

中药材银柴胡及其混伪品的DNA条形码鉴定研究

李 军¹, 张 燃¹, 于淑萍², 王晓敏³, 冷晓红¹, 石林春^{4*}

(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. 承德医学院附属医院, 河北 承德 067000; 3. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 4. 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: 筛选合适的DNA条形码序列, 以建立基于DNA条形码技术的银柴胡及其混伪品鉴定方法。本文收集并提取60份银柴胡及其混伪品的DNA, 对4种DNA条形码序列ITS、*psbA-trnH*、*rbcL*和*matK*进行PCR扩增和测序, 计算各序列PCR扩增和测序成功率; 利用MEGA7.0分析序列特征、计算遗传距离, 并构建Neighbour-joining (NJ) 系统进化树; 利用种间种内变异分析做Barcoding gap图; 运用BLAST方法计算各序列鉴定成功率, 通过以上指标综合评价不同序列的鉴别能力。结果显示, ITS序列的PCR扩增及测序成功率最高, 为95.2%, *matK*最低, 为75%; 4种序列的长度范围为211~797 bp, ITS的GC含量在各序列中最高, 为54.35%; *matK*和ITS的鉴定成功率较高, 分别为92%和90%; Barcoding gap图显示ITS有明显的间隔区, *rbcL*、*matK*和*psbA-trnH*序列间隔区不明显或种间种内变异有部分重叠; NJ系统进化树显示, ITS可将银柴胡聚为一支, 同属混伪品二柱繁缕与银柴胡明显分为不同支, *rbcL*和*matK*不能把混伪品二柱繁缕分开。因此, ITS序列可作为银柴胡及其混伪品鉴定的优选条形码序列, 为银柴胡的真伪鉴定提供科学依据。

关键词: 银柴胡; 混伪品; DNA条形码; ITS; 分子鉴定

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)05-0937-07

Identification of Chinese medicinal materials *Stellariae Radix* and its adulterants using DNA barcoding

LI Jun¹, ZHANG Ran¹, YU Shu-ping², WANG Xiao-min³, LENG Xiao-hong¹, SHI Lin-chun^{4*}

(1. College of Ningxia Vocational and Technical, Ningxia Research Center for the Development and Utilization of Chinese Herbal, Yinchuan 750021, China; 2. Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 3. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: To accurately discriminate *Stellariae Radix* from its adulterants, four leading candidate DNA barcoding markers were evaluated. Sixty samples including *Stellariae Radix* and its adulterants have been newly collected and their total genomic DNA was extracted. Four DNA barcoding markers ITS, *rbcL*, *psbA-trnH* and *matK* were amplified and sequenced. Their sequence characteristic analyses, Kimura-2-parameter (K2P) distance calculation and Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree constructions were accomplished using the MEGA 7.0 software. DNA Barcoding gaps of the four DNA barcoding markers were estimated by the distributions of inter- and intra-sequence specific variations. Species identification efficiency was calculated using the BLAST method. The results showed that ITS had the highest (95.2%) while *matK* demonstrated the lowest (75%) PCR and

收稿日期: 2019-01-07; 修回日期: 2019-02-26.

基金项目: 2017年宁夏青年科技人才托举工程项目; 宁夏回族自治区教育厅服务地方经济发展项目 (NGY2016259); 承德市科学技术局项目 (201601A049); 四川省科技计划项目重点研发项目 (2019YFS0017).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833194, E-mail: lcschi@implad.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0012

sequencing efficiency. The length range of the four markers were in the range of 211-797 bp, and the G+C content of ITS was highest (54.35%). The identification efficiency of *matK* and ITS was 92% and 90% respectively. Barcoding gap could be found in ITS sequences. The NJ phylogenetic tree constructed using ITS sequences showed that samples of *Stellariae Radix* were separately formed into one clade, and samples of adulterants like *Stellaria bistyla* were clearly belong to different branches from *Stellariae Radix*, whereas NJ trees constructed using *psbA-trnH*, *rbcL* and *matK* could not differentiate *Stellariae Radix* from its adulterants. Therefore, ITS regions as DNA barcodes can stably and accurately distinguished *Stellariae Radix* from its adulterants, and provide a new technique for modern identification of *Stellariae Radix*.

Key words: *Stellariae Radix*; adulterants; DNA barcoding; ITS; molecular identification

银柴胡是石竹科繁缕属植物银柴胡 (*Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata*) 的干燥根, 为 2015 年版《中华人民共和国药典》收载中药^[1], 味甘、性寒, 具有清虚热、除疴热的功效, 用于阴虚发热、骨蒸劳热、小儿疳积等症^[2]。银柴胡在临床中主要用于感冒高热、过敏性疾病、抗肿瘤等方面的治疗。此外, 银柴胡常与其他药材配伍, 如在乌鸡白凤丸中与牡蛎、生地、天冬归类, 同起到滋阴清热之功能, 为乌鸡白凤丸中不可或缺的一味药材^[3]; 与青蒿等药材配伍, 具有良好的抗菌消炎作用^[4]。因此, 银柴胡的临床应用非常广泛。

银柴胡主要分布在宁夏、内蒙古、陕西省毗邻的干旱少雨沙生草原区, 极耐干旱^[5]。目前银柴胡的野生资源相对匮乏, 商品药材绝大部分来源于人工种植, 市场上出现了的混伪品, 如有蝇子草、女娄菜、丝石竹、石竹等的干燥根^[6,7], 导致银柴胡临床用药的安全性和有效性得不到保证。银柴胡混伪品的混入不仅严重干扰了药材市场的正常运行, 而且对以此为原料的中成药生产产生极大干扰。针对银柴胡的鉴别方法, 国内学者开展了大量研究, 主要集中在性状、显微、理化及光谱鉴定^[8]。但这些鉴定方法由于受鉴定人员经验、药材生长和采收加工的影响, 难以快速准确的鉴定银柴胡及其混伪品。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术作为中药材物种鉴定研究中的新方法^[9], 是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段对物种进行快速、准确的鉴定^[10,11]。具有鉴定结果准确、重复性良好、方法通用性强等优点。DNA 条形码鉴定技术已经在中药材冬虫夏草、枸杞、羌活、党参、天南星、锁阳等药材及其混伪品的鉴定中取得了良好的效果^[12], 成为近年来中药鉴定研究的重点和亮点。同时国家药典委员会已将中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则收载于 2015 年版《中国药典》第四部^[1]。其在中药材鉴定、药品流通、监督等诸多方面也得到了很好的应用。而有关银柴胡 DNA 条形码真伪鉴定研究亟待开展, 本文利用 4 条常用 DNA 候选条形码序列 ITS、*rbcL*、*psbA-*

trnH 和 *matK* 对银柴胡及其混伪品进行鉴定研究, 分析比较不同候选序列对银柴胡的真伪鉴定能力, 为银柴胡及其混伪品的分子鉴定提供优选序列, 以期建立一种快速、准确高效的银柴胡真伪鉴定方法, 为银柴胡药材的准确鉴定提供科学依据。

材料与方法

材料 本研究采集银柴胡及其混伪品的基原植物和药材样本共计 60 份, 分别来自宁夏、甘肃、江西、湖北等多个省份。基原植物样品采集后立刻装入含硅胶的密封袋中, 并勤换硅胶, 直至样品干燥完全。所有银柴胡及其混伪品的基原植物经宁夏大学农学院李小伟副教授或宁夏药品检验研究院丁锐副主任药师鉴定, 样品保存于宁夏中药材开发与利用工程技术研究中心储存室 -70 °C 冰箱。所有药材样品均经原宁夏药品检验所韩义欣主任药师鉴定。样品采集信息见表 1。本研究同时从 GenBank 数据库下载条形码序列, 序列筛选参照陈士林等^[13]建立的筛选校对机制, 即 BLAST 分析、系统树分析、Barcoding gap 检验, 共整理银柴胡及其混伪品的 114 条有效条形码序列 (表 2)。

试剂 DL2000 Marker、RNase 酶、植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); *psbA-trnH*、ITS、*matK*、*rbcL* 序列引物 (上海生工生物工程股份有限公司); 琼脂糖 (西班牙, Biowest Agarose); 2× Taq plus Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司); GelRed 染料 (美国 Biotium 公司)。

仪器 MyCycler PCR 仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统、Powerpac Basic 琼脂糖凝胶电泳仪 (美国伯乐有限公司); MiniSpin plus 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Geno 2010 高通量组织研磨机 (美国 SPEX SamplePrep 公司); ND2000 核酸蛋白检测仪 (美国 NanoDrop 公司); 自动高压灭菌锅 (上海博讯仪器有限公司); Mini 离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司); SZ-1 涡旋混合器 (常州国宇仪器制造有限公司); 恒温水浴锅 (北京长源实验设备厂)。

Table 1 Sample information and GenBank accession numbers of *Stellariae Radix* and its adulterants

Species	Location	Sample No.	GenBank accession No.				
			ITS	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	
<i>Stellaria dichotoma</i> var. <i>lanceolata</i> Bge.	Yanchi Ningxia	B2	MK555226	MK534774	MK534812	MK534855	
		B3	MK555225	MK534773	-	-	
		B4	MK555227	MK534772	-	-	
		C1	MK555228	MK534771	-	-	
		C2	MK555245	MK534770	-	-	
		C3	MK555241	MK534769	MK534813	MK534856	
	Longde Ningxia	D1	MK555229	MK534768	-	-	
		D2	MK555230	MK534767	-	-	
		D3	MK555246	MK534766	MK534814	MK534863	
	Longxi Gansu	L2	MK555215	MK534743	MK534815	MK534865	
		L3	MK555243	MK534744	-	-	
		L5	MK555231	MK534745	MK534816	MK534857	
	Pengyang Ningxia	L8	MK555232	MK534746	-	-	
		P1	MK555222	MK534747	MK534817	MK534850	
		P2	MK555223	MK534748	MK534818	MK534859	
	Helanshan Ningxia	P3	MK555237	MK534749	-	-	
		R1	MK555218	MK534750	MK534819	MK534851	
		R2	MK555240	MK534751	MK534820	MK534852	
		R3	MK555224	MK534752	MK534821	MK534853	
		R4	MK555219	MK534753	MK534822	MK534854	
		R5	MK555233	MK534754	-	-	
	Shapotou Ningxia	S1	MK555238	MK534755	MK534823	-	
	Tongxin Ningxia	T2	MK555216	MK534756	MK534824	-	
		T3	MK555242	MK534757	-	-	
		T8	MK555244	MK534758	MK555240	MK534860	
	Taole Ningxia	TL	MK555239	MK534759	MK534810	-	
	Yuzhong Gansu	Y2	MK555217	MK534761	MK534825	MK534861	
		Y6	MK555220	MK534762	MK534826	MK534861	
		Y9	MK555221	MK534763	-	-	
	Tongxin Ningxia	Y10	MK555234	MK534760	-	-	
		Yc1	MK555235	MK534764	MK534828	MK534864	
		Yc2	MK555236	MK534765	MK534827	MK534866	
	<i>Stellaria bistyla</i> Y. Z. Zhao	Helanshan Ningxia	LE	MK555247	MK534742	MK534811	MK534858
<i>Silene fortune</i> Vis.			Longde Ningxia	DZ1	MK555251	MK534788	MK534838
		DZ2	MK555249	MK534787	-	-	
		DZ3	MK555248	MK534786	MK534837	MK534846	
		Lushan Jiangxi	JZ1	MK555250	MK534785	-	-
		JZ2	MK555252	MK534784	MK534834	-	
		Wuning Jiangxi	WZ1	-	MK534783	MK534836	-
		<i>Silene foliosa</i> Maxim.	Longde Ningxia	DF	MK555253	-	MK534835
<i>Silene aprica</i> Turcz. ex Fisch. et Mey.	Longde Ningxia	DN	MK555257	-	-	-	
		Xiji Ningxia	XN	-	-	MK534839	-
		Pengyang Ningxia	PN1	MK555254	MK534791	MK534833	MK534842
		PN2	MK555255	MK534790	MK534832	MK534843	
		PN3	MK555256	MK534789	MK534831	MK534844	
		<i>Silene conoidea</i> Linn.	Xiji Ningxia	XM	MK555259	MK534793	MK534829
<i>Silene alaskanica</i> Bocquet Maxim.		XY	MK555258	MK534792	MK534830	MK534841	
<i>Dianthus chinensis</i> Linn.	Longde Ningxia	DS1	MK555264	MK534777	MK534801	MK534869	
		DS2	MK555265	MK534776	-	-	
		DS3	MK555266	MK534775	MK534802	MK534870	
Jiujiang Jiangxi		JS1	MK555262	MK534780	MK534803	MK534871	
		JS3	MK555260	MK534779	-	-	
		JS4	MK555261	MK534778	MK534804	MK534872	
Jingmen Hubei		MS2	-	MK534781	MK534805	-	
		MS4	MK555263	MK534782	MK534806	-	
		<i>Gypsophila davurica</i> var. <i>angustifolia</i> Fenzl	Haiyuan Ningxia	HX	MK555271	MK534795	MK534808
<i>G. oldhamiana</i> Miq.	Ningxia	TSS	MK555269	MK534794	MK534807	-	
<i>G. capituliflora</i> Rupr.	Xiji Ningxia	XT	MK555270	MK534796	MK534809	MK534849	
<i>Ixeridium chinense</i> Thunb. Tzvel.	Yinchuan Ningxia	YK1	MK555267	MK534798	MK534800	MK534867	
		YK2	MK555268	MK534797	MK534799	MK534867	

Table 2 Accession numbers downloaded from GenBank of different barcodes from various species

Barcode	Species	Species accession No.
ITS	<i>Stellaria dichotoma</i> var. <i>lancoelata</i> Bge.	KY445986, KY445976, KY018698, KY445992, KY445994, KY445987
	<i>Silene repens</i> Patr.	DQ908662, KJ918501
	<i>Aster ageratoides</i> Turcz.	HQ154047, KJ587591, KJ587594, KJ587591, KJ587594
	<i>A. ageratoides</i> var. <i>lasiocladus</i> Turcz.	JN543781
	<i>A. ageratoides</i> var. <i>micranthus</i> Turcz.	KY428861, KY807174-75, KY428862
	<i>Silene fortunei</i> Vis.	EF060226
	<i>Silene macrostyla</i> Maxim.	EF060227, KX757533-35
	<i>G. pacifica</i> Kom.	JX274528, KX183986
	<i>Ferula bungeana</i> Kitag.	KJ660769
	<i>Silene repens</i> Patr.	DQ908661, DQ908663
matK	<i>D. chinensis</i> Linn.	KU722868, JN589242
	<i>G. paniculata</i> Linn.	JN589231, MG603322, MG603324-45, KX183906
	<i>G. oldhamiana</i> Miq.	MF064036
	<i>Silene repens</i> Patr.	FJ589552
rbcL	<i>Aster ageratoides</i> Turcz.	GQ436475, MH116076, MH116077
	<i>G. oldhamiana</i> Miq.	MF065145
	<i>D. chinensis</i> Linn.	KU722896
	<i>G. paniculata</i> Linn.	MG247978, MG547346-48, MG547353-57, MG547359-60, DQ908663-70, DQ908672-73
psbA-trnH	<i>G. oldhamiana</i> Miq.	MF064598
	<i>A. ageratoides</i> Turcz.	GQ435121, MH117003, MH117002

DNA 提取 取经鉴定的银柴胡及其混伪品基原植物样品 30 mg, 干燥药材去除表皮取中间部分 50 mg, 加入 GP1 缓冲液和钢珠 2 枚, 经高通量组织研磨机研磨 4 或 6 min 后, 采用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 详细操作参照试剂盒说明书^[14]。

PCR 扩增及测序 本研究选用国际通用序列 ITS、*rbcL*、*psbA-trnH* 及 *matK* 4 条 DNA 条形码候选序列。4 对引物序列及 PCR 反应条件如表 3。PCR 体系为 25 μ L, 包含 2 \times Taq Plus Master Mix 12.5 μ L, 正反引物各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L^[12]。

取 4 μ L 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。并将扩增成功的 PCR 产物直接送至中国农业科学院作物科学研究所进行双向测序。

序列分析及评价 利用序列拼接软件 CodonCode Aligner V7.01 对测序峰图文件进行校对拼接, 去除低质量序列及引物区; ITS 序列除去 18S 和 28S 序列, 保留 ITS1、5.8S 和 ITS2^[15]; 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, 做出 Barcoding gap 图^[16], 并对数据进行 1 000 次自展, 以 K2P 模型采用 NJ 法建立系统进化树, 分析银柴胡及混伪品的亲缘关系。同时运用相似性搜索算法 (BLAST) 计算各序列的鉴定成功率^[17]。

结果与分析

1 候选序列扩增及测序成功率

PCR 扩增和测序成功率是 DNA 条形码分子鉴定的两个重要指标。4 条候选序列扩增及测序结果如表 4, 其中 ITS、*psbA-trnH* 和 *rbcL* 扩增成功率达 100%, *matK* 扩增成功率最小为 84.1%。ITS 的测序成功率最高, 为 95.2%, *psbA-trnH* 的测序成功率较低, 为 90.3%。综合扩增和测序成功率, ITS 序列最高 (95.2%), *matK* 最低 (75.0%)。

2 候选序列的特征分析及鉴定成功率

4 条序列的特征参数如长度、GC 含量、遗传距离、变异位点数、变异率及鉴定成功率等信息详见表 5。各序列的长度范围为 211~797 bp, 其中 *psbA-trnH* 最

Table 3 Primers sequences and corresponding PCR reaction conditions^[12]

Gene	Primer	5'-3'	PCR conditions
ITS	5F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min 33 s; 30 cycles
	4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>matK</i>	3F-KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	95 °C 1 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 40 cycles; 72 °C 10 min
	1R-KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
<i>rbcL</i>	RbcLa-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAAGC	95 °C 1 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 40 s, 35 cycles; 72 °C 10 min
	RbcLa-R	GTAATCAAGTCCACCRGC	
<i>psbA-trnH</i>	fwd PA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	95 °C 1 min; 95 °C 30 s; 58 °C 1 min, 72 °C 30 s, 35 cycles; 72 °C 10 min
	Rev TH	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	

Table 4 The success rate of PCR amplification and bio-direction sequencing

Candidate barcode	PCR amplification/%	Sequencing /%	PCR amplification and sequencing/%
ITS	100	95.2	95.2
<i>psbA-trnH</i>	100	90.3	90.3
<i>matK</i>	81.8	91.7	75.0
<i>rbcL</i>	100	93.1	93.1

Table 5 Identification efficiency and information of sequences

Markers	ITS	<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>
Number of nucleotides/bp	584-641	714-797	211-388	534-553
Number of indels	83	62	61	67
GC content/%	54.35	32.62	23.17	43.04
Genetic distance	Average	0.206	0.605	0.036
	Max	0.497	1.350	0.115
	Min	0.000	0.000	0.000
Variation site	395	285	242	73
Conserved site	271	468	56	451
Variability rate	59.30%	37.85%	81.21%	13.93%
Identification efficiency	90%	92%	72%	57%

短, 为211~388 bp, *matK* 相对较长, 为714~797 bp; 其中平均遗传距离最大的为*psbA-trnH*, 其次是ITS。如表5所示, *matK*和ITS的鉴定成功率都较高, 分别为92%和90%。综上分析, ITS序列变异率和平均遗传距离较大, 且鉴定成功率最高。

3 候选序列的Barcoding gap比较

对4种DNA条形码候选序列Barcoding gap分析(图1), ITS序列有明显的间隔区, 种间变异范围与种内变异范围无重叠区域, 有利于银柴胡及其混伪品的区分。*rbcL*序列无明显间隔区, *matK*序列种间种内变异

有部分重叠, *psbA-trnH*序列无重叠区, 但种内种间有部分差异不明显。

4 系统发育关系分析评价鉴定效率

利用MEGA 7.0软件构建NJ系统进化树。如图2所示, ITS可将正品银柴胡聚为一支, 与其亲缘关系较近的同属混伪品二柱繁缕也能明显分为不同分支, 混伪品女娄菜和石竹聚为一支。而*rbcL*和*matK*不能把同属混伪品二柱繁缕分开, *psbA-trnH*序列所构建的进化树显示混伪品菊科植物山白菊和中华苦苣菜与银柴胡同科蝇子草属和石头花属植物聚在一支, 无法很好地反映不同种间的遗传变异及同种样品间的同源性。

讨论

银柴胡作为在临床及中成药生产中应用广泛的中药材, 部分混伪品流入市场, 直接影响着相关中药的质量及临床用药安全。由于受鉴定人员经验、种质资源、药材采收时期等因素影响, 利用传统生药鉴定的方法已经难以满足银柴胡真伪鉴定的需求。本研究选取4种候选条形码序列ITS、*psbA-trnH*、*rbcL*和*matK*, 以PCR扩增和测序成功率、遗传距离、变异率、Barcoding gap及进化树等为指标, 分析其对银柴胡及其混伪品的鉴别情况^[8]。结果显示, 4条序列中, ITS的PCR扩增率、测序成功率、平均遗传距离和变异率都较高, 其鉴定成功率达到90%; 在检验不同序列的Barcoding gap时, ITS序列有明显的间隔区, 宜用于银柴胡真伪鉴别; NJ系统进化树显示, ITS可将银柴胡聚在一起, 银柴胡同属植物混伪品二柱繁缕与银柴胡明显分为不

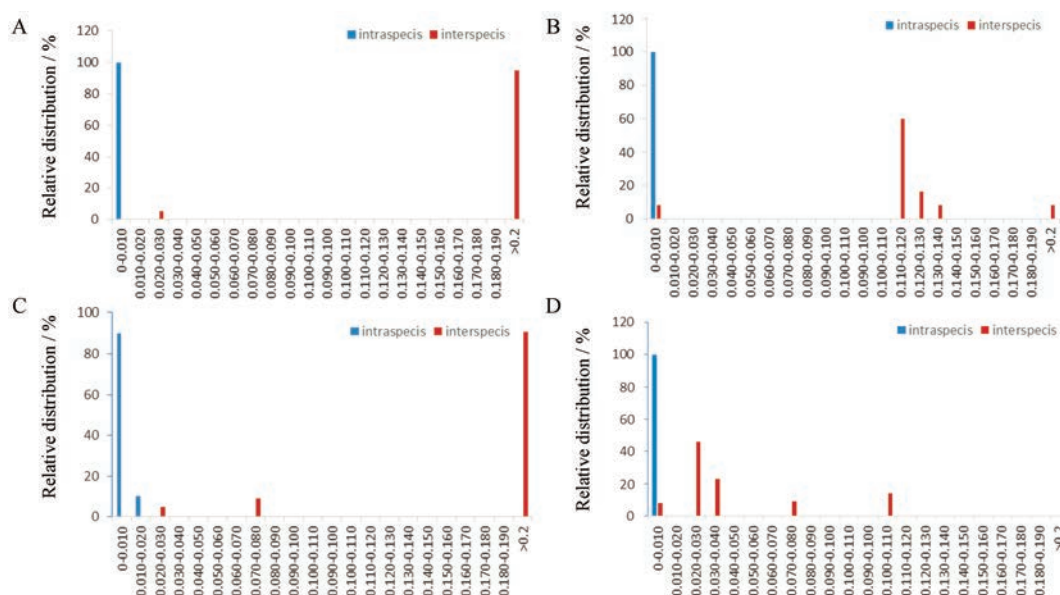


Figure 1 Barcoding gap plots of different candidate sequences. A: ITS sequence; B: *matK* sequence; C: *psbA-trnH* sequence; D: *rbcL* sequence

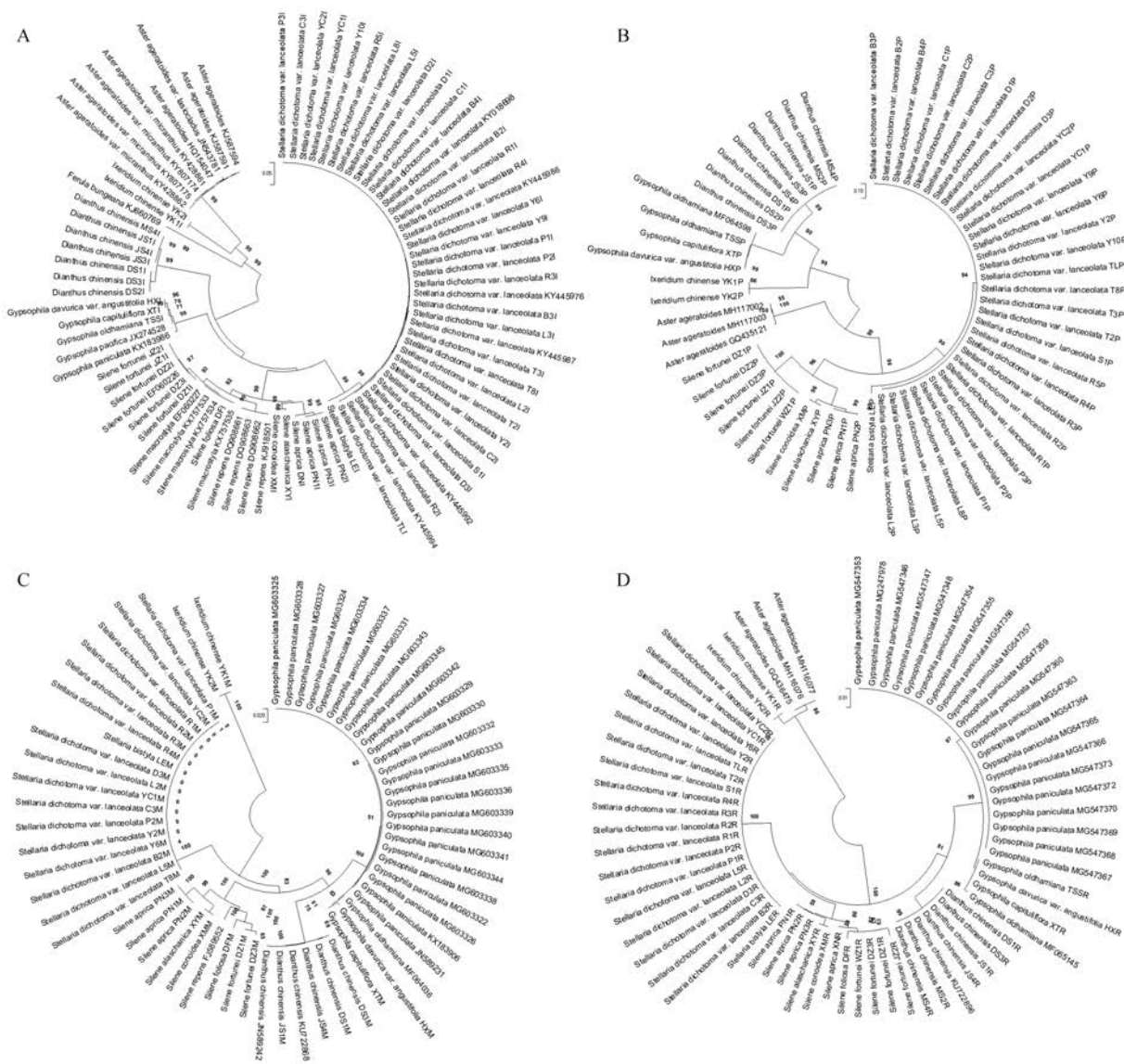


Figure 2 NJ trees based on four DNA barcoding sequences for *Stellariae Radix* and its adulterants. A: ITS; B: *psbA-trnH*; C: *matK*; D: *rbcL*. Bootstrap 1 000 repetitions, the value on the support only shows self-support support rate $\geq 70\%$

同分支, 可对银柴胡及其混伪品进行准确鉴定。另外, ITS是最常用的系统发育序列^[19], 本研究中基于 ITS 序列构建的进化树将样品聚为三支, 分别为石竹科、伞形科和菊科, 将各科同属的样品聚为一支, 并能将同属不同物种分为不同分支, 因此 ITS 序列也具有银柴胡分子进化研究的潜力。2018年, Meng 等^[20]基于 ITS 序列的银柴胡种质资源遗传多样性研究, 推测目前宁夏和甘肃陇西所有人工栽培的银柴胡种质资源来源相同, 是同一野生种的后代。

实验过程中 4 条序列的 PCR 扩增率都较高, 其中 ITS、*psbA-trnH* 和 *rbcL* 扩增成功率达 100%, *matK* 由于序列较长, 测序成功率略低。PCR 扩增和测序未成功的样本均经多次重复试验。其中, ITS 的测序成功率最高, 为 95.2%^[21]。在序列分析中, 鉴定成功率是考察

不同序列对同一物种鉴别能力的重要指标之一。BLAST 方法是将样本的 DNA 序列与全体序列进行碱基比对, 按碱基差异进行排名, 具有运行速度快、精度高的特点^[22,23]。结果显示, *matK* 和 ITS 的鉴定成功率都较高, 分别为 92% 和 90%。本实验采用通用的 DNA 条形码引物和 PCR 扩增条件, 并进行多次扩增和测序的重复试验以保证数据的可靠性, 采用了包括序列变异分析、遗传距离计算、Barcoding gap 检验、物种鉴定效率比较等多种分析方法以保证结论的可靠性。

理想的 DNA 条形码序列, 种内遗传距离应该明显小于种间遗传距离, 且种内遗传距离和种间遗传距离存在明显差异, 两者内可形成一个半段的间隔区, 即“DNA barcoding gap”, 用来判断种内不同个体之间的变异程度^[11]。Zheng 等^[24]在百合属内不同物种分子

鉴定中, 5条候选序列的 Barcoding gap 图表明, ITS 序列种与种间变异明显分为两大部分, 其分布较高的遗传变异可以明显区分, ITS 序列可作为鉴别百合属的较理想条形码序列。Yang 等^[25]对山矾属植物的最适 DNA 条形码片段筛选时, 从 Barcoding gap 图可看出, ITS 序列种内和种间的遗传距离频率分布重叠区域较小, 满足 DNA 条形码候选序列要求。本实验中 Barcoding gap 图显示, ITS 序列有明显的间隔区, 种间变异范围与种内变异范围无重叠区域, 作为优选序列有利于银柴胡药材的真伪鉴别。

ITS 序列在扩增效率、鉴定成功率、种内与种间变异、Barcoding gap、系统发育树等方面均较其他序列表现良好。因此, ITS 序列是准确鉴别银柴胡及其混伪品的理想 DNA 条形码鉴定序列。银柴胡 DNA 条形码的研究将为银柴胡市售药材的判定及混伪品鉴别提供可靠的分子水平依据。其也可作为《中国药典中药材 DNA 条形码标准序列》中银柴胡 DNA 条形码鉴定的补充, 为有效监管银柴胡药材流通领域的各个环节提供辅助手段, 有利于推动中药材市场的标准化和规范化, 对保障银柴胡药材的临床用药安全具有重要意义。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China . Part 1 (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 22-23.
- [2] Ao L, Li J, Liu YH. Chemical constituents from *Stellaria dichotoma* and their anti-inflammatory activities [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2018, 40: 1106-1109.
- [3] Jiang LL, Liu CK. Study on the therapeutic effect and clinical application of Wuji Baifeng pills [J]. Clin J Chin Med (中医临床研究), 2012, 23: 31-33.
- [4] Gao XM. Chinese Pharmacy (中药学) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007.
- [5] Shang BY. The quality analysis of cultivated Lanceolate Dichotomous Starwort Root in Ningxia [J]. Ningxia Med J (宁夏医学杂志), 2012, 34: 451-452.
- [6] Cai SQ, Li J. Species Systematization and Quality Evaluation of Commonly Used Chinese Traditional Drugs (常用中药材品种整理和质量研究) [M]. Beijing: Beijing Medical University Press, 2005.
- [7] Yu KQ, Jiao LK, Ren SY, et al. Research progress of Chinese traditional medicinal *Stellariae Radix* [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2015, 17: 1223-1229.
- [8] Chen F. The identification between *Stellariae Radix* and its adulterant *Silene jensiseensis* [J]. Guide China Med (中国医药指南), 2013, 11: 234-235.
- [9] Techen N, Parveen I, Pan Z, et al. DNA barcoding of medicinal plant material for identification [J]. Curr Opin Biotechnol, 2014, 25: 103-110.
- [10] Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270: S96-S99.
- [11] Li DZ, Liu JQ, Chen ZD, et al. Plant DNA barcoding in China [J]. J Syst Evolut, 2011, 49: 165.
- [12] Chen SL. DNA Barcoding Molecular Identification of Traditional Chinese Medicine (中药 DNA 条形码分子鉴定) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012: 14.
- [13] Chen SL, Song JY, Yao H, et al. Strategy and key technique of identification of Chinese herbal medicine using DNA barcoding [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2009, 7: 322-327.
- [14] Li J, Hao CQ, Zhang R, et al. Screening of the total DNA extraction methods for different material of *Radix Stellariae* [J]. Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学), 2018, 46: 43-46.
- [15] Zheng SH, Wei WL, Ren WG, et al. Molecular identification of the species of *Pinellia* and its adulterants by DNA barcoding [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2014, 49: 710-719.
- [16] Wang J, Hou YF, Bai Z, et al. Screening the universal sequence of DNA barcodes in *curcuma kwangsiensis* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2015, 30: 100-103.
- [17] Feng SS, Zheng SH, Li YK, et al. Identification of *Radix et Rhizoma Clematidis* and its adulterants using DNA barcoding [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 260-266.
- [18] Lu JN, Cheng H, Fan JJ, et al. DNA molecular identification of Chinese herbal materials of *Dysosma* by ITS2 barcode sequence [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 3907-3911.
- [19] Wang DY, Wang Q, Wang YL, et al. Evaluation of DNA barcodes in *Codonopsis* (Campanul-aceae) and in some large angiosperm plant genera [J]. PLoS One, 2017, 12: e0170286.
- [20] Meng XS, Dai XH, Liu P, et al. Study on genetic diversity of ITS sequence in *Stellaria dichotoma* var. *lacecolata* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41: 55-59.
- [21] Wang YD, Han XN, Zhao YD, et al. Identification of commercial *Bupleuri Radix* and its adulterants based on ITS2 barcode [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 3590-3596.
- [22] Lu QZ. The Study on DNA Molecular Identification of 12 Kinds of Common Medicinal Pteridophytes in Lushan Region (12种庐山地区常见药用蕨类植物的DNA分子鉴定研究) [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [23] Zhou M, Fan LL, Gao HX, et al. The DNA barcoding research of *Hedyotis diffusa* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2018, 29: 103-106.
- [24] Zheng SH, Li YK, Ren WG, et al. Molecular identification in genus of *Lilium* based on DNA barcoding [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 1730-1738.
- [25] Yang P, Zhou HY, Wu HE, et al. Screening research on DNA barcoding sequences of medicinal plants of *Symplocos* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41: 1331-1334.