

应用种子形态及 DNA 条形码技术鉴定黄芪及混伪品种子

李 军^{1*}, 张召雷², 王晓敏³, 刘立轩¹, 冷晓红¹

1. 宁夏职业技术学院 宁夏中药材开发与利用工程技术研究中心, 宁夏 银川 750021

2. 承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000

3. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021

摘要: **目的** 采用传统形态鉴定方法结合 DNA 条形码分子检测技术对黄芪及混伪品种子进行鉴定。**方法** 收集黄芪及混伪品种子、市售黄芪种子样品共 58 份, 利用体视显微镜和游标卡尺进行种子外观形态特征的观察和记录, 测定千粒重; 提取单粒种子的基因组 DNA, PCR 扩增、双向测序获得 ITS2 及 psbA-trnH 序列。使用邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建系统发育树, kimura 二参数 (kimura two-parameter, K2P) 模型计算遗传距离, 进行物种鉴定分析。**结果** 黄芪及混伪品种子在颜色、形状、长、宽、厚度及千粒重等方面存在细微差别; ITS2 的测序成功率为 100%, 黄芪种间最小遗传距离均大于种内最大遗传距离; ITS2 序列构建的 NJ 系统进化树将蒙古黄芪 *A. mongholicus* var. *mongholicus* 聚为独立一支, 并将蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*、紫花苜蓿 *Medicago sativa*、锦鸡儿 *Caragana sinica*、蜀葵 *Althaea rosea* 及黄芪属其他物种分开, 可进行黄芪及其混伪品种子的鉴定。基于外观形态和 ITS2 条形码序列鉴定发现 12 份市售黄芪种子中有 1 份为斜茎黄芪。**结论** 基于种子形态鉴定和 ITS2 条形码相结合的方法可以准确鉴定黄芪及混伪品种子, 为规范黄芪种源及种植生产, 进而保障黄芪药材质量提供科学依据。

关键词: 黄芪; 种子; 蒙古黄芪; 扁茎黄芪; 斜茎黄芪; 紫云英; 外观形态; ITS2; DNA 条形码; 系统发育分析

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)24-7871-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.024

Identification of *Astragalus membranaceus* seeds and its adulterants by morphology and DNA barcoding technique

LI Jun¹, ZHANG Zhao-lei², WANG Xiao-min³, LIU Li-xuan¹, LENG Xiao-hong¹

1. Ningxia Research Center for Development and Utilization of Chinese Medicinal Materials, Ningxia Polytechnic, Yinchuan 750021, China

2. Hebei Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Chengde Medical University, Chengde 067000, China

3. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: Objective Using the traditional morphological identification method in combination with DNA barcoding technique, *Astragalus mongholicus* seeds and the adulterants were authenticated. **Methods** A total of 58 samples including cultivated, marketed *A. mongholicus* seeds and the adulterants were collected. Seeds morphological characters were determined using stereomicroscope and vernier caliper observations, along with calculation of their 1000-grain weights. Genomic DNA was extracted from the single seed. PCR and bidirectional sequencing yielded the ITS2 and *psbA-trnH* sequences. Species identification were employed, using kimura two-parameter model (K2P) genetic distance method and neighbor joining (NJ) phylogenetic analysis. **Results** Slight differences in color, shape, length, width, thickness and 1000-grain weight among *A. mongholicus* seeds samples and the adulterants could be observed. The ITS2 sequencing success rate was 100%. The minimum genetic distance between species of *A. mongholicus* was greater than the maximum genetic distance within species. The NJ dendrogram of ITS2 sequences indicated that all the *A. membranaceus* var. *mongholicus* seeds could form independent branches, which could be distinguished from *Medicago sativa*, *Caragana sinica*, *Althaea rosea* and other species of *Astragalus* in the collected samples, thus possessing the ability to authenticate *A. mongholicus* seeds from the adulterants. Based on seed morphology and ITS2 barcoding identification strategy, one *Astragalus laxmannii* sample was identified from the 12 marketed *A. mongholicus* seeds samples. **Conclusion**

收稿日期: 2022-09-13

基金项目: 宁夏回族自治区教育厅高等学校科学研究项目资助 (NGY2020132)

*通信作者: 李 军 (1982—), 男, 山西浑源人, 硕士, 副教授, 主要从事中药资源及开发利用研究。E-mail: lijunamy@126.com

Based on the combination of seed morphology and ITS2 sequence barcoding identification, the *A. mongholicus* seeds and the adulterants can be accurately identified, which provides scientific bases for standardizing the source and cultivation of *A. mongholicus*, ensuring the quality of Chinese medicinal materials *Astragalus Radix*.

Key words: *Astragalus mongholicus* Bunge; seed; *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; *A. complanatus* R. Ex Bge.; *A. laxmannii* Jacquin; *A. sinicus* L.; morphology; ITS2; DNA barcoding technique; phylogenetic analysis

黄芪原名黄耆,始载于《神农本草经》^[1],宋代《图经本草》载:“今出原州(宁夏固原)及华原(陕西耀县)者也佳。”^[2]。《中国药典》2020 年版规定豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根作为黄芪入药^[3]。黄芪的主要有效成分皂苷、黄酮等,有抗炎、降压、抗心肌缺血损伤、抗衰老、抗慢性肾病、调节免疫、保肝和清除自由基等作用^[4]。由于黄芪具有优良的补气固表、敛疮生肌等功效,国内外市场对黄芪的需求极大,进而导致野生黄芪资源逐渐匮乏,目前市场上商品黄芪大多为栽培品种^[5-6],主要分布在山西、宁夏、内蒙古、陕西省毗邻的干旱少雨沙生草原区^[7],种植规模不断扩大。但存在种源混乱、种质混杂等现象,黄芪种子作为中药材种植的源头,质量参差不齐,鉴定错误的种子不仅会带来严重的经济损失,也会给临床用药带来极大的安全隐患。

黄芪及混伪品种子如斜茎黄芪、扁茎黄芪和紫云英外观形态相似,传统方法易受鉴定人员经验、种子成熟度和外部环境的影响,难以进行准确鉴定^[8-9]。因此需要一种更加客观、准确的鉴定方法对传统鉴定方法进行补充。DNA 条形码技术具有通用性、客观性、准确性等特点^[10-11],已是传统形态鉴别方法的辅助手段和有效补充,可以实现对生物物种的准确、快速鉴别^[12-13]。目前,DNA 条形码鉴定技术已经在黄芩、木通、钩藤和北苍术等种子鉴定中取得了良好的效果^[14-18],成为近年来种子鉴定研究的重点和亮点。当前,黄芪种植及需求量越来越多,种源鉴定困难,关于黄芪种子的分子鉴定较少且未进行系统研究^[19]。因此,本研究拟利用外观形态和 DNA 条形码技术系统地黄芪及其混伪品种子进行鉴定研究,以期建立一种客观、准确、高效的黄芪种子鉴定方法,以保障其种子的物种准确,为市场流通黄芪种子的规范化管理提供技术支持,为从源头解决黄芪药材质量问题提供科学依据,并为中药黄芪的临床用药安全提供保障。

1 材料与仪器

1.1 材料

本研究共收集黄芪及其混伪品种子样本 58 份,分别来自宁夏、山西、内蒙古、甘肃和江苏等多个省份,其中来源于黄芪及其混伪品原植物的种子样品 46 份,原植物标本经宁夏农业科学院李明研究员及宁夏职业技术学院郭鸿雁教授鉴定分别为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao、扁茎黄芪 *A. complanatus* R. ex Bge.、斜茎黄芪 *A. laxmannii* Jacquin 及紫云英 *A. sinicus* L.,市售待检样品 12 份。所有样品均保存于宁夏中药材开发与利用工程技术研究中心。样品采集信息见表 1。

同时本研究从 GenBank 数据库下载条形码序列^[19],共整理黄芪与锦鸡儿、蜀葵、紫云英、白花草木樨等混伪品的 37 条有效条形码序列(表 2)。

1.2 试剂

DL2000 Marker、RNase 酶、植物基因组 DNA 提取试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司;psbA-trnH、ITS2 序列引物由上海生工生物工程有限公司合成;琼脂糖购自西班牙 Biowest Agarose 公司;2×Taq plus Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;GelRed 染料购自美国 Biotium 公司。

1.3 仪器

M205FA 型高级研究级体视显微镜(德国莱卡有限公司);MyCycler PCR 仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统、Powerpac Basic 型琼脂糖凝胶电泳仪(美国伯乐有限公司);MiniSpin plus 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Geno 2010 型高通量组织研磨机(美国 SPEX SamplePrep 公司);Nanodrop ONE 型微量分光光度计(美国 NanoDrop 公司);YXQ-LS-50S 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯仪器有限公司);Mini 型离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);SZ-1 型涡旋混合器(常州国宇仪器制造有限公司);HHSY21-Ni4-C 型恒温水浴锅(北京长源实验设备厂)。

表 1 蒙古黄芪及混伪品种子样品信息

Table 1 Information of *A. membranaceus* var. *mongholicus* seeds and its adulterants

物种名	样品编号	样品来源	GenBank 登录号	
			ITS2	psbA-trnH
蒙古黄芪	D1	宁夏隆德	OP169082	OP356211
	E1	内蒙古海拉尔	OP169085	OP356214
	G1	山西浑源	OP169086	—
	H1	山西浑源	OP169089	OP356217
	L1	甘肃陇西	OP169094	OP356222
	M1, M2	内蒙古	OP169095、OP169096	OP356223、OP356224
	N1	内蒙古	OP169106	OP356234
	P1	宁夏彭阳	OP169107	OP356235
	S1	山西	OP169112	OP356240
	T1	内蒙古扎兰屯	OP169115	OP356249
	X1, X2	甘肃	OP169116、OP169117	OP356250
	Y1	宁夏固原	OP169118	OP356251
	D2	宁夏隆德	OP169083	OP356212
	J1	江苏宿迁	OP169091	OP356219
	MC2, MC3	内蒙古赤峰	OP169097、OP169098	OP356225、OP356226
	MK1	内蒙古克什克腾旗	OP169101	OP356229
	ME1	内蒙古准格尔旗	OP169100	OP356228
	MW1	内蒙古乌拉特前旗	OP169104	OP356232
	MZ2	内蒙古巴彦淖尔	OP169104	OP356233
	P2	宁夏彭阳	OP169108	—
	P3	宁夏彭阳	OP169109	OP356237
	Q1, Q2	青海西宁湟中区	OP169110、OP169111	OP356238、OP356239
	D3	宁夏隆德	OP169084	OP356213
	H2	山西浑源	OP169090	OP356218
	MN1, MN2	内蒙古牛营子镇	OP169102、OP169103	OP356230、OP356233
	MC4	内蒙古赤峰	OP169099	OP356227
	G2, G3	甘肃	OP169087、OP169088	OP356215、OP356216
	J4, J5	江苏	OP169092、OP169093	OP356220、OP356221
	SL3, SL4	陕西商洛	OP169113、OP169114	OP356241、OP356242
扁茎黄芪	SY1	湖北	OP169119	OP356243
	SY6	四川	OP169124	OP356248
	SY2	陕西	OP169120	OP356244
	SY3	陕西	OP169121	OP356245
	SY4	甘肃	OP169122	OP356246
斜茎黄芪	SY5	河北	OP169123	OP356247
	ZH1	甘肃酒泉	OP169125	OP356252
	ZH2	宁夏盐池	OP169126	OP356253
紫云英	ZS1	陕西商洛	OP169127	OP356254
	ZY1	河南	OP169128	—

表 2 GenBank 的 DNA 条形码序列登录号

Table 2 Accession numbers of DNA barcodes from GenBank

条形码序列	物种名	拉丁学名	GenBank 登录号
ITS2	蒙古黄芪	<i>A. mongholicus</i> var. <i>mongholicus</i>	KJ999323、KX674824、MF096040
	紫花苜蓿	<i>Medicago sativa</i>	GU217662、KJ999311、ON524602
	扁茎黄芪	<i>A. scomplanatus</i>	KM588073、KT582019、KT582020
	斜茎黄芪	<i>A. slaxmannii</i>	KX954974、MG234683、MG236303
	紫云英	<i>A. sinicus</i>	KX955026、MH808434、MH808435
	白花草木樨	<i>Melilotus albus</i>	U50763
	锦鸡儿	<i>Caragana sinica</i>	GU217654
	蜀葵	<i>Althaea rosea</i>	ON524595、KU182879
	蒙古黄芪	<i>A. membranaceus</i>	GU396752、GU396753、KJ999273
	紫花苜蓿	<i>Medicago sativa</i>	GU396781、MK792215、MK792216
psbA-trnH	扁茎黄芪	<i>A. complanatus</i>	MK792205、MK792206、MK792207
	白花草木樨	<i>Melilotus albus</i>	MN533294、MW242028、MN533272
	锦鸡儿	<i>C. sinica</i>	GU396767、MT949613、MN224239
	蜀葵	<i>A. rosea</i>	MG947063、MF348839、EF679744

2 方法

2.1 种子外观形态特征观察

从每份种子样品中随机选取 20 粒进行观察,用体视显微镜观察种子的形状、颜色、表面纹理等外观形态特征,并拍照记录;用数显游标卡尺测量供试种子的长度、宽度和厚度;从充分混匀的净种子样品中随机选取做 3 个重复,每个重复 100 粒种子称定质量,取平均值并估算其千粒重。

2.2 DNA 提取及质量检测

取单粒种子样品,用 75%乙醇擦拭表面,自然挥干,放入 2.0 mL 离心管,加入钢珠 2 枚,−80 ℃ 冰箱冷冻 2 h,用高通量组织球磨仪研磨 8 min(4000 r/min),采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总

DNA,详细操作参照试剂盒说明书^[20]。并使用 Nanodrop ONE 型微量分光光度计检测种子 DNA 的浓度和质量。

2.3 PCR 扩增及测序

本研究选用国际通用序列 ITS2 及 *psbA-trnH* 2 条 DNA 条形码候选序列。2 对引物序列及 PCR 反应条件见表 3。PCR 体系为 25 μL, 包含 2×Taq Plus Master Mix 12.5 μL, 正反向引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 9.5 μL^[21]。取 4 μL PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶(含 GelRed 染料)电泳,在凝胶成像仪中观察并拍照保存。并将 PCR 产物送至中国农业科学院作物科学研究所进行双向测序。

表 3 所用引物序列及相应 PCR 反应条件

Table 3 Sequences of used primers and corresponding PCR reaction conditions

条形码	引物名称	引物序列(5'-3')	PCR 反应扩增参数
ITS2	2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	95 ℃、1 min; 95 ℃、30 s; 56 ℃、30 s; 72 ℃、54 s; 40 个循环; 72 ℃、10 min
	3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
<i>psbA-trnH</i>	fwd PA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	95 ℃、1 min; 95 ℃、30 s; 58 ℃、1 min; 72 ℃、30 s; 35 个循环; 72 ℃、10 min
	Rev TH	CGCGCATGGTGGATTCAACATCC	

2.4 序列分析及物种鉴定

利用序列拼接软件 CodonCode Aligner 10.0.2 对测序峰图文件进行校对拼接,去除低质量序列及引物区;ITS2 去除 2 端 5.8S 和 28S 区,仅保存中间 ITS2 片段,*psbA-trnH* 序列去除 2 端 *psbA* 和 *trnH* 的基因序列,仅保留基因间隔区^[22];使用 MEGA 7.0 对拼接后序列进行比对分析,比较不同序列的比对后长度、变异位点和遗传距离,分析序列的碱基组成,对各个候选序列进行种间种内变异分析^[23],并对数据进行 1000 次自展,以 kimura 二参数模型(kimura two-parameter, K2P)模型计算遗传距离,采用邻接法(neighbor joining, NJ)建立系统进化树,考察 ITS2 和 *psbA-trnH* 鉴定黄芪及其混伪品种子的能力,并对市售黄芪种子进行鉴定。

2.5 市售黄芪种子物种鉴定

收集 12 份市售商品名标注为黄芪的种子,样本分别来自内蒙古、甘肃、陕西、江苏等产地。利用外观形态和优选的 DNA 条形码序列进行黄芪种子物种鉴别研究,考察其种子鉴定准确性。

3 结果

3.1 种子外观形态特征

通过体视显微镜的观察和游标卡尺的测量,黄

芪及混伪品种子在外观形态上有细微差异。从表 4 中的观察结果来看,蒙古黄芪种子宽卵状肾形,略扁,长 2.0~4.5 mm,宽 1.9~3.5 mm,厚 0.5~1.5 mm,表面光滑,为暗棕色或黄褐色,种脐位于腹中部凹陷处,千粒重约 6.65 g。扁茎黄芪种子相对较小,褐绿色或青色,呈球状肾形,略扁,表面光滑,种皮基本无斑,种脐位于腹中部凹陷处,千粒重约 2.64 g。斜茎黄芪种子最小,呈肾形,褐绿色,表面光滑,种皮有黑褐色斑点和细密网状纹,种脐位于腹中上部凹陷处,千粒重约 1.63 g。紫云英种子较蒙古黄芪略小,呈长肾形,棕色或者褐色,种皮无斑,腹中部凹陷较深,种脐位于凹陷处,千粒重约 3.76 g。

上述种子的典型形态特征可以作为鉴别黄芪种子的依据,种子形态特征研究表明(图 1),黄芪及其混伪品扁茎黄芪、斜茎黄芪和紫云英的种子形态特征有一定细微差异,如颜色、形状、斑点等,由于种子均比较细小,在无专业设备辅助下鉴定易出现偏差。

取不同采集地经过鉴定的蒙古黄芪种子于体视显微镜下进行观察,图 2 结果表明不同采集地黄芪种子,受气候环境及成熟度的影响形态特征存在显

表 4 蒙古黄芪及混伪品种子外观形态特征

Table 4 Morphological characteristics of *A. membranaceus* var. *mongholicus* seeds and its adulterants

名称	颜色	形状	种脐	种皮	长/mm	宽/mm	厚/mm	千粒重/g
蒙古黄芪	暗棕色或褐绿色	宽卵状肾形，略扁	种脐位于种子中部或近中部腹面向内凹陷处，白色	光滑	2.0~4.5	1.9~3.5	0.5~1.5	6.23~6.42
扁茎黄芪	褐绿色或青色	球状肾形，略扁	种脐位于腹上部凹口处	光滑，无斑	1.8~2.6	1.2~2.0	0.5~0.9	2.64~2.79
斜茎黄芪	褐绿色	规则的肾形	种脐位于腹中上部凹口处	有黑褐色斑点和细密网状纹	1.8~2.6	1.4~2.0	0.6~1.0	1.63~1.72
紫云英	棕色或褐色	长肾形	种子腹中部凹陷较深，种脐位于凹陷处	无斑，光滑	2.5~3.4	1.9~2.3	0.6~0.9	3.76~3.92

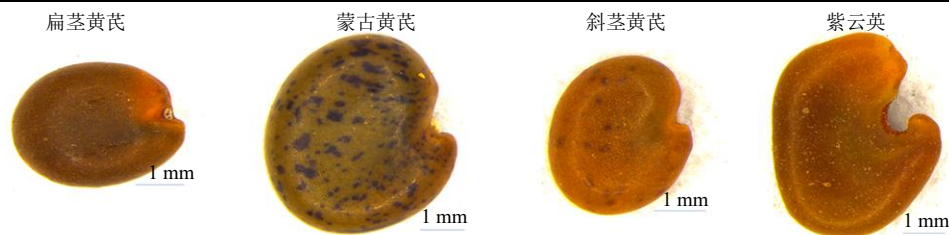


图 1 黄芪属种子的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of *Astragalus* seeds

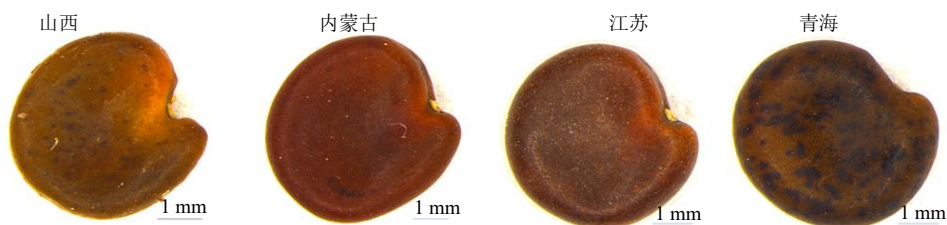


图 2 不同产地蒙古黄芪种子的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *A. membranaceus* var. *mongholicus* seeds from different habitats

著差异,单从形态鉴定黄芪种子存在一定的局限性。

3.2 黄芪种子 ITS2 序列特征及物种鉴定能力考察

PCR 扩增的 ITS2 经电泳凝胶成像检测,其在 500 bp 呈现单一明亮、清晰的条带,PCR 扩增率均为 100%。经测序,46 个来源于原植物的种子样品中 ITS2 序列均获得高质量双向测序峰图,ITS2 测序成功率为 100%。另从 GenBank 数据库中下载 8 个物种的 19 条 ITS2 序列,共计获得 65 条黄芪及混伪品种子 ITS2 参考序列,比对后长度 226 bp,GC%含量 50.5%,共有 68 个变异位点。蒙古黄芪种内平均遗传距离 0.002,种内最大遗传距离 0.005,与黄芪混伪品的种间最小遗传距离 0.080,故黄芪及其混伪品种间最小遗传距离大于种内最大遗传距离。基于黄芪及其混伪品种子的 ITS2 序列构建 NJ 系统发育树,结果表明(图 3),混伪品中紫花苜蓿、蜀葵、锦鸡儿、白花草木樨和黄芪属其他物种分别单独聚类,说明其与黄芪属物种的亲缘关系较远,

较易区分。蒙古黄芪可形成独立的一大枝,可以与扁茎黄芪、斜茎黄芪和紫云英明显区分,ITS2 序列可作为黄芪及其混伪品种子鉴定的序列。

3.3 黄芪种子 psbA-trnH 序列特征及物种鉴定能力考察

psbA-trnH 序列经电泳检测,其在 600 bp 左右呈现明亮、清晰的条带。对收集的 46 个种子样品 PCR 产物测序,psbA-trnH 序列由于存在 polyT 结构,影响其测序质量,psbA-trnH 序列测序成功率为 93.5%。另从 GenBank 数据库中下载 6 个物种的 18 条 psbA-trnH 序列,共获得 61 条黄芪及混伪品种子 psbA-trnH 序列。比对后长度 636 bp,GC%含量 21.1%,共 160 个变异位点。蒙古黄芪种内平均遗传距离 0.006,种内最大遗传距离 0.038,与混伪品斜茎黄芪、扁茎黄芪、紫花苜蓿、锦鸡儿、蜀葵和白花草木樨的种间最小遗传距离分别为 0.028、0.118、0.263、0.232、0.486 和 0.252。故蒙古黄芪与斜茎

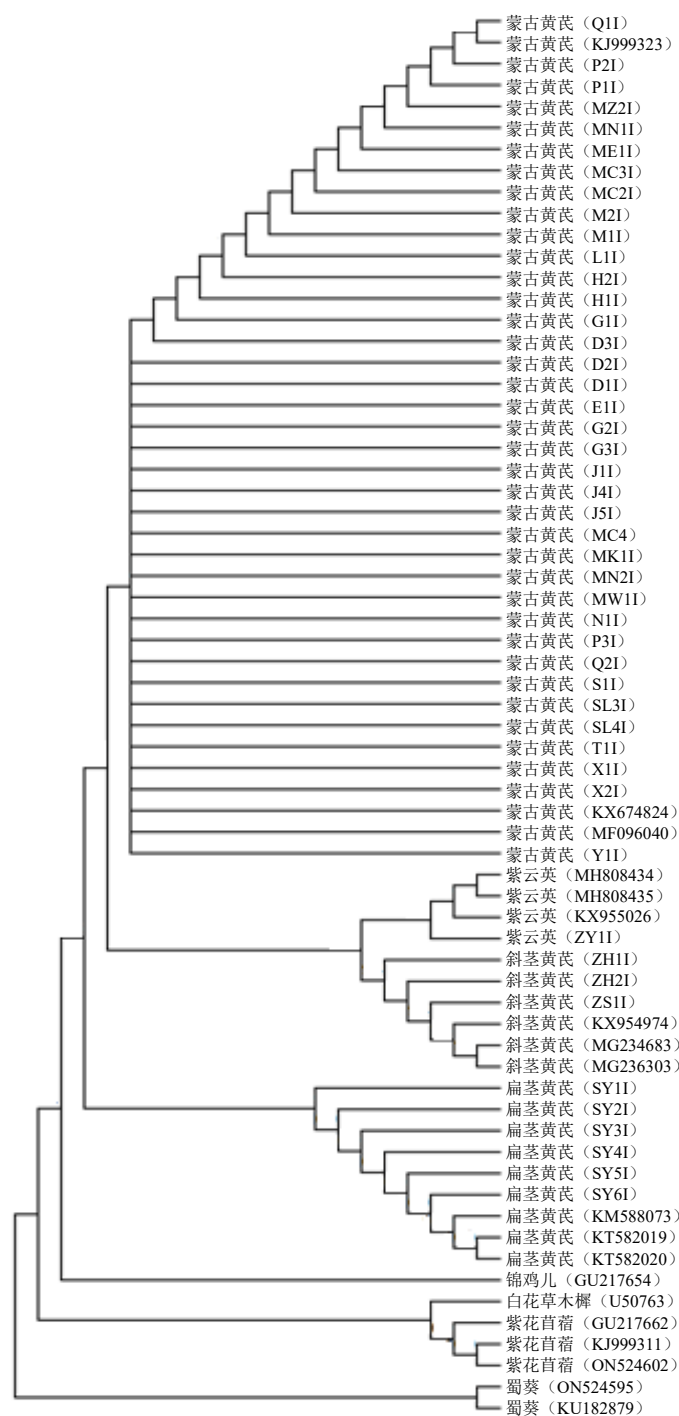


Fig. 3 NJ tree of *A. membranaceus* var. *mongholicus* seeds and its adulterants based on ITS2 sequences

但蒙古黄芪与扁茎黄芪、斜茎黄芪分成小枝, 可以进行区分。*psbA-trnH* 序列可作为黄芪及其混伪品种子鉴定的补充序列。

根据上述结果,收集 12 份市售商品名标注为黄芪的种子来进行真伪鉴别研究。样本分别来自内蒙

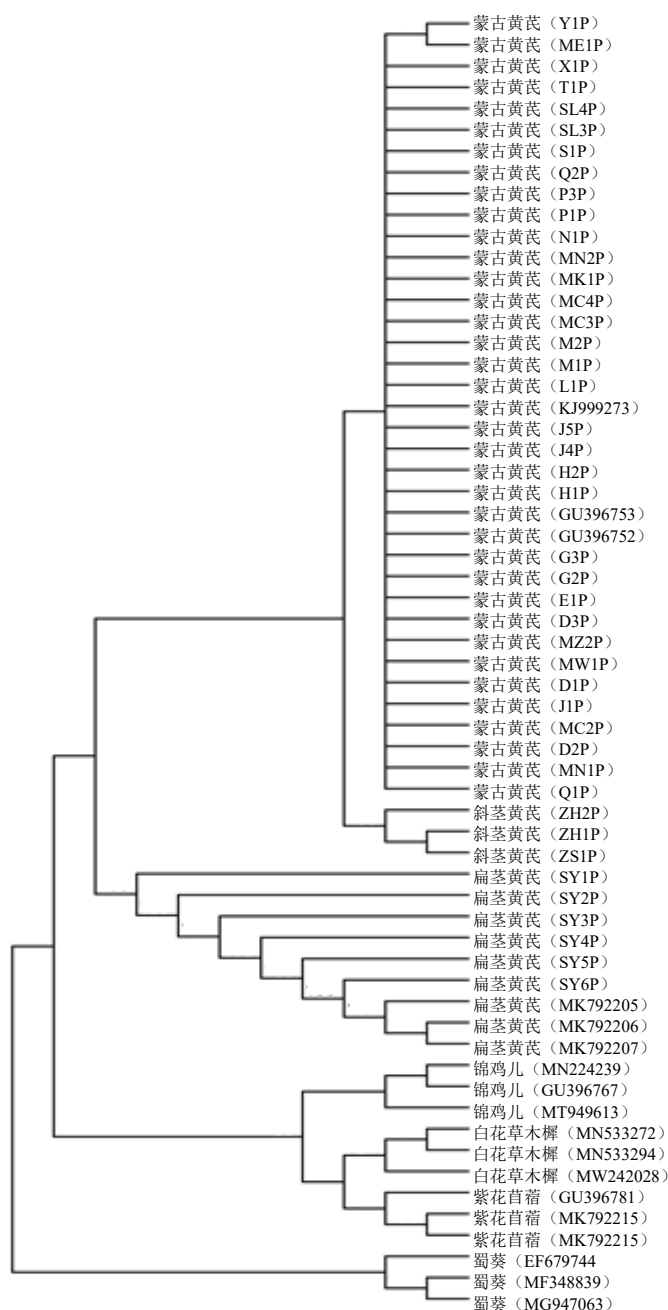


图 4 基于 psbA-trnH 序列构建的蒙古黄芪及混伪品种子 NJ 树

Fig. 4 NJ tree of *A. membranaceus* var. *mongholicus* seeds and its adulterants based on psbA-trnH sequences

古、甘肃、陕西、江苏等产地。通过观察发现 ZG1I 种子外观与蒙古黄芪样品有一定差异。随后以 ITS2 序列物种鉴定，每份样品取单粒种子进行 DNA 提取，结果如表 5 所示，DNA 质量浓度 48.35~109.80 mg/L，吸光度 (A) 比值 A_{260}/A_{280} 处于 1.724~1.994。PCR 扩增产物电泳检测结果在 500 bp 有 1 条清晰明亮的条带，双向测序和注释获得 ITS2 序列，经 BLAST 鉴定，12 份市售黄芪种子中有 1 份为斜茎黄芪，符合外观形态特征。

4 讨论

4.1 黄芪及混伪品种子总 DNA 的提取及测序

关于样品用量方面，按照 DNA 提取试剂盒要求的取样量干燥组织 20 mg，应该取多粒种子作为样品，但由于种子个体间易存在基因杂合现象，测序峰图容易存在杂峰，进而影响测序质量，本实验选取黄芪及混伪品单粒种子 1.5~8.0 mg 进行 DNA 提取试验，DNA 质量浓度 48.35~109.80 $\mu\text{g/mL}$ ，且 A_{260}/A_{280} 为 1.724~1.994。采用 ITS2 和 psbA-trnH

表 5 市售黄芪种子样品信息及鉴定

Table 5 Sample information and identification of marketed *A. membranaceus* var. *mongholicus* seeds

样品编号	DNA/(mg·L ⁻¹)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	ITS2 鉴定结果
Z1I	57.40	1.833	蒙古黄芪
MB1I	68.80	1.782	蒙古黄芪
MC1I	48.35	1.825	蒙古黄芪
ML1I	59.65	1.724	蒙古黄芪
ML2I	92.40	1.772	蒙古黄芪
MB2I	68.60	1.780	蒙古黄芪
MB3I	64.10	1.801	蒙古黄芪
SL1I	82.20	1.785	蒙古黄芪
SL2I	64.20	1.788	蒙古黄芪
J2I	109.80	1.788	蒙古黄芪
J3I	84.45	1.881	蒙古黄芪
ZG1I	68.90	1.994	斜茎黄芪

通用引物均可以获得明亮、清晰的条带,表明黄芪和混伪品单粒种子提取的 DNA 完全可以满足试验要求。故后续采用单粒种子样品进行总 DNA 的提取。另外,为了提高提取的稳定性,本实验采用-80℃冰箱冷冻降低温度后^[24],用组织研磨仪快速研磨后,新型植物 DNA 提取试剂盒快速提取,提高总 DNA 的质量。试验样品的 ITS2 和 psbA-trnH 序列 PCR 扩增成功率均为 100%。ITS2 的测序成功率为 100%,而 psbA-trnH 序列由于存在 polyA/T 结构,影响其测序质量及拼接,测序成功率为 93.5%。测序未成功的样本均经多次重复试验,仍不能成功测序。

4.2 黄芪及混伪品种子形态和 DNA 条形码鉴定

中药材种子鉴定主要通过借助显微镜的形态学观察来完成,但其形态特征和显微特征易受环境和种子成熟度等因素影响,相同物种的种子往往也存在形态差异,均会影响物种鉴定的准确性^[25]。作为传统形态鉴定方法的补充,DNA 条形码技术依靠植物的遗传信息进行鉴定,不受环境和植物生长发育阶段的影响^[24]。

目前关于黄芪 DNA 条形码鉴定的研究较多,其中郑司浩等^[26]利用特异性分子标记鉴别蒙古黄芪与膜荚黄芪,高婷等^[27]利用 ITS2 条形码序列鉴定了黄芪属药用植物。刘亚令等^[11]基于 ITS2 序列及二级结构鉴定了黄芪药材及其混伪品。这些研究主要是针对黄芪药材及其植物的分子鉴定研究。而

种子作为繁殖材料在 DNA 条形码鉴定实践中有一定特殊性,内含物丰富,多数个体较小,DNA 提取困难,且含有 PCR 抑制物^[28]。其中张改霞^[19]采用形态学结合 ITS2 条形码技术对 10 批次黄芪种子样品进行鉴定。本研究从 25 个不同产地收集了黄芪及混伪品种子 46 份,通过外观形态及 ITS2 和 psbA-trnH 条形码序列分析,不仅在形态学方面揭示了黄芪种子及其混伪品的差异,而且在 ITS2 条形码鉴定的基础上,补充了 psbA-trnH 条形码鉴定,结果发现 ITS2 序列能将蒙古黄芪聚为一大枝,黄芪属其他物种聚为小枝,可以明显区分黄芪及其混伪品种子。研究结果表明,ITS2 序列作为黄芪及其混伪品种子鉴定的优选序列,psbA-trnH 作为补充序列。系统完善地对黄芪及其混伪品种子鉴定进行了研究。同时,本研究通过外观形态和 ITS2 条形码技术发现 12 份市售黄芪种子中有 1 份为斜茎黄芪。说明市售黄芪存在一定的种源混杂问题,可通过 DNA 条形码技术对其进行准确鉴定,避免由于种子混乱给临床用药带来了的安全隐患。

4.3 DNA 条形码鉴定黄芪及混伪品种子的意义

黄芪作为大宗药材,应用广泛,除《中国药典》2020 年版规定的蒙古黄芪和膜荚黄芪之外,其混伪品斜茎黄芪、扁茎黄芪、紫云英、紫花苜蓿、锦鸡儿和蜀葵等^[10]也时有出现,导致市场上种子种苗比较混乱。严重影响了黄芪药材的质量稳定和临床用药安全,所以从药材源头着手,准确鉴定黄芪种子基原,保证黄芪种子的质量至关重要。DNA 条形码技术可鉴定单粒种子,解决混种、种子混杂问题,弥补传统鉴别方法的不足,在中药鉴定领域具有广阔的应用前景^[29-30]。

目前尚缺少完善的法律法规规范黄芪种子种苗的生产和销售。2019 年农业农村部种业管理司印发了《2019 年推进现代种业发展工作要点》,指出《中药材种子管理办法》的起草任务迫在眉睫^[31]。与黄芪药材和饮片的鉴定方法相比,由于黄芪种子尚未建立系统的物种鉴定方法,采用 DNA 条形码技术进行鉴定成本低、准确率高、实践性强^[32]。因此,利用 DNA 条形码技术,加快推进黄芪种子标准化建设,不仅能为我国黄芪种子种苗鉴定规范化建设提供有力技术保障,也是中药现代化建设的重要内容^[14]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄海波, 黄柏超. 《本草纲目·释名》“黄耆”诸名解读 [J]. 中医药文化, 2016, 11(4): 46-49.
- [2] 詹志来, 邓爱平, 彭华胜, 等. 基于历代本草产地变迁的药材道地性探讨: 以黄芪、丹参为例 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(17): 3202-3208.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 323.
- [4] 孟祥善, 代晓华, 刘萍, 等. 基于 ITS 序列的银柴胡种质资源遗传多样性研究 [J]. 中药材, 2018, 41(1): 55-59.
- [5] 孙淑英, 陈贵林. 内蒙古黄芪产业化现状、问题及对策建议 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(15): 5126-5133.
- [6] Li D, Liu Y T, Qin X M. Rapid quantitative analysis of 12 chemical constituents in wild-simulated and cultivated *Astragali Radix* based on UHPLC-MS [J]. *Chin Herb Meds*, 2022, 14(3): 464-469.
- [7] 彭露茜, 郭彦龙. 中国黄芪地理分布和未来适生区预测 [J]. 四川农业大学学报, 2017, 35(1): 60-68.
- [8] 闫冲, 刘红菊, 赵丽丽. 黄芪及其混淆品种子的种皮组织结构鉴别 [J]. 海峡药学, 2007, 19(4): 55-56.
- [9] 闫冲, 聂凤提. 黄芪及其伪品的种子快速鉴别方法 [J]. 中国药业, 2005, 14(7): 69-70.
- [10] 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.
- [11] 刘亚令, 耿雅萍, 王芳, 等. 基于 ITS2 序列及二级结构对药用黄芪及混淆品的鉴别研究 [J]. 药学学报, 2020, 55(3): 522-529.
- [12] 穆威杉, 谢红波, 赵晴, 等. 基于 ITS2 序列的市售木通药材及其混淆品的分子鉴定 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2108-2114.
- [13] Zhang G X, Liu J X, Gao M, *et al.* Tracing the edible and medicinal plant *Pueraria montana* and its products in the marketplace yields sub species level distinction using DNA barcoding and DNA metabarcoding [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 336.
- [14] 穆威杉, 于娟, 赵晴, 等. 基于 DNA 条形码技术的中药材木通种子鉴定研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(9): 1271-1274.
- [15] 刘金欣, 魏妙洁, 李耿, 等. 黄芩 ITS2 条形码数据库构建及其种子的 DNA 条形码鉴定方法建立 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 37-45.
- [16] 谢红波, 赵晴, 穆威杉, 等. 北苍术种子 DNA 条形码研究及序列特征分析 [J]. 承德医学院学报, 2022, 39(1): 13-18.
- [17] 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): 141-148.
- [18] 蔡一鸣, 代江鹏, 郑雨欣, 等. 钩藤属植物分子鉴定的 DNA 条形码筛选 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1828-1837.
- [19] 张改霞. 几种传统大宗中药材种子 DNA 条形码鉴定 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [20] 李军, 张燃, 于淑萍, 等. 中药材银柴胡及其混淆品的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药科学报, 2019, 54(5): 937-943.
- [21] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 14.
- [22] 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.
- [23] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [24] 戚文涛, 李剑超, 王晨, 等. 应用 ITS2 条形码及种子形态鉴定柴胡属种子 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11): 170-177.
- [25] 肖娟. 不同生境白藜种子形态、品质特征和种子萌发特性的研究 [J]. 中药材, 2014, 37(5): 731-736.
- [26] 郑司浩, 尚兴朴, 曾燕, 等. 蒙古黄芪与膜荚黄芪特异性分子标记鉴别研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 307-311.
- [27] 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.
- [28] 赵晴, 谢红波, 赵红玲, 等. 中药材种子 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3471-3476.
- [29] 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.
- [30] Shi L C, Chen H M, Jiang M, *et al.* CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W65-W73.
- [31] 邓明瑞. 中药材种生产经营管理探讨: 种子管理机构在贯彻实施新《种子法》中遇到的困难与挑战 [J]. 中国种业, 2019(5): 34-37.
- [32] 张尚智, 张建军, 刘玲玲. 我国中药材种子种苗标准发布状况及分析 [J]. 畜牧兽医学杂志, 2019, 38(1): 49-54.

[责任编辑 时圣明]