

• 药材与资源 •

基于 ITS2 序列的海桐皮及其混伪品 DNA 分子鉴定

田 荣¹, 吴 云^{2#}, 谷 巍^{1*}, 单鸣秋¹, 谷宇琛¹, 马丽杰¹, 裴凌峰¹

1. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 应用 ITS2 条形码技术, 对海桐皮 *Erythrinae Cortex* 及其混伪品进行分子鉴定。方法 通过提取 31 份海桐皮药材基原植物刺桐 *E. variegata*、乔木刺桐 *E. arborescens* 及其混伪品的基因组 DNA, 扩增 ITS2 序列并测序; 同时从 GenBank 下载混伪品序列 15 种 38 条, 运用 MEGA 7.0 软件进行序列比对, 进行种间序列差异分析比较, 并构建 Neighbor-joining (NJ) 系统进化树, 预测 ITS2 二级结构。结果 在海桐皮 2 种基原中, 刺桐的 ITS2 序列长度为 232 bp, 乔木刺桐的 ITS2 序列长度为 230 bp, 均为单倍型, 可以明显区分; 同时与其他刺桐属及易混品之间遗传距离较远。NJ 树结果显示刺桐、乔木刺桐及其他易混品均单独聚为一支, 表现出良好的单系性; 依据 ITS2 二级结构, 刺桐、乔木刺桐及其混伪品在 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度均有明显差异, 可以直观地将刺桐与乔木刺桐, 以及其与易混品进行区分。结论 ITS2 序列作为 DNA 条形码能稳定、准确鉴别海桐皮药材, 为保障安全用药提供了新的技术手段。

关键词: 海桐皮; 刺桐; 乔木刺桐; 易混品; ITS2; 物种鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)01-0211-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.025

Molecular identification of *Erythrinae Cortex* and its adulterants based on ITS2 sequenceTIAN Rong¹, WU Yun², GU Wei¹, SHAN Ming-qiu¹, GU Yu-chen¹, MA Li-jie¹, PEI Ling-feng¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective ITS2 barcoding was used to discriminate *Erythrinae Cortex* and its adulterants in order to provide a new method for the identification of *Erythrinae Cortex*. **Methods** The total genomic DNAs were extracted from 31 samples of *Erythrina variegata* var. *orientalis*, *E. arborescens* and its adulterants. The ITS2 sequences of these samples were amplified and bidirectional sequenced by PCR. The obtained sequences were submitted to the GenBank and the ITS2 sequences of 38 samples belonging to 15 species were downloaded from the GenBank. Genetic distance, neighbor joining (NJ) phylogenetic tree and secondary structures of ITS2 sequences were analyzed by using MEGA 7.0. **Results** We found the maximum intraspecific genetic distance (K2P distance) was much smaller than the minimum interspecific genetic distance between *E. variegata* var. *orientalis*, *E. arborescens* and its adulterants. And the NJ tree showed that *E. variegata* var. *orientalis*, *E. arborescens* and its adulterants could be distinguished obviously, which showed high monophyly. In addition, comparing the secondary structure of ITS2 among *Erythrinae Cortex* and its adulterants, it was found that there were significant differences in the number, size, position of loop, and the angle of helix exertion. **Conclusion** ITS2 sequences, as a DNA barcode, can stably and accurately distinguish *Erythrinae Cortex* from its adulterants and it can also provide a new technique to ensure the clinical safety in utilization of Chinese materia medica.

Key words: *Erythrinae Cortex*; *Erythrina variegata* L. var. *orientalis* (L.) Merr.; *Erythrina arborescens* Roxb.; adulterants; ITS2; species identification

收稿日期: 2020-04-09

基金项目: 2019 年医疗服务与保障能力提升补助资金“全国中药资源普查项目”(财社[2019]39 号); 2018 年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2018]43 号); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心项目(ZDXM-3-24)

作者简介: 田 荣(1990—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药资源学。Tel: 13851790328 E-mail: tianrong0128@163.com

*通信作者: 谷 巍 女, 教授, 博士生导师。E-mail: guwei9926@126.com

#共同第一作者: 吴 云(1980—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药制剂、中药新药研究与开发。Tel: 13775589726 E-mail: m1132321451@163.com

海桐皮为豆科植物刺桐 *Erythrina variegata* L. var. *orientalis* (L.) Merr. 或乔木刺桐 *E. arborescens* Roxb. 的干燥树皮。其味苦、辛，性平，具有祛风湿、通经络、杀虫等功效。主治风湿痹痛、痢疾、牙痛、疥癣。其也常用作抗菌剂、抗炎剂、退热剂及防腐剂^[1]。化学研究发现海桐皮所含主要次生代谢产物为生物碱、黄酮及异黄酮类化合物^[2]，其中黄酮及异黄酮类化合物有抗菌、抗炎、抑制 Na^+/H^+ 交换系统活性及抑制磷脂酶 A2 的活性^[3]。海桐皮的提取物还具有抗肿瘤活性，可通过稳定 G-四链体结构，进而抑制端粒酶的活性，破坏肿瘤细胞的永生性，最终导致肿瘤细胞凋亡^[4]。

本草考证表明海桐皮史载于《开宝本草》。《本草图经》云：“海桐皮，出南海以南山谷，今雷州及近海州郡亦有之。叶如手大，作三花尖。皮梓白而坚韧，可做绳，入水不烂。”又云：“岭南有刺桐，叶如梧桐，花侧敷如掌，枝干有刺，花色深红。”按植物形态描述及来源证明与今之海桐皮原植物刺桐相似，且从《本草纲目》《本草推新》《本草备要》的插图也可以看出其为豆科刺桐属植物。

海桐皮药材存在严重同名异物，药用情况混乱、质量不可控的问题，且用药混乱问题由来已久，混用品颇多，且都为不同科属植物，如五加科植物刺楸 *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. 的干燥树皮（川桐皮），芸香科植物椿叶花椒（食茱萸）*Zantnoxylum ailanthoides* Sieb. et Zucc. 和花椒 *Z. molle* Rehd. 的干燥树皮（浙桐皮）等^[5]。同名药材来源的多样性容易混淆使用并使得临床疗效不确定。由于缺乏专业的鉴定人员，而从外观上海桐皮与其他混伪品难以区分，容易造成混用。因此，亟待建立一种迅速、简便有效的鉴定方法来区分海桐皮及其易混品以确保海桐皮种质、种源，保障临床安全用药。

DNA 条形码是当前生物分类学的热门技术，是利用一段有足够变异的、易扩增且相对较短的标准 DNA 片段（500~1000 bp）对物种进行快速、准确的自动鉴定。作为 DNA 候选序列的 ITS2 片段因其具有较强引物通用性、较高测序成功率以及足够的序列变异性，而被大家广泛关注^[6]。当前，国家药典委员会讨论通过在《中国药典》增补本中列入中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则，该指导原则规定植物类药材的 DNA 条形码鉴定以 ITS2 序列为主，其鉴定能力也在药用植物多

个科属基原植物及药材的鉴定中得到了验证^[7-13]。

迄今，海桐皮基原刺桐和乔木刺桐的分子鉴定少见报道。本研究提取刺桐、乔木刺桐及易混品植物 DNA 并测定其 ITS2 序列进行分子鉴定，旨在为海桐皮药材的快速准确鉴定及开发利用奠定基础。

1 材料和仪器

1.1 材料

2018 年 4~10 月，从福建、广东、贵州、云南、浙江省收集刺桐、乔木刺桐及其易混品样品 34 份，均由南京中医药大学谷巍教授鉴定为刺桐 *E. variegata* var. *orientalis* L.、乔木刺桐 *E. arborescens* Roxb.、鸡冠刺桐 *E. cristagalli* L.、韩氏刺桐 *E. haerdii* Verdc.、翅果刺桐 *E. subumbrans* (Hassk.) Merr.、龙牙花 *E. corallodendron* L.、蝙蝠刺桐 *E. vespertilio* Benth.、绒毛刺桐 *E. velutina* Willd.、乙状刺桐 *E. sigmoidea* Hua.、簕欌花椒 *Z. avicennae* (Lam.) DC.、楸木 *Aralia elata* (Miq.) Sentandra (L.) Gaertn.、栓翅刺桐 *E. suberoem.*、木棉 *Bombax ceiba* L.、吉贝 *Ceiba ps* Roxb.、劲直刺桐 *E. stricta* Roxb.、塞内加尔刺桐 *E. senegalensis* DC.、刺楸 *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz.、椿叶花椒 *Z. ailanthoides* Sied. et Zucc.、大叶臭花椒 *Z. myriacanthum* Wall. ex Hook. f.、朵花椒 *Z. molle* Rehd.。其中编号 4~6 的刺桐样品为药材，其他样品是采集植物样品后，按地方标准《四川省中药炮制规范》2015 年版将树皮加工为药材。凭证样本和数字影像信息保于南京中医药大学药学院标本馆，实验材料信息及 GenBank 登录号见表 1。从 GenBank 数据库中下载了相关的 ITS2 序列共 38 条，信息见表 1。

1.2 仪器与试剂

Sigma 3-18K 高速冷冻离心机（Sigma 公司，德国）；Compact 水平蛋白电泳仪（Biometra 公司，德国）；Bio-Rad C1000PCR 扩增仪（Bio-Rad 公司，美国）；Gel DocXR+凝胶成像系统（Bio-Rad 公司，德国）；DP316 植物基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司）、引物由上海捷瑞有限公司合成。

2 方法

2.1 DNA 提取与 PCR 扩增及序列测定

将药材打粉，过 80 目筛，取 100 mg 样品，DNA 的提取参照植物基因组 DNA 提取试剂盒操

表 1 材料产地及其 ITS2 序列信息

Table 1 Habitats of samples used in present study and its ITS2 sequences

编号	植物名	单倍型	序列长度/bp	GC/%	GenBank 登录号	产地
1	刺桐	A1	232	50.4	MN417320	贵阳贵州
2		A1	232	50.4	MN417321	广州广东
3		A1	232	50.4	MN417322	广州广东
4		A1	232	50.4	MN417323	贵阳贵州
5		A1	232	50.4	MN417324	贵阳贵州
6		A1	232	50.4	MN417325	贵阳贵州
7	乔木刺桐	B1	230	48.3	MN422110	广州广东
8		B1	230	48.3	MN422111	广州广东
9		B1	230	48.3	MN908579	广州广东
10		B1	230	48.3	MN908580	广州广东
11		B1	230	48.3	MN908581	广州广东
12	鸡冠刺桐	C1	238	51.3	MN422122	云南西双版纳
13		C1	238	51.3	MN422123	云南西双版纳
14		C1	238	51.3	MN422124	云南西双版纳
15		C1	238	51.3	KJ419280	Gen Bank
16		C1	238	51.3	FN825780	Gen Bank
17		C2	238	50.8	MN422125	福州福建
18	韩氏刺桐	C3	237	51.5	KJ419281	Gen Bank
19		E1	236	49.6	MN422116	云南西双版纳
20		E1	236	49.6	MN422117	云南西双版纳
21		E1	236	49.6	MN422118	云南西双版纳
22	翅果刺桐	F1	234	47.0	MN422114	云南西双版纳
23		F1	234	47.0	MN422119	云南西双版纳
24		F1	234	47.0	MN422120	云南西双版纳
25		F1	234	47.0	MN422121	云南西双版纳
26		F1	234	47.0	MN422115	云南西双版纳
27		F2	234	47.0	JX856449	Gen Bank
28	龙牙花	G1	231	51.1	MN422112	云南西双版纳
29		G2	231	52.1	MN422113	云南西双版纳
30	蝙蝠刺桐	H1	238	47.5	JX856454	Gen Bank
31		H1	238	47.5	JX856452	Gen Bank
32	绒毛刺桐	I1	236	49.6	JX856570	Gen Bank
33		I1	236	49.6	JX856571	Gen Bank
34	乙状刺桐	J1	236	46.6	KX057871	Gen Bank
35	箭欏花椒	K1	224	73.6	KF977621	Gen Bank
36		K1	224	73.6	KF977615	Gen Bank
37		K1	224	73.6	KF977619	Gen Bank
38		K1	224	73.6	KF977618	Gen Bank
39		K1	224	73.6	KF977617	Gen Bank
40		K2	225	74.2	KF977620	Gen Bank
41	榕木	K3	224	73.2	KF977616	Gen Bank
42		L1	230	60.0	MH117432	Gen Bank
43		L1	230	60.0	MH117431	Gen Bank
44		L1	230	60.0	U63181	Gen Bank

续表 1

编号	植物名	单倍型	序列长度/bp	GC/%	GenBank 登录号	产地
45	木棉	M1	237	72.2	DQ826447	Gen Bank
46	吉贝	N1	230	68.7	KM453169	Gen Bank
47		N1	230	68.7	HQ658386	Gen Bank
48	栓翅刺桐	O1	233	45.9	JX856569	Gen Bank
49	劲直刺桐	P1	239	62.3	KR532088	Gen Bank
50	塞内加尔刺桐	Q1	220	50.0	KX057870	Gen Bank
51	刺楸	R1	230	63.9	MN422126	江苏南京
52		R1	230	63.9	MN422127	江苏南京
53		R1	230	63.9	MN422128	江苏南京
54		R1	230	63.9	MN422129	辽宁丹东
55		R1	230	63.9	MN422130	辽宁丹东
56		R1	230	63.9	AJ786228	Gen Bank
57		R1	230	63.9	MG217641	Gen Bank
58		R1	230	63.9	JQ048757	Gen Bank
59		R1	230	63.9	JQ048756	Gen Bank
60		R1	230	63.9	JQ048755	Gen Bank
61		R2	230	63.5	AY256899	Gen Bank
62	椿叶花椒	T1	224	69.2	MN422131	浙江舟山
63		T1	224	69.2	MN422132	浙江舟山
64		T1	224	69.2	MN422133	浙江舟山
65		T1	224	69.2	MN422134	福建福州
66		T1	224	69.2	MH016477	Gen Bank
67		T1	224	69.2	MH016478	Gen Bank
68	大叶臭花椒	S1	224	72.8	MG730220	Gen Bank
69		S1	224	72.8	KP093220	Gen Bank
70		S1	224	72.8	KP093219	Gen Bank
71		S1	224	72.8	MG730221	Gen Bank
72	朵花椒	U1	226	67.3	MF039518	Gen Bank

作步骤进行（水浴时间调整为 60 min）。（ITS2）序列扩增正向引物 5'-ATGCGATACT-TGGTGTGAAT-3'；反向引物 5'-GACGC-TTCTCCAGACTACAAT-3'。扩增体系（25 μL）为 10×PCR buffer（无 MgCl₂）2.5 μL，MgCl₂（25 mmol/L）2 μL，dNTP 2 μL，正、反向引物各 1 μL，Taq 酶 0.25 μL，模板 2 μL，双蒸水 14.25 μL。ITS2 序列扩增程序为 94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，56 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，40 个循环；72 ℃延伸 10 min。测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成，每个样本重复 3 次测序。

2.2 数据处理

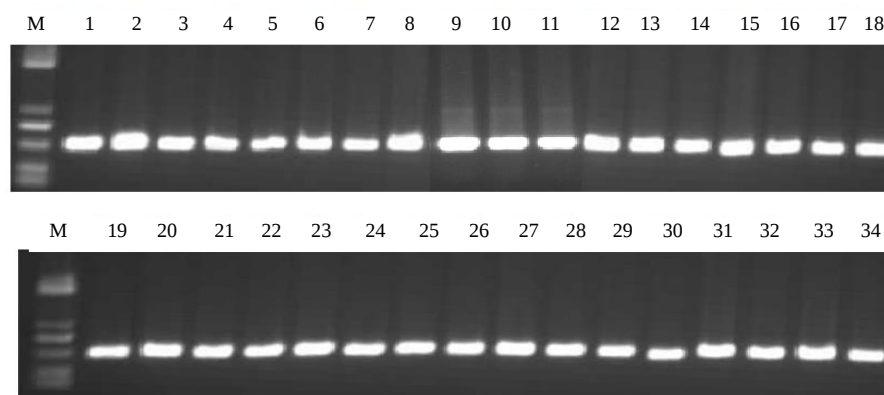
测序后所得峰图采用 Codon Code AlignerV 2.06（Codon Code Co., 美国）校对拼接，去除低质量序列及引物区；使用基于隐马尔可夫模型的 HMM 注释方法^[14]，去除拼接得到的一致序列的两端 5.8 S 和 28 S 区段^[15]（可将序列提交至 <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de> 进行注释），获得标准 ITS2 间隔区序列。研究采用 MEGA5.0 软件^[16]比

所有序列，计算种内序列变异和种间序列变异，不同物种的单倍型为 A1、B1，同一物种存在变异位点的单倍型为 A1、A2，分析变异位点的信息确定不同的单倍型^[17]，采用相似性搜索法（BLAST1）和最小距离法（nearest distance）^[18]考察 ITS2 序列的鉴定成功率，构建 Neighbor-joining（NJ）系统进化树评估各物种之间的亲缘性。根据 Koetschan 等^[19]建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 二级结构。

3 结果与分析

3.1 海桐皮药材及其易混品药用植物 PCR 扩增效率及测序成功率

对所有实验样本的 ITS2 序列分析发现，PCR 扩增及测序成功率均为 100%，序列获得率（有效序列比例）亦为 100%，经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳得到 PCR 扩增电泳图，扩增效果较好，条带较亮，没有拖尾现象。扩增序列长度范围在 450~550 bp（图 1），除去 5.8 S 和 28 S rRNA 序列后，ITS2 序列长度范围在 224~238 bp，GC 含量为 47.0%~69.2%，平均 GC 含量为 52.79%。



M-Marker 1~6-刺桐 7~11-乔木刺桐 12~15-鸡冠刺桐 16~18-韩氏刺桐 19~23-翅果刺桐 24~25-龙牙花 26~30-刺楸 31~34-椿叶花椒
M-Marker 1—6-*E. variegata* var. *orientalis* 7—11-*E. arborescens* 12—15-*E. cristagalli* 16—18-*E. haerdii* 19—23-*E. subumbrans*
24—25-*E. coraliodendron* 26—30-*K. septemlobus* 31—34-*Z. ailanthoides*

图 1 样本的 ITS2 序列凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of ITS2 sequences of samples

3.2 海桐皮药材与其易混品的 ITS2 序列差异研究

本实验中各地采集的刺桐之间无变异位点，而与其易混品之间存在多个变异位点。刺桐不同来源的 ITS2 序列共 6 条，序列长度为 232 bp，ITS2 序列的 GC 含量为 50.4%，种内无变异位点，为单倍型，种内 K2P 遗传距离为 0；乔木刺桐 ITS2 序列长度为 230 bp，ITS2 序列的 GC 含量为 48.3%，种内无变异位点，为单倍型，种内 K2P 遗传距离为 0；说明刺桐及乔木刺桐种内 ITS2 序列高度保守。刺桐、乔木刺桐与海桐皮易混品的 K2P 距离为 0.125 1~0.951 4、0.063 7~0.968 0，海桐皮 2 种基原种内最大遗传距离均小于其与易混品的种间最小遗传距离（表 2），具有明显的条形码间距，说明 K2P 距离可很好地区分开海桐皮药材及其易混品。实验样品中各物种 ITS2 序列，长度、GC 含量见表 1。将实验数据和 GenBank 数据库下载的数据结合，在更大样本量下考察海桐皮药材及其易混品的变异情况。结果表明，刺桐及乔木刺

桐与其易混品的种间变异差异明显，ITS2 可以将其区分开，刺桐与乔木刺桐差异也较为明显，可以加之区分。

3.3 海桐皮药材与其易混品的 ITS2 序列变异位点分析

3.3.1 海桐皮药用植物不同来源样品种间变异分析 通过对不同来源的 6 份刺桐样品的 ITS2 序列分析，发现其 ITS2 序列无变异位点，为单倍型。乔木刺桐种内亦无变异位点，为单倍型；刺桐与乔木刺桐 ITS2 序列种间存在 27 个变异位点，可以明显区分。

3.3.2 海桐皮易混品植物种内变异分析 对海桐皮易混品之间进行种内变异统计分析，变异位点及单倍型统计见表 3。鸡冠刺桐种内为 3 个单倍型，存在 2 个变异位点；筋欏花椒种内为 3 个单倍型，存在 2 个变异位点；刺楸种内为 2 个单倍型，存在 1 个变异位点；翅果刺桐存在 2 个单倍型，有 7 个变异位点；龙牙花种内为 2 个单倍型，存在 2 个变异位点。

3.4 海桐皮药材及其易混品 ITS2 序列分析

采用 BLAST 和最近距离法对刺桐、乔木刺桐与其易混品进行鉴定研究，2 种方法分析结果均表明 ITS2 序列可以准确地将海桐皮与其易混品之间鉴别开。为了更直观地反映鉴定结果，本研究基于相似性搜索法和最近距离法结果构建了 NJ 系统聚类树，bootstrap 1000 次重复，枝上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。见图 2。结果表明，刺桐与乔木刺桐分别聚为一支，且互有区别。

表 2 ITS2 序列的种间差异和种内变异分析

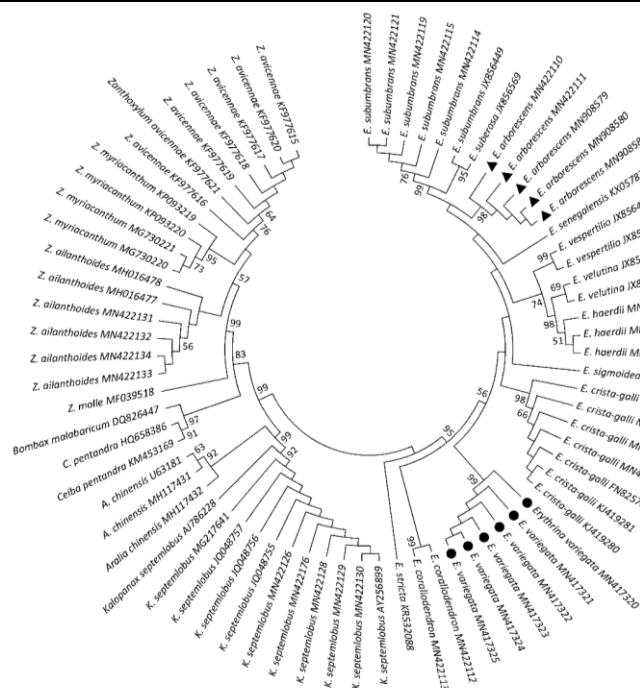
Table 2 Analyses of interspecific divergence and intraspecific variations of ITS2 sequences

样品名	K2P 距离范围
刺桐种内	0.000 0
乔木刺桐种内	0.000 0
刺桐与乔木刺桐种间	0.134 7
刺桐与所有混伪品种间	0.125 1~0.951 4
乔木刺桐与所有混伪品种间	0.063 7~0.968 0

表 3 海桐皮易混品药用植物种内变异分析

Table 3 Intraspecific variable sites in ITS2 sequences of adulterants of *Erythrinae Cortexi*

植物名	变异位点													
	16	44	47	51	79	98	119	158	180	214	239	251	255	264
鸡冠刺桐 (FN825780)	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T
鸡冠刺桐 (MN422125)	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T
鸡冠刺桐 (KJ419281)	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G
簕欓花椒 (KF977619)	*	*	A	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
簕欓花椒 (KF977620)	*	*	A	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
簕欓花椒 (KF977616)	*	*	G	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
刺楸 (AJ786228)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*
刺楸 (AY256899)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*
翅果刺桐 (MN422115)	*	G	*	*	A	*	C	C	T	G	*	*	C	*
翅果刺桐 (JX856449)	*	T	*	*	T	*	T	A	A	T	*	*	T	*
龙牙花 (MN422112)	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	G	*	*	*
龙牙花 (MN422113)	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	C	*	*	*



bootstrap 1000 次重复, 枝上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$

Percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in 1000 bootstraps are shown next to the branches. The branch of numerical display only the bootstrap support rate greater than 50%

图 2 基于 ITS2 序列构建的海桐皮及其易混品 NJ 树

Fig. 2 NJ tree based on ITS2 sequences from *Erythrinae Cortexi* and its adulterants

同时, 与其他物种之间遗传距离较远, 物种之间可以明显区分。

3.5 海桐皮药材与其易混品 ITS2 序列二级结构

根据 Koetschan 等^[19]建立的 ITS2 数据库及其网站预测刺桐、乔木刺桐与其易混品的 ITS2 二级结构 (图 3), 可以看出所有物种的二级结构均为一个中心环 (主环) 及 4 个螺旋区 (helix) 构成, 每个螺旋上又有大大小小、或多或少的茎环

(loop) 结构。由于没有参考模型, 部分物种的 ITS2 序列的二级结构无法显示。在同一物种中臂环的数量、大小和角度没有显著差异, 但不同物种间存在显著差异。通过比较海桐皮与其易混品的 ITS2 二级结构发现, 各物种在 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度均有明显差异, 因此, 依据 ITS2 二级结构, 可以直观地将刺桐、乔木刺桐与其易混品区分。

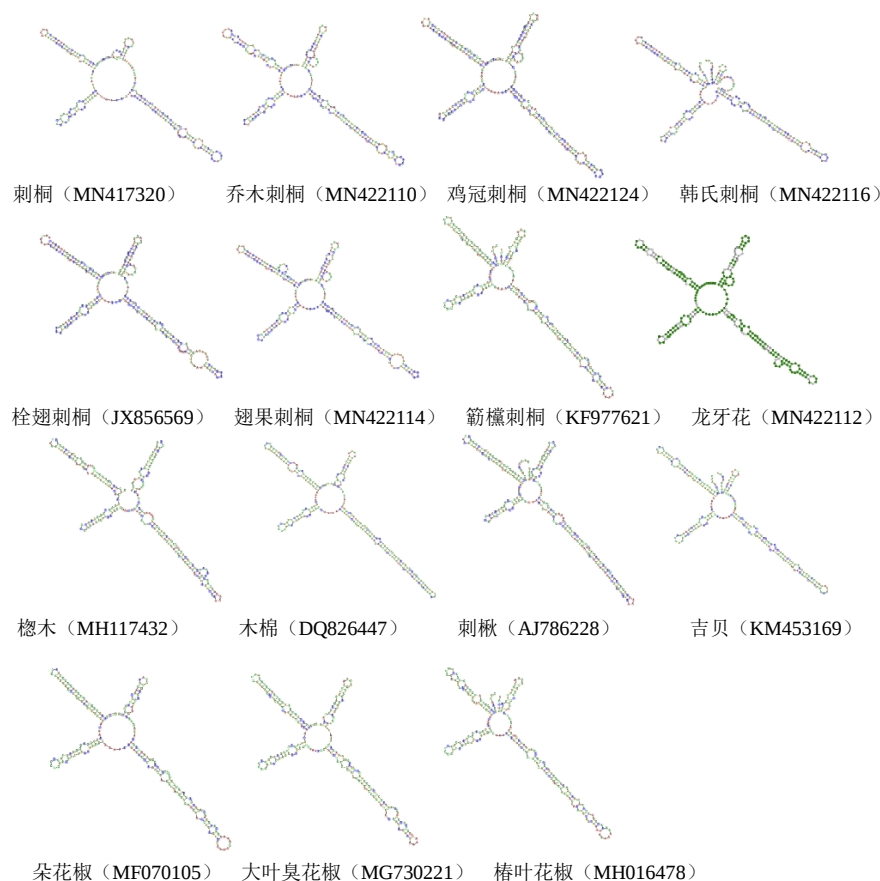


图 3 海桐皮及其易混品药用植物 ITS2 序列的二级结构

Fig. 3 Secondary structures of ITS2 sequences in *Erythrinae Cortexi* and its adulterants

4 讨论

DNA 条形码技术在物种鉴定以及相关领域的应用研究已成为现代生物学活跃的研究领域和新的热点问题之一，也是未来物种鉴定的发展趋势^[20-21]。同传统中药材的性状、显微、理化鉴定方法一样，DNA 条形码鉴定技术的准确性和稳定性也是业内研究的重点问题。所谓稳定性是指不同产地、不同批次的样品均能够稳定获得 DNA 条形码序列。

中药材因历史渊源、民间习俗等原因，长期存在异药同名的现象，加之中药材市场的混乱，造成中药材品种难以区别的现象。海桐皮为同名异药的典型，各地均有该名称药材，而基原植物品种相差甚远。无论是海桐皮、浙桐皮还是川桐皮均以树皮入药，难以从外观上准确鉴定，尤其是对于非植物鉴定专业人员^[22]。因此，本研究从分子鉴定方法入手，建立了一种快速鉴定海桐皮基原植物的方法。

本实验分析海桐皮及其易混品药用植物样品

的 ITS2 序列，结果显示所有实验样本的 PCR 扩增、测序成功率及序列获得率为 100%，PCR 产物均经过电泳检测，并有清晰明亮条带，说明 ITS2 在海桐皮的鉴定中是有效的 DNA 区段，ITS2 序列引物及其反应条件针对海桐皮药用植物稳定性较好。在对药材样品进行 DNA 提取时，需要增大样品量，同时延长水浴时间，可以提取得到较高质量的 DNA。海桐皮 2 种基原种内最大遗传距离均小于其与易混品的种间最小遗传距离，具有明显的条形码间距，说明海桐皮及其易混品之间在分子水平上存在的差异是明显的，通过 K2P 距离可很好地区分开。同时，在基于 NJ 法构建的系统聚类树中，不同物种单独聚为一小支，呈现出良好的单系性，ITS2 二级结构所揭示的分子形态学特征也直观显示出海桐皮与其混伪品的明显差异。依据 ITS2 二级结构，海桐皮与其混伪品在 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度均有明显差异，可以直观地将海桐皮与易混品区分。因此，作为 DNA 条形码的 ITS2 序列能

够准确、简便地鉴定海桐皮及其易混品药用植物，为海桐皮的鉴别提供了新的分子鉴定方法，保证了海桐皮临床选择用药的准确安全。

DNA 条形码技术可以直接从基因水平提供鉴定依据，将有助于非分类学专业工作者对中药药用植物进行快速、准确地鉴定，是传统鉴定方法的补充和拓展，具较好的推广和应用价值^[23-24]。本研究结果分析了 DNA 条形码技术应用于药用植物鉴定中的问题，证明了 ITS2 序列作为 DNA 条形码能稳定、准确鉴别海桐皮药用植物，为实际生产中确认药材基原植物，为保障临床安全用药提供有效手段。

志谢：贵阳中医学院药学院孙庆文、福建中医药大学药学院杨成梓、安徽中医药高等专科学校李林华、辽宁中医药大学药学院许亮、江苏省中医院药学部朱育凤主任、中国科学院植物研究所吴宝成、南京中医药大学翰林学院李琳等在实验样品采集过程中提供的帮助。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 田月琴. 海桐皮质量标准及药效学研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2014.
- [2] 赵浩恩, 金传山, 许凤清. 刺桐属植物的生物碱类成分及药理作用的研究进展 [J]. 广州化工, 2018, 46(09): 13-16.
- [3] 徐宇, 郭礼跃, 梁江, 等. 基于生信分析对国医大师刘尚义痹证药对豨薟草、海桐皮治疗骨关节炎靶基因的预测研究 [J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7(10): 10-14.
- [4] 张虹, 向俊锋, 谭莉, 等. 海桐皮提取物的抗肿瘤活性及其机制研究 [J]. 药学学报, 2009, 44(12): 1359-1363.
- [5] 张俊红. 中药合欢皮、秦皮和海桐皮的鉴别分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(25): 161.
- [6] Kekkonen M, Hebert P D N. DNA barcode-based delineation of putative species: Efficient start for taxonomic workflows [J]. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14(4): 706-715.
- [7] Ren F M, Wang Y W, Xu Z C, et al. DNA barcoding of *Corydalis*, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae [J]. *Ecol Evol*, 2019, 9(4): 1934-1945.
- [8] Zhu S, Li Q W, Chen S C, et al. Phylogenetic analysis of *Uncaria* species based on internal transcribed spacer (ITS) region and ITS2 secondary structure [J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 548-558.
- [9] Han J P, Shi L C, Li M H, et al. Relationship between DNA barcoding and chemical classification of *Salvia L.* medicinal herbs [J]. *Planta Med*, 2009, 75(4): 268-275.
- [10] Tahir A, Hussain F, Ahmed N, et al. Assessing universality of DNA barcoding in geographically isolated selected desert medicinal species of Fabaceae and Poaceae [J]. *Peer J*, 2018, 6: e4499.
- [11] Gu W, Song J Y, Cao Y, et al. Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plants of Selaginellaceae in Pteridophyta [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67818.
- [12] Sun X Q, Zhu Y J, Guo J L, et al. DNA barcoding the *Dioscorea* in China, a vital group in the evolution of monocotyledon: Use of matK gene for species discrimination [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32057.
- [13] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, et al. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification [J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 165-170.
- [14] Mei Q X, Chen X L, Xiang L, et al. DNA barcode for identifying *Folium Artemisiae Argyi* from counterfeits [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(9): 1531-1537.
- [15] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [16] 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.
- [17] 刘琪, 谷巍, 杨兵, 等. 基于 ITS2 序列的滨海白首乌及其近缘种 DNA 分子鉴定 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5901-5909.
- [18] 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.
- [19] Koetschan C, Hackl T, Müller T, et al. ITS2 Database IV: Interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2012, 63(3): 585-588.
- [20] 黄建峰, 李朗, 李捷. 樟属植物 ITS 序列多态性分析 [J]. 植物学报, 2016, 51(5): 609-619.
- [21] Ankenbrand M J, Keller A, Wolf M, et al. ITS2 database V: Twice As much: Table 1 [J]. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(11): 3030-3032.
- [22] 田月琴, 刘锐玲, 李飞飞, 等. 海桐皮及其易混品的比较鉴别 [J]. 光明中医, 2014, 29(12): 2530-2533.
- [23] 方强强, 王燕, 彭春, 等. 中药 DNA 条形码分子鉴定技术的应用与展望 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 197-205.
- [24] 任梦云, 杜乐山, 陈彦君, 等. 锁阳 ITS 序列遗传多样性分析 [J]. 植物学报, 2018, 53(3): 313-321.

[责任编辑 时圣明]