基金资助项目 (2016GAAS52); 甘肃省农业科学院科技创新工程学科团队 (2015GAAS02); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项资助 (2015GAAS36)

作者简介: 刘新星 (1986—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为药用植物种质资源评价。E-mail: lxx19860621@163.com

***通信作者** 罗俊杰 (1962—), 男, 博士生导师, 研究员, 从事旱地农业作物遗传育种工作。E-mail: hnslijie@163.com

珍贵的贡品。

药用植物覆盖了广泛的植物类群,其中包含形态学上难以鉴别的物种。调查显示,中国药用植物覆盖了 383 科、2 309 属、11 146 种,具有丰富的生物多样性^[2]。由于有些植物在形态上极其相似,加之长期以来对中草药的品种来源、定名、谱系、品种特性等缺乏科学管理,致使中药材名称混乱,出现一名多物、一物多名等现象,给用药安全带来了隐患^[3]。中药材传统的鉴定方法主要是性状鉴别、显微鉴别和化学特征鉴别^[4],受原植物生长环境、生长期及炮制加工工艺的影响较大。近年来,分子鉴别方法已经广泛的在中药材上发展起来。目前,当归的分子鉴别在 ITS^[5-8]、trnL-F^[9]、ISSR^[10-11]和 RAPD^[12]上均有研究。自 Chen 等^[13]首次提出把 ITS2 作为药用植物鉴定的标准 DNA 条形码以来,ITS2 条形码序列就备受关注,已被广泛用于多种药用植物和药材的鉴定,表现出较强的鉴定能力。本研究拟以甘肃道地岷归 1 号为标准样品、其他地区产当归及其混伪品和近缘属药材为研究对象,采用 ITS2 条形码技术对道地岷归的鉴别进行研究,为当归市场的健康可持续发展提供有效的鉴别方法。

1 材料与试剂

1.1 材料

选取岷归标准样品——育成品种岷归 1 号 1 份,甘肃当归主栽区岷县、卓尼和渭源的栽培当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 共 15 份,当归近缘属药材 5 份,经甘肃农业科学院助理研究员石有太鉴定为川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.、羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang、葛缕子 *Carum carvi* L.、北沙参 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.、柴胡 *Bupleurum chinense* DC., 见表 1。同时从 NCBI 中下载当归混伪品白芷 *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f.、东当归 *A. acutiloba* (Sieb. et Zucc.) Kitagawa、青海当归 *A. nitida* Wolff、欧当归 *Levisticum officinale* Koch.、独活 *Heracleum hemsleyanum* Diels、疏叶当归 *A. laxifoliata* Diels 和紫花前胡 *A. decursiva* (Miq.) Franch. et Sav. 的 ITS 序列共 32 条。

1.2 仪器及试剂

高速冷冻离心机 (Thermo 公司); PCR 扩增仪、凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司), 移液器 (Eppendorf); 植物提取基因组试剂盒 (Tiangen Biotech Co 公司, 中国), 琼脂糖 (Biowest)、Mix Tag 酶 (Takara 公司)。

表 1 供试材料的产地和 GenBank 登录号

Table 1 Origin and GenBank accession number of test materials

材料名称	产地	NCBI 登录号	材料名称	产地	NCBI 登录号
岷归 1 号	渭源当归资源圃	MG770565	东当归	不详	GU395147
当归	岷县西寨镇田家堡村	MG770551	东当归	不详	DQ278165
当归	岷县石沟乡八步川村	MG770552	青海当归	不详	EU418378
当归	岷县麻子川乡绿叶村	MG770553	青海当归	不详	JN704863
当归	岷县茶埠镇大竜村	MG770554	青海当归	不详	JX022927
当归	岷县河驮乡石门村	MG770555	青海当归	不详	FJ986041
当归	卓尼县喀尔钦乡相俄村	MG770550	青海当归	不详	GU395163
当归	卓尼县柳林镇寺台子村	MG770561	欧当归	不详	KJ999468
当归	卓尼县柳林镇上卓村	MG770571	欧当归	不详	KJ999467
当归	卓尼县柳林镇东石沟村	MG770577	欧当归	不详	KJ999466
当归	卓尼县柳林镇草岔沟村	MG770578	欧当归	不详	KJ999469
当归	渭源县田家河乡香卜路村	MG770581	独活	不详	HQ686441
当归	渭源县祁家庙乡烟雾沟村	MG770582	独活	不详	HQ686427
当归	渭源县会川乡半阴坡村	MG770563	独活	不详	FJ986047
当归	渭源县半阴坡村种质资源圃	MG770564	独活	不详	GU967787
当归	渭源县半阴坡村种质资源圃	MG770567	独活	不详	EU001371
川芎	陇西药圃园	MG770570	疏叶当归	不详	EU647210
羌活	陇西药圃园	MG770576	疏叶当归	不详	JN704842
葛缕子	陇西药圃园	MG770583	疏叶当归	不详	JX022920
北沙参	陇西药圃园	MG770572	疏叶当归	不详	GU395159
柴胡	陇西药圃园	MG770584	疏叶当归	不详	JX022919
白芷	不详	EU418374	紫花前胡	不详	EU418375
白芷	不详	JX022909	紫花前胡	不详	JN704853
白芷	不详	JX022907	紫花前胡	不详	JX022912
白芷	不详	JX022908	紫花前胡	不详	KF806566
东当归	不详	AB697602	紫花前胡	不详	HQ256684
东当归	不详	AB697601			

2 方法

2.1 样品的采集

每个种植区以村为居群单位, 每个居群采集 5 个单株的混样一份, 单株间相距 50 m 左右, 居群间隔 50 km 以上, 摘取幼嫩的新鲜叶片置于盛有硅胶颗粒的密封袋内立即干燥, 凭证标本存放于甘肃省农业科学院生物技术研究所以。

2.2 样品处理及 DNA 提取

每份样品取约 50 mg, 用液氮研磨, 采用植物提取基因组试剂盒进行样品 DNA 的提取, 提取完成后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行样品质量的检测, 并用 Nanodrop 2000 测定 DNA 的浓度, 将 DNA 稀释至 20~50 ng/ μ L, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3 ITS2 序列扩增和测序

选用通用引物, 正向引物为 5'-ATGCGATAC-TTGGTGTGAAT-3', 反向引物为 5'-GACGCTTCT-CCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体系为 25 μ L, 包含 DNA 模板 1~2 μ L, PCR MIX 12.5 μ L, 正、反向引物各 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 接着 40 个循环: 包括 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s; 然后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往北京诺赛基因公司进行二代双向测序。

2.4 数据分析

ITS2 测序数据应用 Codon Code Aligner V3.7.1 对测序峰图进行校对拼接, 去除引物及低质量区, 基于隐马尔科夫模型的 Hmmer 注释方法去除 5.8 S 和 28 S 区段, 即可获得 ITS2 间隔区序列。采用 MEGA 6.0 进行序列比对, 计算种内、种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离, 利用邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建系统聚类树, 同时以 bootstrap 自展支持率 (1 000 次) 重复检验各分支的支持率。根据 ITS2 数据库网站预测供试材料的 ITS2 二级结构。

3 结果与分析

3.1 岷归与其混伪品及近缘属药材 ITS2 序列分析

本研究中 15 份受试当归序列与标准样品岷归 1 号序列完全一致, 序列长度 230 bp, GC 含量为 55.46%, 说明 ITS2 序列不能区分当归的产地。37 份当归混伪品与近缘属药材 ITS2 序列长度为 228~233 bp, GC 含量为 51.53%~65.65%。岷归与混伪品、近缘属药材的种间比对长度 233 bp, 保守位点

10 个, 变异位点 220 个, 信息位点 213 个 (图 1)。

3.2 遗传距离

根据 K2P 遗传距离计算 (表 2), 岷归、混伪品以及近缘属各物种间遗传距离为 0.022 4~0.608 2, 其中北沙参和东当归遗传距离最近, 柴胡和独活遗传距离最远。岷归与各混伪品及近缘属药材间的遗传距离为 0.099 4~0.475 1, 岷归与川芎遗传距离最近, 与柴胡遗传距离最远, 欧当归次之。从图 2 看出, 受试样本种间的遗传距离明显大于种内遗传距离, 表明 ITS2 序列可以作为正品当归鉴别的 DNA 条形码。

3.3 NJ 聚类树鉴定

基于 ITS2 序列构建岷归及其混伪品、近缘属药材间的 NJ 系统聚类树 (图 3)。从聚类树上看出, 除北沙参与紫花前胡、川芎与岷归聚为一支外, 其余各药材按照每个物种的 ITS2 序列均单独聚为一支, 各支支持率较高, 呈现出良好的单系性。

3.4 ITS2 序列二级结构预测

从 NJ 聚类图中看出, 岷归与青海当归、白芷、疏叶当归、东当归、北沙参、紫花前胡、独活、川芎聚成一大支, 亲缘关系较近, 对其分别进行 ITS2 二级结构预测。从图 4 看出, 这 9 个物种在二级结构上差异显著。9 种药材的 ITS2 二级结构均由 1 个中心环和 4 个螺旋区组成, 每个螺旋区上又有大小不等、数目各异的茎环结构。首先, 独活的中心环结构复杂, 与其他 8 种药材容易区分; 其次, 青海当归、白芷、疏叶当归、东当归、北沙参和紫花前胡的中心环较大, 可以与岷归区分, 且它们的 4 个螺旋区上大小数目不等的茎环结构可以用于区分彼此; 最后, 剩余当归和川芎, 可以看出 2 种药材的螺旋区上的茎环数量和大小不同, 能够进行区分。可见, 通过 ITS2 序列的二级结构能够鉴别岷归与其混伪品。

4 讨论

随着分子技术的发展, rDNA 的 ITS 序列已被频繁的用于物种间的系统发育关系研究。高婷等^[14]和 Chen 等^[15]分析了叶绿体基因组和核基因在中药系统进化和鉴定中的特点, 认为 ITS 序列适合属、种等低分类阶元的系统关系研究; 而 ITS2 长度较短, 易于扩增, 更适合于中药材的鉴定。陈士林团队对上千种中草药及混伪品的 DNA 条形码经过 10 年研究, 创建了“以 ITS2 为主体的中草药 DNA 条形码鉴定新体系”。本研究中, 利用 ITS2 序列能够有效

Fig. 1 Interspecific alignment of ITS2 sequences in *A. sinensis* and its adulterants and marginal species

表 2 岷归与其混伪品、近缘物种间的遗传距离

Table 2 Genetic distance in *A. sinensis* and its adulterants and marginal species

物种	当归	川芎	羌活	葛缕子	北沙参	柴胡	白芷	东当归	青海当归	欧当归	独活	疏叶当归	紫花前胡
当归	*												
川芎	0.099 4	*											
羌活	0.225 5	0.259 0	*										
葛缕子	0.189 7	0.222 9	0.243 1	*									
北沙参	0.142 5	0.121 7	0.246 7	0.242 4	*								
柴胡	0.475 1	0.523 7	0.511 2	0.507 3	0.497 9	*							
白芷	0.153 1	0.151 2	0.266 1	0.235 2	0.069 8	0.501 3	*						
东当归	0.123 0	0.112 9	0.228 1	0.221 2	0.022 4	0.480 3	0.055 2	*					
青海当归	0.144 7	0.145 8	0.264 2	0.243 9	0.071 0	0.538 7	0.036 9	0.056 2	*				
欧当归	0.449 7	0.469 5	0.365 0	0.476 2	0.425 5	0.523 3	0.464 2	0.391 6	0.482 0	*			
独活	0.159 7	0.192 4	0.268 0	0.571 2	0.191 4	0.576 7	0.178 1	0.167 6	0.178 6	0.433 9	*		
疏叶当归	0.127 8	0.117 7	0.222 3	0.221 2	0.041 4	0.469 0	0.036 7	0.027 3	0.036 8	0.434 8	0.166 7	*	
紫花前胡	0.167 1	0.133 7	0.252 8	0.260 0	0.060 6	0.489 5	0.085 9	0.055 9	0.081 0	0.462 6	0.214 8	0.055 1	*

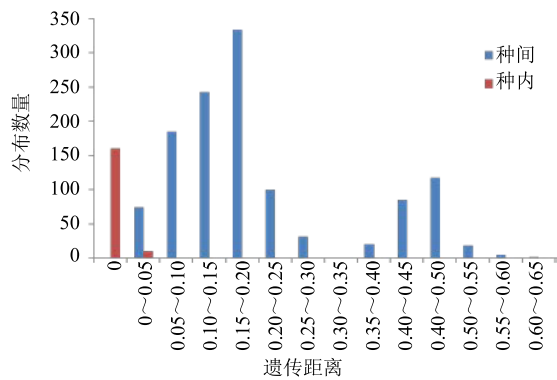


图 2 ITS2 种间和种内变异分布

Fig. 2 Relative distribution of interspecific divergence and intraspecific among congenetic species for ITS2

鉴别岷归与其混伪品和近缘属药材，进一步验证 ITS2 序列可以作为当归正品鉴定的 DNA 条形码。楚惠媛等^[16]利用 ITS 序列对甘肃不同产地当归进行分析，结果得出岷县当归样品与漳县 1 个样品的 ITS 序列第 586 位和 589 位 2 个位点碱基与其他产地当归不同，但在本研究中并未得到此结果，供试的卓尼和渭源栽培当归与岷县当归及标准样品岷归 1 号序列比对无差异，表明 ITS2 条形码对不同产地（不同来源）的当归的不能进行有效区分。

作为 DNA 条形码鉴别序列，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，同时又要要有较小的种内差异，可将同一物种聚为同一类。本研究中，岷归种内的遗传距离明显小于岷归

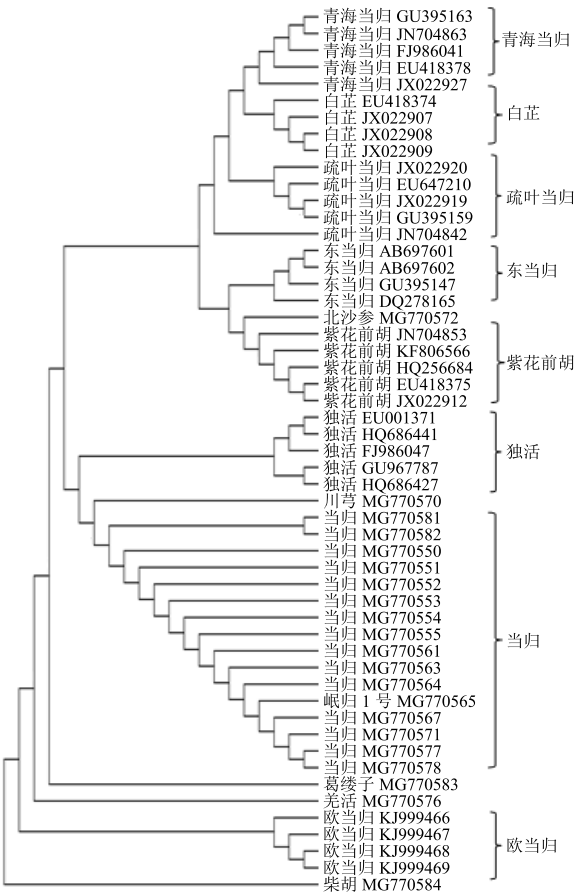


图 3 基于 ITS2 序列构建的当归及其近缘物种 NJ 树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *A. sinensis* and its adulterants constructed with ITS2 sequences using NJ method

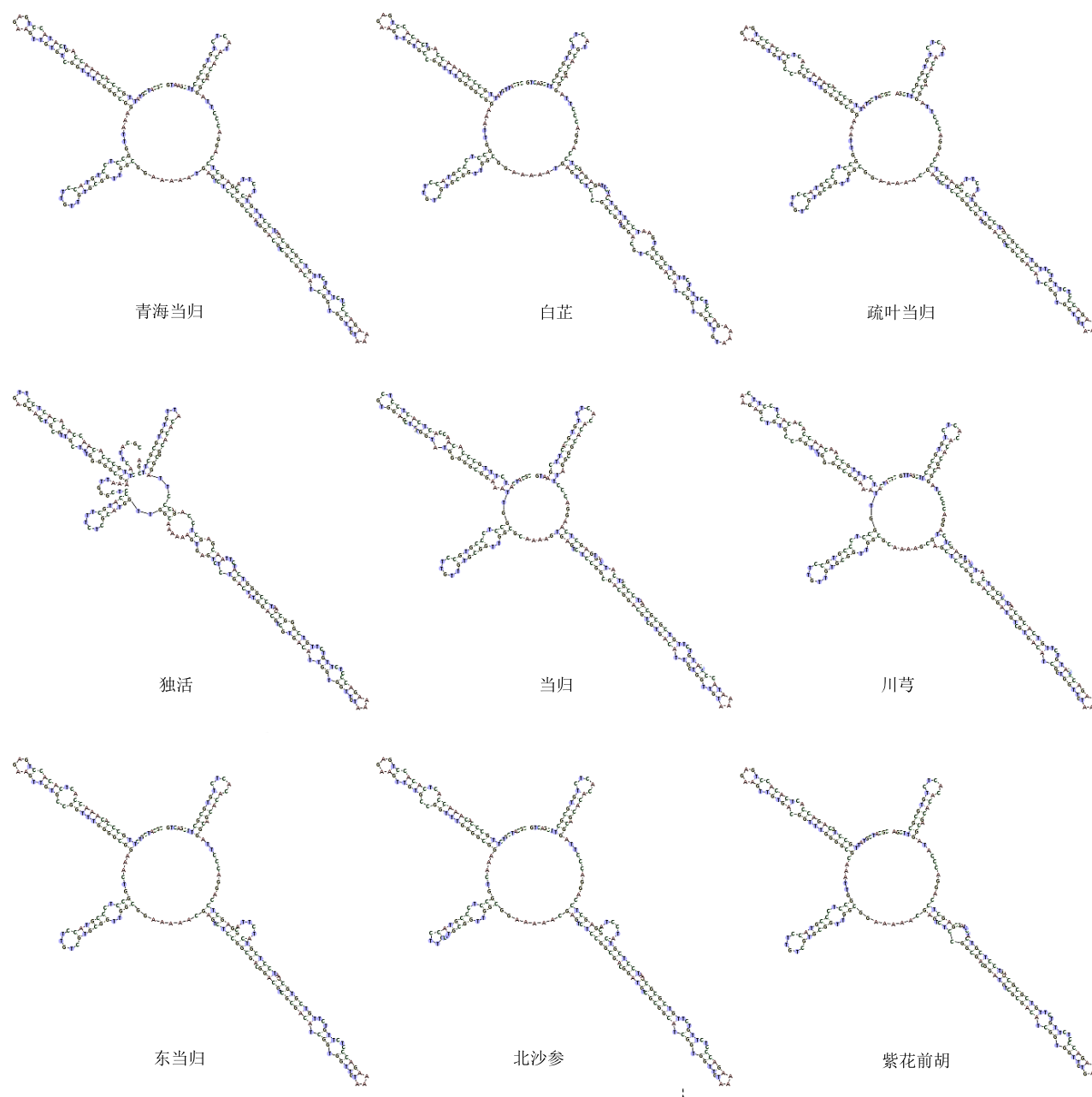


图 4 岷归及其混伪品的 ITS2 二级结构

Fig. 4 Secondary structure of ITS2 in *A. sinensis* and its adulterants

与混伪品和近缘属药材的种间最小遗传距离，基于 ITS2 序列构建的 NJ 树看出，不同物种单独聚为一小支，呈现出良好的单系性，表明 ITS2 序列能够准确快速鉴别当归。杨烁^[17]对 ITS2 二级结构在药用植物鉴定上的研究表明，通过使用 ITS2 核酸信息及其二级结构信息联合分析，能够显著提升 ITS2 的物种鉴定效率，并证明了二级结构信息作为 ITS2 的补充信息在药用植物 DNA 条形码鉴定应用中的可行性与潜力。本研究结果也验证了这一点，在民

间，有些地方将独活混作当归出售，我们从聚类树上也看到独活与当归亲缘关系近聚为一大支，但是从独活 ITS2 的二级结构上能够明显进行区分，将 ITS2 二级结构作为 DNA 条形码在中药材鉴别上的辅助手段具有重要意义。

目前，甘肃是当归规模化种植的最大省份，其育苗及栽培管理技术相对其他药材成熟，因此几大主产区的当归种苗来源一致性高。甘肃大面积种植的当归品种为岷归 1 号，采用人工选择的传统育种

方法,在人工选育优良品种的过程中只有每一世代里最符合需求的植株的种子才能被继续播种,这样的筛选导致了遗传瓶颈,减少了整个基因组中的遗传多样性^[18-19]。道地药材岷归的高品质主要是由产区气候环境和土壤多因素影响,若想进行产地鉴别从而构建道地药材的独有标记,从生境、化学成分结合分子标记更加可行。DNA 条形码技术具有快速、准确、微量、通用性强的特点,不受发育阶段、供试部位、环境条件的限制,可以鉴别药材外部形态不完整或已被加工成粉末、饮片的样品,弥补了传统鉴别方法在这方面的不足,在中药鉴定中展示了更加广阔的应用前景^[20]。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 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(1): e8613.
- [3] 蔡金龙,谢世清,张广辉,等. 药用植物 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(3): 452-464.
- [4] 罗煜,马培,姚辉,等. 多基元药材秦艽ITS2条形码鉴定研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1710-1717.
- [5] 张彬. 当归属药用植物及药材的条形码鉴别研究——兼论条形码在中药材鉴定中的原则 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2009.
- [6] Yuan Q J, Zhang B, Jiang D, *et al.* Identification of species and materia medica within *Angelica* L. (Umbelliferae) based on phylogeny inferred from DNA barcodes [J]. *Mol Ecol Res*, 2015, 15(2): 358-371.
- [7] 闫梦颖,房敏峰,祝娟,等. 基于 ITS 条形码标记对当归属药用植物的鉴别 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 974-981.
- [8] 辛天怡,姚辉,韩建萍,等. 当归药材及混伪品 ITS2 条形码鉴定 [J]. 科研信息化技术与应用, 2013, 4(3): 76-82.
- [9] 罗沛宜. 当归及其混伪品的分子鉴定研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2016.
- [10] 张春,朱烨,何颖,等. 基于内部简单重复序列 (ISSR) 分析的当归分子鉴定 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(10): 812-816.
- [11] 朱田田,晋玲,张裴斯,等. 基于 ISSR 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3549-3557.
- [12] 盛丽. 甘肃省当归资源的 RAPD 分析 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [13] 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.
- [14] 高婷,姚辉,马新业,等. 中国黄芪属药用植物 DNA 条形码 (ITS2) 鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(2): 222-227.
- [15] Chen S, Yao H, Han J, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [16] 楚惠媛,金建文,李海龙,等. 甘肃不同产地当归 ITS 序列分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(8): 43-44.
- [17] 杨烁. ITS2 二级结构在药用植物 DNA 条形码鉴定中的可行性 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [18] 孙红梅,张本刚,齐耀东,等. 当归药材资源调查与分析 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 437-441.
- [19] 李鹏程,刘效瑞. 当归新品种岷归4号选育及优化种植技术研究 [J]. 中药材, 2011, 34(7): 1017-1019.
- [20] 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.