

大黄与易混伪品土大黄、虎杖原植物的 ITS2 序列鉴定

李美妮 韩蕊莲 韩建萍 姚辉 罗焜 宋经元

【摘要】 目的 分析大黄与其易混伪品原植物的 rDNA 上的 ITS2 序列信息,探索鉴定大黄及其混伪品的新方法。方法 提取 DNA 模板后对其 ITS2 区进行 PCR 扩增、测序;拼接序列;计算种内种间 K2P 距离,最后基于 K2P 距离建立 NJ 树。结果 大黄与其混伪品的最小种间 K2P 距离(38.6%)大于最大种内 K2P 距离(8.0%),NJ 树中大黄三个基原的不同来源样品聚为一支。结论 因此 ITS2 序列可以作为鉴定大黄与易混伪品土大黄、虎杖的候选条形码序列,DNA 条形码技术在中药鉴定中具有极大的前景。

【关键词】 大黄; 混伪品; 鉴定; ITS2 序列

【中图分类号】 R282.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.03.006

Identification of original plants of Radix et Rhizoma Rhei from its adulterants Rhizoma et Radix Polygomi Cuspidati and Radix Rumicis Obtusifolii by ITS2 sequences LI Mei-ni, HAN Rui-lian, HAN Jian-ping, et al. College of Life Science, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Shaanxi 712100, China

Corresponding author: HAN Rui-lian, E-mail: ruiilianxiao@yahoo.com.cn; Han Jian-ping, E-mail: jphan@implad.ac.cn

【Abstract】 Objective The ITS2 sequence of rDNA was utilized as a novel technique to discriminate three original plants of Radix et Rhizoma Rhei from its adulterants. **Methods** DNA was extracted from each sample as template, of which the ITS2 region was amplified in a PCR and then sequenced. Sequences were assembled. Inter-and intra-specific K2P distances were calculated, based on which NJ tree was performed. **Results** The K2P distance of the minimum inter-specific 38.6% was higher than that of the maximum intra-specific 8.0%. The different samples of three original plants of Radix et Rhizoma Rhei were clustered into one clade. **Conclusion** The ITS2 fragment could be used as a candidate barcode for identifying original plants of Radix et Rhizoma Rhei from its adulterants Rhizoma et Radix Polygomi Cuspidati and Radix Rumicis Obtusifolii, and DNA barcoding has a wide prospect in authenticating Traditional Chinese Medicine.

【Key words】 Radix et Rhizoma Rhei; Adulterants; Identification; ITS2 sequence

大黄 Radix et Rhizoma Rhei 为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎^[1]。掌叶大黄及唐古特大黄

商品习称西大黄;药用大黄商品习称雅黄、南大黄。大黄具有泻肠通便、凉血解毒、逐瘀通经的功效。大黄为常用中药,用量较大,当药源供不应求时,有些地方用土大黄代替大黄使用^[2],这就影响了大黄

基金课题:国家自然科学基金(81001608)

作者单位:712100 陕西杨凌,西北农林科技大学生命科学院[李美妮(硕士研究生)、韩蕊莲];中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室[韩建萍、姚辉、罗焜、宋经元、李美妮(硕士研究生)]

作者简介:李美妮(1986-),女,2009 级在读硕士研究生。研究方向:植物学。E-mail:limeini5242@163.com

通讯作者:韩蕊莲(1962-),女,硕士生导师。研究方向:植物生态与植物资源利用研究。E-mail:ruiilianxiao@yahoo.com.cn;韩建萍(1977-),女,副研究员,硕士生导师。研究方向:中药资源学研究。E-mail:jphan@implad.ac.cn。韩蕊莲、韩建萍并列本文通讯作者。

文献标引格式:

李美妮,韩蕊莲,韩建萍,等.大黄与易混伪品土大黄、虎杖原植物的 ITS2 序列鉴定[J].环球中医药,2012,5(3):185-189.

准确、安全的临床效用。土大黄为蓼科植物钝叶酸模 *Rumex obtusifolius* L.、羊蹄 *Rumex japonicus* Houtt.、尼泊尔酸模 *Rumex nepalensis* Spreng、网果酸模 *Rumex chalepensis* Mill. 和巴天酸模 *Rumex patientis* L. 的根及根茎^[3]。土大黄具有止血、清热解毒和消肿的功效。以往的研究已经从来源、性状、显微、理化、功能及主治等几方面对大黄和土大黄进行了鉴别^[4]。另外,《中国药典》记载的药材虎杖的原植物蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 与大黄也常常容易被混淆。虎杖具有祛风利湿、散瘀定痛、祛痰的功效。

植物 DNA 条形码就是利用一个或少数几个标准的 DNA 片段快速、准确识别和鉴定植物种类^[5], 已成为近年来生物分类学研究的热点之一和物种鉴定的一种有力工具。自陈士林等和 Yao 等^[6,7] 提出 ITS2 序列可以作为药用植物乃至植物潜在的候选条形码以来,对于不同科属如蔷薇科、大戟科、菊科、豆科、芸香科、景天属、黄芪属、重楼属、豆蔻属^[8-16], 该序列均能成功鉴定相关近缘物种, 而且在中药及其混伪品鉴定中显示了极大的应用前景, 如筋骨草、砂仁、金钱草、京大戟、党参、藁本、小茴香、威灵仙、大青叶、赤芍、高良姜、垂盆草^[13,17-27]。ITS2 序列短, 一般为 200 bp 左右, 容易被成功扩增和测序, 甚至对一些降解的药材及粉末也能进行分析。实验研究所需材料少, 结果不受环境因素及物种发育阶段的影响, 对于形态学上难鉴定的密切相关种具有鉴定准确的优势。宋经元等^[28] 已经用 trnH-psbA 序列成功区分开了包括大黄、虎杖在内的蓼科 18 个物种, 本文拟用已经被广泛使用的 ITS2 序列对中药大黄与其混伪品土大黄、虎杖原植物进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料来源

材料来源如表 1 所示, 由中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定。其中有标本号的为实验材料的序列, 实验原材料为硅胶干燥的叶片。其余序列信息下载自 GenBank, 下载时间为 2011 年 9 月。

1.2 方法

提取 DNA、PCR 和测序: 参见前人研究^[6]。

数据分析: 拼接序列去除引物序列, 然后去除 5.8S 和 26S 编码区得到 ITS2 序列, 最后计算 K2P

遗传距离并基于此建立系统发生树^[27]。

表 1 材料来源

拉丁学名	标本号	登录号
<i>Rheum officinale</i>	PS2902MT03	GQ434857
<i>Rh. officinale</i>	PS2902MT08	GQ434858
<i>Rh. officinale</i>	PS2902MT09	GQ434859
<i>Rh. officinale</i>	—	JN187108
<i>Rh. palmatum</i>	PS2903MT01	GQ434860
<i>Rh. palmatum</i>	PS2903MT02	GQ434861
<i>Rh. tanguticum</i>	PS2904MT03	GQ434862
<i>Rh. tanguticum</i>	PS2904MT07	GQ434863
<i>Rh. tanguticum</i>	PS2904MT09	GQ434864
<i>Rumex japonicus</i>	—	AF338220
<i>Ru. nepalensis</i>	—	AF228219
<i>Ru. obtusifolius</i>	—	GQ340019
<i>Ru. obtusifolius</i>	—	FJ154481
<i>Polygonum cuspidatum</i>	—	FJ514494

2 结果

2.1 大黄种内序列比对分析

由于中药大黄属于多基原药材, 所以分析时不仅考虑了各个基原内的种内序列比对, 还有基原间的种间序列比对。除了药用大黄种内序列有 1 个碱基插入缺失外, 供试掌叶大黄和唐古特大黄的种内序列均完全相同。大黄种内比对长度为 187 bp, 有 14 个碱基变异。见图 1。

2.2 大黄与其混伪品土大黄、虎杖的种间序列比对分析

将土大黄的三个基原植物作为一个整体, 与大黄的三个基原整体序列进行比对, 比对后序列长度为 218 bp, 有 83 个碱基的变异, 另有 41 个碱基插入或缺失。虎杖与大黄的三个基原整体比对后序列长度为 201 bp, 有 61 个碱基变异, 另有 17 个碱基插入或缺失。如图 1 所示。

2.3 大黄与其混伪品土大黄、虎杖的 K2P 遗传距离分析

大黄的三个基原种内、种间的 K2P 距离, 大黄的三个基原分别与土大黄的三个基原、虎杖间的 K2P 距离如表 2 所示。根据表 2 计算大黄的种内 K2P 距离, 与土大黄、虎杖的种间 K2P 距离, 结果见表 3。种间最小 K2P 距离 (38.6%) 大于种内最大 K2P 距离 (8.0%), 因此 ITS2 序列能够识别大黄原植物及其混伪品土大黄和虎杖。

```

[
1 111111112 222222223 333333334 444444445 555555556 666666667 77777
[
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
Rheum_officinale_GQ434857 CGCACTGCGT CACCCG-AT CCCCCTCTC- ~GGGGGATC GGGGAGAGA CTGACCCAC- ATGCG-~C CCCCC
Rheum_officinale_GQ434858 .....
Rheum_officinale_GQ434859 .....
Rheum_officinale_JN187108 .....
Rheum_palmatum_GQ434860 .....A
Rheum_palmatum_GQ434861 .....A
Rheum_tanguticum_GQ434862 .A..C..A. ....Ca~ .....
Rheum_tanguticum_GQ434863 .A..C..A. ....Ca- .....
Rheum_tanguticum_GQ434864 .A..C..A. ....Ca- .....
Rumex_japonicus_AF338220 ....C... .G...C.C .....C- G...-CCG .....G... .G...C.C.G...-CC. .GG.
Rumex_nepalensis_AF338219 ....C... .G...CTC .....C- -...ACCG .....G... .G...C.C.G...-CC. .GG.
Rumex_obtusifolius_FJ154481 ---.C... .G...C.C .....C..CC.G...ATCG .....G... .G...C.C.G...GCC? .GG.
Rumex_obtusifolius_GQ340059 ....C... .G...C.C .....C- G...ATCG .....G... .G...C.C.G...-CC. .GG.
Polygonum_cuspidatum_FJ514494 ....C... .G...T- .....C- -...GY. ....G... .G...C.C.G...-CT. .G.

[
11111 111111111 111111111 111111111 111111111 111111111 11111
[
7777888888 8888999999 9999000000 0000111111 1111222222 2222333333 3333444444 44445
[
6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345
Rheum_officinale_GQ434857 CATGCCAGA CTAATGCAG GCCCCACAGC GCGAGAA-G CTGCAACGAT TG---GTGGT GTTACCAGTG GCCCC
Rheum_officinale_GQ434858 .....
Rheum_officinale_GQ434859 .....
Rheum_officinale_JN187108 .....
Rheum_palmatum_GQ434860 .....
Rheum_palmatum_GQ434861 .....
Rheum_tanguticum_GQ434862 .G..... .C.....A.....T.....
Rheum_tanguticum_GQ434863 .G..... .C.....A.....T.....
Rheum_tanguticum_GQ434864 .G..... .C.....A.....T.....
Rumex_japonicus_AF338220 .GC...G.C.....C...A...G.G. C.....C. GC..G...C ---...C..ACTTCA...AT.
Rumex_nepalensis_AF338219 -GC...G.C.....C...A...G.G. C.....T. GC..G...C C-...C..ACTTCA...AT.
Rumex_obtusifolius_FJ154481 .GC...G.C.....C...A...G.G. C.....C. GC..G...C CTG...C..ACTTCA...AT.
Rumex_obtusifolius_GQ340059 .GC...G.C.....C...A...G.G. C.....C. GC..G...C ---...C..ACTTCA...AT.
Polygonum_cuspidatum_FJ514494 .GC...G.C.....C.A. ....G.GA. C...-GC. GC..G... ..GG..CTGC..AT.

[
111111111 111111111 111111111 111111111 111111111 111111112 222222222 222222222
[
555555556 666666667 777777778 888888889 999999990 000000001 111111111
[
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
Rheum_officinale_GQ434857 CCGCAGC-CC TCAGGCGCC AAGAGCCCC TCGTGTGATG ATCACCATTG -----
Rheum_officinale_GQ434858 .....
Rheum_officinale_GQ434859 .....
Rheum_officinale_JN187108 .....
Rheum_palmatum_GQ434860 .....A
Rheum_palmatum_GQ434861 .....A
Rheum_tanguticum_GQ434862 ....T- .....AG
Rheum_tanguticum_GQ434863 ....T- .....AG
Rheum_tanguticum_GQ434864 ....T- .....AG
Rumex_japonicus_AF338220 ...TC..G.. CTCTA..G.. CCCC.GGAGA ..A.CG.CCC .C--G..C.C TACCGTTG-----
Rumex_nepalensis_AF338219 A..TC.-G.. C.CT...G.. CCCC.GGAGA ..A.CG.CC. .C--A..GC. GACCCCGTC CACCGTTG
Rumex_obtusifolius_FJ154481 ...TC..G.. CTCT...G.. CCCC.GGAGA ..A.CG.CCC CC.CA..GC. GACCCCGTC CACCGTT-
Rumex_obtusifolius_GQ340059 ...TC..G.. CTCT...G.. CCCC.GGAGA ..ACC.G.CCC .C--A..C.C TACCGTT-----
Polygonum_cuspidatum_FJ514494 ...TC..G.. C.GA...G.. C.C--GC.GG C.A-CG..C. GC.C.G..CA AACCGTTG-----

```

图 1 大黄、土大黄、虎杖种内种间 ITS2 序列比对

文献标引格式：
李美妮, 韩蕊莲, 韩建萍, 等. 大黄与易混伪品土大黄、虎杖原植物的 ITS2 序列鉴定 [J]. 环球中医药, 2012, 5 (3) : 185-189.

表 2 大黄及其混伪品的种内及种间 K2P 距离 (%)

	<i>Rh. officinale</i>	<i>Rh. palmatum</i>	<i>Rh. tanguticum</i>
<i>Rh. officinale</i>	0		
<i>Rh. palmatum</i>	1.1	0	
<i>Rh. tanguticum</i>	6.8	8.0	0
<i>Ru. japonicus</i>	45.5	44.5	47.6
<i>Ru. nepalensis</i>	47.5	46.7	48.7
<i>Ru. obtusifolius</i>	47.1	46.4	49.4
<i>Polygonum cuspidatum</i>	39.9	39.6	38.6

表 3 大黄及其混伪品的种内种间 K2P 距离统计

	K2P 距离 范围 (%)	平均 K2P 距离 (%)	变异位 点数 (个)
种内	0.0 ~ 8.0	1.8	0 ~ 14
种间	38.6 ~ 49.4	43.3	53 ~ 83

2.4 聚类分析

从系统聚类树中,可以看出中药大黄的三个基原植物聚为一支,支持率为 100,基于 ITS2 序列的 K2P 模型系统聚类树能够将大黄与土大黄、虎杖成功地区分开。中药土大黄三个基原植物聚为一支,支持率为 99,土大黄能够与虎杖相区别。基于聚类分析表明,ITS2 序列可以准确区分大黄原植物及其混伪品土大黄和虎杖。见图 2。

3 讨论

本文分析了大黄、土大黄、虎杖基原植物编码核糖体 RNA 的核基因的 ITS2 序列的 K2P 距离,并基于 K2P 距离建立了系统进化树,均证明 ITS2 序列可以准确鉴定这三种药材及不同基原植物,为大黄及其混伪品的鉴别提供了新的分子水平的研

究方法。虽然对于土大黄 3 个基原没有完全区别开,但条形码技术并非只局限于单个物种,如一群聚集的个体、一群界限不明的物种^[29],因此本文将土大黄作为一个整体的研究思路是可以接受的。另外从系统进化树可以看出土大黄的其中三个基原植物先聚在一起成为一支后,支持率为 99,再与虎杖聚为一大支,说明土大黄与虎杖的亲缘关系较大黄近,这与临床应用上虎杖和土大黄经常混淆的现象一致。从系统发生树又可以看出药用大黄的 4 个不同样品来源先与掌叶大黄的 2 个不同样品来源聚为一支,支持率为 91,然后再与唐古特大黄聚为一支,即药用大黄与掌叶大黄的亲缘关系较唐古特大黄更近。这与索风梅等^[30]通过分析大黄三个基原 AFLP,研究其亲缘关系的结果一致。从而更进一步说明植物 DNA 条形码技术为中药鉴定提供了有力的依据,也对植物系统分类工作起到了辅助作用。值得提醒的是,提取大黄 DNA 时应特别关注真菌污染,尤其是根部。可以通过 BLAST 方法对所获序列进行比对查错,保证后续的分析结果的准确性。

中药是一个复杂化学物质体系,发挥疗效通过多成分、多层次、多靶点和多途径作用于人体,所以难以从某 1~2 种成分对其进行鉴定,反应药品的内在质量。因此,在结合传统的形状鉴定、显微鉴定和理化鉴定等传统鉴定方法的基础上,能够成功利用一些现代化分析技术例如近几年的研究热点技术——DNA 条形码技术鉴别中药真伪,这一结论无疑给中药鉴定工作带来了极大的促进和希望。

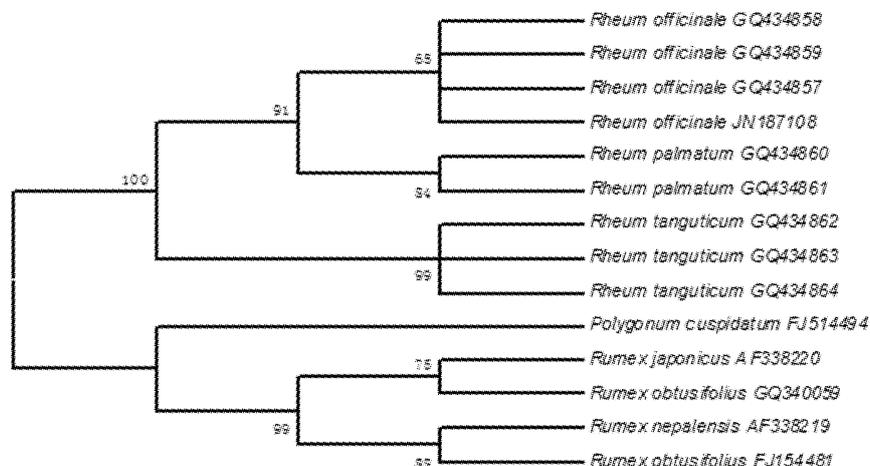


图 2 基于 K2P 模型的 ITS2 序列的 NJ 系统发生树图

(bootstrap 1000 次重复,枝上数值仅显示自展支持率 ≥ 50%)

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 17.
- [2] 杨兆起, 封秀娥. 中药鉴别手册: 第三册[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 22.
- [3] 孔增科, 傅正良, 熊南燕, 等. 易混淆中药品种辨析与临床应用[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2007: 46.
- [4] 果艳凤, 王会丽. 大黄与土大黄的鉴别及应用[J]. 河北中医, 2010, 32(10): 1546-1547.
- [5] Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(23): 8369-8374.
- [6] Shilin Chen, Hui Yao, Jianping Han, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8613.
- [7] Hui Yao, Jingyuan Song, Chang Liu, et al. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals [J]. PLoS ONE, 2010, 5(10): e13102.
- [8] Pang X, Song J, Zhu Y, et al. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification[J]. Cladistics, 2011, 27(2): 165-170.
- [9] Pang X, Song J, Zhu Y, et al. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae[J]. Plant Medica, 2010, 76(15): 1784-1786.
- [10] Gao T, Yao H, Song J, et al. Evaluating the Feasibility of Using Candidate DNA Barcodes in Discriminating Species of the Large Asteraceae Family [J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 26(10): 324.
- [11] Gao T, Yao H, Song J, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(1): 116-121.
- [12] 罗焜, 陈士林, 陈科力, 等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(4): 342-351.
- [13] 李妮, 陈科力, 刘震, 等. 景天属药用植物 DNA 条形码研究[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2010, 12(3): 463-467.
- [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] 朱英杰, 陈士林, 姚辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [16] 石林春, 宋经元, 陈士林, 等. 豆蔻属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2010, 12(3): 473-479.
- [17] 韩建萍, 石林春, 陈士林, 等. ITS2 序列鉴定筋骨草及其近缘种[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2008, 10(6): 86-89, 81.
- [18] 韩建萍, 李美妮, 石林春, 等. 砂仁及其混淆品的 ITS2 序列鉴定[J]. 环球中医药, 2011, 4(2): 99-102.
- [19] 庞晓慧, 宋经元, 孙超, 等. 中药金钱草及其混淆品的 ITS2 序列分析与鉴别[J]. 环球中医药, 2011, 4(2): 95-98.
- [20] 石林春, 宋经元, 李莉, 等. 基于 ITS2 条形码序列的京大戟及其易混品的 DNA 分子鉴定[J]. 环球中医药, 2011, 4(2): 103-108.
- [21] 刘美子, 刘萍, 李美妮, 等. 党参及其易混伪品的 ITS2 分子鉴定[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2011, 13(2): 412-417.
- [22] 高婷, 姚辉, 陈士林, 等. 基于 ITS2 序列的藁本与常见混伪品的分子鉴定[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2011, 13(2): 418-423.
- [23] 刘义梅, 罗焜, 陈科力, 等. ITS2 序列鉴定小茴香及其常见混伪品[J]. 环球中医药, 2011, 4(4): 260-263.
- [24] 曾旭, 李莉, 业宁, 等. 基于 ITS2 条形码的中药材威灵仙与其易混伪品的鉴定[J]. 环球中医药, 2011, 4(4): 264-269.
- [25] 孙稚颖, 罗红梅, 陈士林, 等. 大青叶及其混淆品的 ITS2 序列鉴定研究[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2011, 13(2): 395-399.
- [26] 孙稚颖, 宋经元, 姚辉, 等. 基于 ITS2 条形码的中药材赤芍及其易混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2011, 13(2): 407-411.
- [27] 罗焜, 陈科力, 刘义梅, 等. 高良姜及其混淆品的分子鉴定[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2011, 13(2): 400-406.
- [28] Jingyuan Song, Hui Yao, Ying Li, et al. Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 124(3): 434-439.
- [29] 陈念, 赖小平. 药用植物 DNA 条形码物种鉴定技术[J]. 中药材, 2010, 33(4): 648-650.
- [30] 索风梅, 宋经元, 陈士林, 等. AFLP 分析唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄的亲缘关系研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 292-296.

(收稿日期: 2011-12-12)

(本文编辑: 秦楠)