

基于 ITS2 序列的人参及同属易混品西洋参种子的分子鉴定

林凤越, 曹 辉, 任欢欢, 姚 丽*

哈尔滨医科大学, 黑龙江 哈尔滨 150081

摘要:目的 基于 DNA 条形码技术建立人参与西洋参种子的分子鉴别方法。方法 采用生药鉴定方法研究其性状、显微特征, 并结合 DNA 条形码技术, 基于中药材 DNA 条形码数据库, 通过 ITS2 序列比对、遗传距离比较和构建邻接(NJ)系统发育树, 对人参与西洋参的种子进行鉴别研究。结果 人参与西洋参种子的种内遗传距离分别小于种间遗传距离, 系统发育树图中各物种均聚为一支, 来自 9 个产地的 42 份人参及西洋参的种子均为正品, 且容易区分。结论 基于 ITS2 序列 DNA 条形码技术可以快速、准确、有效地鉴别人参与西洋参种质资源。

关键词: 中药材种子; 人参; 西洋参; DNA 条形码技术; ITS2 序列

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)09-2188-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.026

Seeds identification of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* using ITS2 DNA barcodes

LIN Feng-yue, CAO Hui, REN Huan-huan, YAO Li

Harbin Medical University, Harbin 150081, China

Abstract: Objective Traditional identification methods of pharmacognosy is difficult to distinguish the seeds of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. In order to improve the efficacy and accuracy of identification and provide the scientific foundation for the establishment of Chinese herbal medicine seed quality standards, molecular identification methods of the seeds were established by DNA barcoding technology. **Methods** The pharmacognostical identification method was used to study the morphological identification and microscopic characters of different seeds. DNA barcodes and Chinese Pharmacopoeia species standard barcode database were employed to identify the seeds by ITS2 sequence comparison, genetic distance comparison and systematic NJ tree construction. **Results** Intraspecific genetic distances of individuals participating were smaller than interspecific genetic distances. Phylogenetic tree map showed that two species were respectively clustered into one. A total of 42 samples of seeds from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* produced by nine areas were all top-quality and easy to distinguish. **Conclusion** ITS2 DNA barcodes can identify and differentiate the seeds of *P. ginseng* and *P. quinquefolius* germplasm resources quickly, accurately and efficiently.

Key words: Chinese herbal medicine seeds; *Panax ginseng* C. A. Mey.; *Panax quinquefolium* L.; DNA barcoding technology; ITS2 sequence

中药质量控制是保证中药临床用药安全性和有效性的重要措施, 也是制约中药现代化进程的瓶颈^[1]。种子是中药材种植、流通、使用的重要源头, 种质资源的质量将直接影响中药材产量及质量^[2]。精准鉴定中药材的种子, 确保种质资源准确可靠, 既为中药材规范化种植奠定坚实基础, 又为临床的用药安全提供有利保障。目前, 中药材种子质量标准及鉴定体系并不完善, 参照农作物种子标准对市场流通中的种子进行检验, 约有 50%种子

的质量不合格^[3]。近年来, 中药材种子的质量事件时有发生, 尤其是名贵中药材的种子掺假问题^[2], 传统的鉴别方法对种子的形态学特征要求高^[4], 存在主观性较强、无量化指标等缺点, 尤其对同属植物的种子, 如五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 和西洋参 *P. quinquefolium* L.^[5], 即使经验丰富的鉴定专家也难以快速准确的鉴别区分^[6-7]。DNA 条形码技术在解决上述鉴定中存在的问题有独特优势, 是利用基因组中一段公认的、易扩增的、

收稿日期: 2018-12-03

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金项目(2017RAXXJ060)

作者简介: 林凤越(1994—), 女, 在读硕士研究生, 专业方向为中药分子鉴定。Tel: 18845765346, E-mail: 1987786752@qq.com

*通信作者 姚 丽 Tel: 18686845106 E-mail: 18686845106@163.com

变异较大、相对较短的 DNA 序列进行物种鉴定的分子诊断技术^[8-9]。matK、rbcL、psbA-trnH、ITS2 序列为药用植物鉴定中的常用序列，matK 序列引物的通用性较差，rbcL 序列的物种鉴定效率较低，psbA-trnH 序列的重复结构较多，测序成功率较低，而 ITS2 序列的鉴定成功率高达 92.7%^[10]，广泛应用于名贵、珍稀、濒危中药材的鉴定。已有研究证实，基于 trnL-trnF、ITS2 序列均可对人参参与西洋参的药材进行有效鉴定^[11-12]，但对其种子的鉴别未见相关报道。本实验首次采用基于 ITS2 序列的 DNA 条形码技术，对中药人参和其同

属易混品西洋参的种子进行鉴别，为建立规范、高效、准确、可靠、价廉的中药材种子的鉴定方法提供参考。

1 材料

本研究购买人参与西洋参的种子样品共 42 份，经由哈尔滨医科大学姚丽教授鉴定均为正品人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 与西洋参 *Panax quinquefolium* L. 种子。种子样品分别来自黑龙江省、吉林省、辽宁省的 9 个产区，人参种子样品 7 批，西洋参种子样品 6 批，样品详细信息见表 1。

表 1 实验样品信息表

Table 1 Sample information of *P. Ginseng* and *P. quinquefolium* seeds

物种名	样本号	采集部位	样本来源
人参	PNG-1、PNG-10、PNG-19	种子	吉林省通化市
人参	PNG-2、PNG-11、PNG-20	种子	吉林省延吉市
人参	PNG-3、PNG-8、PNG-12、PNG-17、PNG-21、PNG-24	种子	吉林省白山市
人参	PNG-4、PNG-13、PNG-22	种子	吉林省清河县
人参	PNG-5、PNG-9、PNG-14、PNG-18、PNG-25	种子	吉林省吉林市
人参	PNG-6、PNG-15	种子	黑龙江省饶河县
人参	PNG-7、PNG-16、PNG-23	种子	辽宁省抚顺市
西洋参	PNQ-26、PNQ-32	种子	吉林省吉林市
西洋参	PNQ-27、PNQ-33、PNQ-38	种子	吉林省白山市
西洋参	PNQ-28、PNQ-34、PNQ-39	种子	吉林省抚松市
西洋参	PNQ-29、PNQ-35、PNQ-40	种子	黑龙江省饶河县
西洋参	PNQ-30、PNQ-36、PNQ-41	种子	吉林省清河县
西洋参	PNQ-31、PNQ-37、PNQ-42	种子	黑龙江省方正县

2 方法

2.1 种子的形态学观察

观察种子样品的性状特征，并用游标卡尺（上海九量五金工具有限公司）精确测量长度、宽度。

2.2 种子的显微鉴定

种子经 FAA 固定液固定，采用石蜡切片法制作切片^[13]，置显微镜下观察组织特征，粉末制片法观察粉末特征，电子数码摄像系统采集显微特征图。

2.3 DNA 提取及测定

各产地分别取 3 粒种子样品，去皮（约 15 mg），加入液氮研磨充分，采用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA，DNA 提取步骤依试剂盒说明书并调整水浴条件，水浴时间为 3 h，水浴过程中颠倒离

心管数次。水浴后，用氯仿-异戊醇（24：1）抽提，再用 Tris 饱和酚-氯仿-异戊醇（25：24：1）抽提。用 NanoDrop 2000（Thermo Scientific）测定 DNA 浓度，通过 A_{260}/A_{280} 分析 DNA 质量，琼脂糖凝胶电泳方法检测 DNA 质量。

2.4 PCR 扩增及测序

选用 ITS2 序列通用引物^[14]进行扩增。反应体系共 25 μ L，其中 2 $\times$ Taq PCR Mix 12.5 μ L，引物 1 μ L（10 μ mol/L，英潍捷基贸易有限公司），模板 DNA 2 μ L。PCR 扩增程序参照文献方法^[15]，用琼脂糖凝胶电泳法检测 PCR 产物，ABI3730xl 测序仪对纯化后的 PCR 产物（Applied BiosystemsTM）进行双向测序。使用 Codon Code Aligner V 5.1.5（Codon Code Co.，美国）软件校对并拼接测序峰图，去除低质量序列及两端引物区。

2.5 数据分析

采用相似性搜索法对样品序列进行 BLAST (basic local alignment search tool) 分析, 并通过中药材 DNA 条形码鉴定系统 (<http://www.tembarcode.cn>) 对物种进行鉴定。采用 MEGA 5.0 计算 K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离, 构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树, 并根据 bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。

3 结果

3.1 形态学特征

人参种子呈倒卵形或肾形; 种皮为乳白色, 干后为淡棕色; 种皮较坚硬, 表面有深浅不同纵沟, 种脐明显。人参种子的平均长度 (5.30 ± 0.36) mm, 平均宽度 (4.40 ± 0.31) mm, 平均厚度 (2.57 ± 0.12) mm。西洋参种子呈扁圆形或肾形, 种皮较厚, 表面粗糙, 无纵沟, 种脐较小。西洋参种子的平均长度 (6.23 ± 0.23) mm, 平均宽度 (5.05 ± 0.14) mm, 平均厚度 (2.93 ± 0.15) mm。人参种子与西洋参种子的形态学鉴定结果十分相近。见图 1。



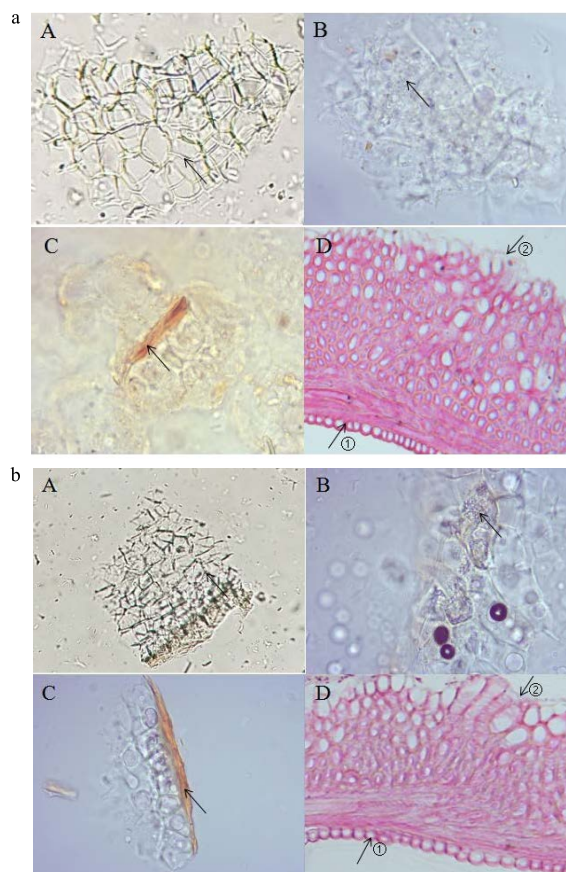
图 1 人参 (A) 和西洋参 (B) 种子样品形态

Fig. 1 Seed samples of *P. Ginseng* (A) and *P. quinquefolium* (B)

3.2 显微鉴别特征

人参种子与西洋参种子粉末均呈暗黄色。种皮表皮细胞表面观多角形; 树脂道腔内含有金黄色或黄棕色分泌物; 另有胚乳细胞。种皮横切面细胞壁较厚, 种皮薄壁组织中散有小型外韧型维管束及树脂道, 内种皮为数列狭长的厚壁细胞,

排列紧密, 层层交错。人参种子与西洋参种子的显微特征相似, 显微鉴定结果难以区分, 见图 2-a、b。



A-表皮细胞 B-胚乳细胞 C-树脂道 D-种皮横切面: ①内种皮, ②外种皮

A-epidermal cell B-albuminous cell C-resin ducts D-cross section of seed coat: ①endocuticle ②exocuticle

图 2 人参 (a) 和西洋参 (b) 种子粉末显微特征

Fig. 2 Microscopic characteristics of *P. ginseng* (a) and *P. quinquefolium* (b) seed powder

3.3 DNA 提取及 PCR 扩增

DNA 提取效率直接影响 PCR 扩增产物的质量。人参样品的 DNA 质量浓度为 (9.04 ± 1.59) mg/L, A_{260}/A_{280} 值为 1.77 ± 0.27 , 西洋参样品的 DNA 浓度为 (12.08 ± 1.96) mg/L, A_{260}/A_{280} 值为 1.79 ± 0.15 。由于样品种子较小, DNA 质量浓度偏低, 但对 PCR 扩增效率并无影响。琼脂糖凝胶电泳中, 所有样本在约 500 bp 处均扩增出单一条带 (图 3-A、B), 表明 PCR 扩增成功。

3.4 ITS2 序列特征及遗传距离分析

人参种子样品 ITS2 序列比对长度为 226 bp, 平均鸟嘌呤和胞嘧啶 (GC) 占 62.83%, 种内遗传距离为 0~0.009, 种内平均遗传距离为 0.002。西

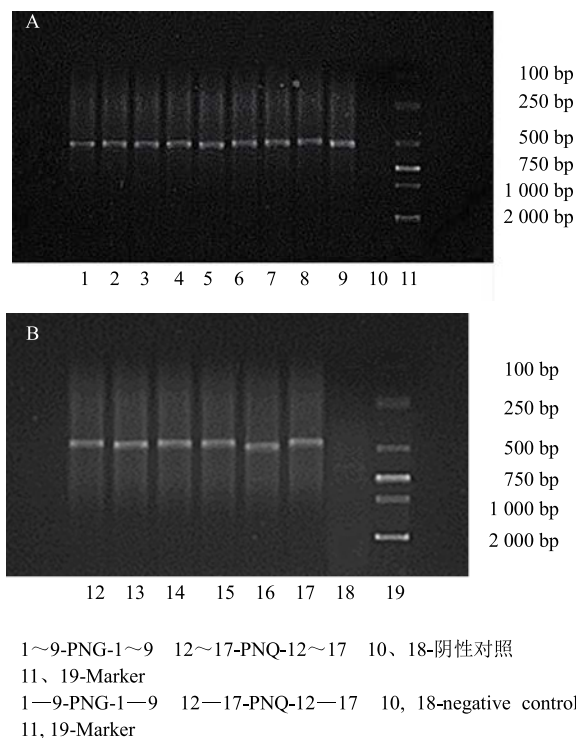


图 3 部分人参 (A) 和西洋参 (B) 种子 ITS2 序列 PCR 产物电泳图

Fig. 3 Electrophoretogram of ITS2 sequence PCR products from some *P. ginseng* (A) and *P. quinquefolium* (B)

洋参种子样品 ITS2 序列比对长度为 230 bp, 平均 GC 含量为 63.48%, 样品种内遗传距离为 0~0.913, 种内平均遗传距离为 0.460, 人参样品与西洋参样品种间 K2P 遗传距离为 1.737~1.966。人参种子共 2 种单倍型, 单倍型 A1 包括序列 PNG-1、PNG-2、PNG-11、PNG-20; 单倍型 A2 包括序列 PNG-3~PNG-10、PNG-12~PNG-19、PNG-21~PNG-25。共含两处变异位点, 分别为在 30 位 C-T 变异, 41 位 T-C 变异。人参单倍型序列特征见图 4-A、B。西洋参种子有 2 种单倍型, 单倍型 B1, 包括序列 PNQ-26~PNQ-30、PNQ-32~37; 单倍型 B2 包括序列 PNQ-31、PNQ-38~42, 种内变异位点较多, 有多个位点缺失。西洋参单倍型序列特征见图 5-A、B。结果表明, 人参与西洋参种内遗传距离分别小于种间遗传距离。

3.5 物种鉴定

将人参与西洋参种子各单倍型与 GenBank 数据库中的数据进行比较, 并提交至中药材 DNA 条形码鉴定系统 (<http://www.tembarcode.cn>) 中进行物种鉴定, 结果见表 2。鉴定结果显示, 人参种子样品各单倍型匹配结果均与 GenBank 中人参物种

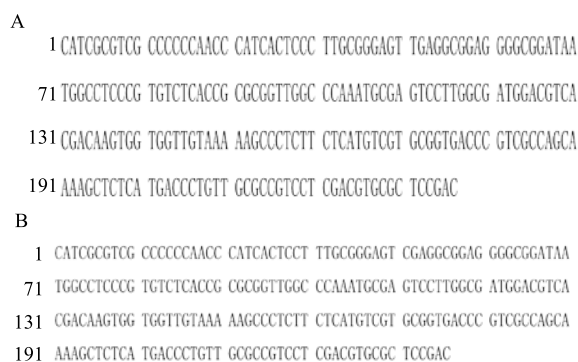


图 4 人参种子 ITS2 序列单倍型 A1 (A) 和 A2 (B)

Fig. 4 Haplotype A1 (A) and A2 (B) of ITS2 sequence of *P. ginseng* seeds

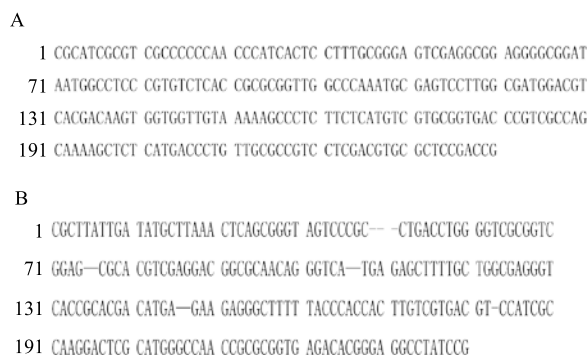


图 5 西洋参种子 ITS2 序列单倍型 B1 (A) 和 B2 (B)

Fig. 5 Haplotype B1 (A) and B2 (B) of ITS2 sequence of *P. quinquefolium* seeds

一致, 西洋参种子样品各单倍型匹配结果均与 GenBank 中西洋参物种一致。

3.6 NJ 树的构建

采用 MEGA 5.0 对各研究样品 ITS2 序列建立 NJ 树。结果显示, 人参与西洋参所统计的各序列分别聚为一支, 能够明显区分 2 个物种。系统发育树图见图 6。

4 讨论

本实验采用 DNA 条形码技术, 从基因层面鉴定人参与西洋参种子真实性和准确性, 解决了传统鉴别方法中受样品形态限制、植物生长期及有无花果的影响, 以及人的主观因素为主导的弊端, 使物种鉴定结果更加精准, 对名贵珍稀中药材种子的鉴定具有重要的指导意义。在分子鉴定技术中, DNA 提取质量会直接影响鉴定结果。为提高 DNA 提取质量, 本研究在 DNA 提取技术和方法上进行改进。由于人参、西洋参种子内脂肪、淀粉、蛋白等含量较高, 在样品处理中, 对种

表 2 种子单倍型鉴定结果

Table 2 Identification of seed haplogroup

单倍型	GenBank 数据库			中药材 DNA 条形码数据库			
	BLAST 鉴定结果	相似度/%	GenBank 登录号	最佳匹配	序列相似性/%	<i>E</i>	Score 值
A1	人参	100	KY120312.1	人参	100.0	$e \times 10^{-126}$	448.0
A2	人参	100	KY120313.1	人参	100.0	$e \times 10^{-126}$	448.0
B1	西洋参	99	KM036297.1	西洋参	100.0	$e \times 10^{-132}$	470.0
B2	西洋参	98	KM036297.1	西洋参	97.9	$e \times 10^{-114}$	410.0



图 6 基于 ITS2 序列构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on ITS2 sequence

子的成分进行抽提, 去除蛋白及脂肪; 由于种子的体积较小且种皮均较硬且厚^[16]、细胞壁分解较难, 人参与西洋参种子样品加裂解液后的水浴时间延长至 3 h, 并加大样品的取样量, 增加 DNA 产率, 从而使 DNA 的提取对鉴定结果无影响。DNA 条形码鉴定指标主要包括序列鉴定、遗传距离分析、NJ 树的构建。本研究首次以人参与西洋参种子样品为研究对象, 发现 2 个物种 ITS2 序列长度分别为 226 bp 和 230 bp, 研究所得实验样本序列与数据库中查询的序列相似度在 97.9% 以上; 且 2 物种的种内最大遗传距离均远小于其种间遗传距离; 人参与西洋参种子样品的 NJ 树分别聚为一支, 两物种能较好区分。研究结果证实 ITS2 序

列可有效区分《中国药典》记载物种人参与同属易混品西洋参的种子, 并在鉴定应用中有很好的稳定性。

本研究首次结合种子的形态学特征、显微特征与 DNA 条形码技术对人参与西洋参种子进行系统鉴定, 研究结果证明 ITS2 序列能够快速、准确、有效鉴定人参与西洋参种子, 方法操作简便, 易于掌握。基于 ITS2 序列的 DNA 条形码技术在种子鉴定中的应用, 保障种质资源鉴别的真实性, 促进中药材种子质量标准的建立与实施。

参考文献

- [1] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药,

- 2016, 47(9): 1443-1457.
- [2] 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.
- [3] 李隆云, 彭 锐, 李红莉, 等. 中药材种子种苗的发展策略 [J]. 重庆中草药研究, 2011, 35(1): 247-252.
- [4] 王 鹏. 西洋参与其混淆品人参的比较鉴别 [J]. 中国药业, 2015, 23(6): 90-91.
- [5] Lo Y T, Li M, Shaw P C. Identification of constituent herbs in ginseng decoctions by DNA markers [J]. *Chin Med*, 2015, 10(1): 1-8.
- [6] 涂 媛, 熊 超, 师玉华, 等. 细小种子类毒性药材天仙子的 DNA 条形码鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(11): 2337-2342.
- [7] 罗红婷. 人参、大黄等六种中药材显微量化研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [8] 向婷婷, 周志勇, 刘朝奇, 等. DNA 条形码鉴定药用植物的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 181-183.
- [9] Yang J, Dong L L, Wei G F, *et al.* Identification and quality analysis of *Panax notoginseng* and *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus* through integrated DNA barcoding and HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(2): 176-182.
- [10] 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.
- [11] 宋晓娜, 顾 选, 刘春生, 等. 基于 trnL-trnF 序列的人参和西洋参 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 1914-1918.
- [12] 孙 涛, 孔德英, 滕少娜, 等. 基于 ITS2 条形码的人参属物种鉴定研究 [J]. 湖北农业科学, 2016(18): 5072-5074.
- [13] 张宝华. 聚焦植物石蜡切片制作 [J]. 吉林省教育学院学报, 2013, 29(4): 153-154.
- [14] Mao R, Xia P, He Z, *et al.* Identification of seeds based on molecular markers and secondary metabolites in *Senna obtusifolia* and *Senna occidentalis* [J]. *Bot Stud*, 2017, 58(1): 43-49.
- [15] 崔占虎, 李 越, 袁庆军, 等. 黄芪与其混伪品的 ITS 序列分子鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 1314-1319.
- [16] 代晓蕾. 西洋参种子发育的形态及生理生化研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.