

三七及其2个近缘种的分子鉴定

黄玉玲¹, 李玲¹, 杨玉玲¹, 杨青松¹, 彭翠仙¹, 田迎秋^{2*}

(1. 文山州农业科学院, 云南文山 663099; 2. 文山学院三七医药学院, 云南文山 663099)

摘要: **目的** 对三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 及其2个近缘种屏边三七 *Panax stipuleanatus*、姜状三七 *Panax zingiberensis* 进行分子鉴定。**方法** 对3个物种17批样品的 ITS、*matK*、*psbA-trnH* 序列进行 PCR 扩增和测序, 从扩增成功率、测序成功率、序列长度、变异位点和信息位点数、种内种间差异、物种鉴定成功率等方面对各序列进行比较, 评价3个片段的物种鉴定能力。**结果** ITS 序列在变异位点、信息位点、种内种间差异、barcoding gap、物种鉴定成功率等方面与其他2个序列相比, 具有明显的优势。**结论** ITS、*psbA-trnH* 能准确鉴别三七及其2个近缘种, 而 *matK* 可用于三七与屏边三七的物种鉴定。

关键词: 三七; 屏边三七; 姜状三七; 分子鉴定; DNA 条形码

中图分类号: R282.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2410-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.063

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 是五加科人参属的药用植物, 但由于鉴别和认识能力不足, 民间将分布区存在重叠的姜状三七 *Panax zingiberensis*、屏边三七 *Panax stipuleanatus* 等此类三七近缘种统称为野三七。为合理有效利用三七及其近缘种资源, 有必要对其进行准确分类及鉴定。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 分子鉴定技术是由动物学家 Paul Hebert^[1] 于 2003 年提出的, 是利用基因组中一段标准的、相对较短的、具有足够变异的、易扩增的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术。Hollingsworth 等^[2] 建议将质体片段 *matK*、*rbcL*、*psbA-trnH* 作为植物的通用条形码, 并推荐将 *matK* 和 *rbcL* 联合使用。错用和混用药材威胁用药安全, 分子鉴定技术能从分子水平提供鉴别依据以减少错用和混用现象, 已成为目前药材鉴定的热点, 如蒋超等^[3] 采用多重位点特异性 PCR 鉴别人参、三七、西洋参的掺杂问题, 魏妙洁等^[4] 采用 ITS2 序列准确鉴定出市售三七片的原料药材, 基于 ITS2 序列可准确鉴别出藏柴胡及其易混品^[5]、人参与西洋参^[6]、九里香药材及其近缘物种^[7]、东北透骨草及其混伪品^[8], 基于 ITS 序列可准确鉴定北柴胡种子及其混伪品^[9], 采用 ITS2 及 *psbA-trnH* 可准确鉴别出鸡血藤及其混伪品^[10]、白头翁及混伪品^[11]、含岩白菜素药用植物^[12]。虽然 DNA 条形码技术在人参属物种鉴定中已有应用^[13], 但由于相近类群单位点的 DNA 条

形码缺乏足够的变化, 所以不能鉴别所有种。与通用 DNA 条形码相比, rDNA 明显提高了物种鉴定能力^[14], 因此, 为区分三七及其文山地区常见的易混淆种姜状三七和屏边三七, 本研究综合使用质体片段及核片段, 对 ITS、*matK*、*psbA-trnH* 序列进行扩增、测序及分析, 探讨这三个片段用于三者鉴别的可行性, 以期建立快速准确的分子鉴定方法。

1 材料

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen、屏边三七 *Panax stipuleanatus*、姜状三七 *Panax zingiberensis* 共 17 批, 采自云南文山、马关、金平等地, 经中国科学院昆明植物研究所纪运恒博士鉴定为正品, 具体信息见表 1。

2 方法

2.1 DNA 提取 采用改良型 CTAB 法。

2.2 PCR 扩增和测序 采用人参属 DNA 条形码候选序列^[15] 中信息位点数较多、片段长度较短的 ITS、*matK*、*psbA-trnH* 进行分析, 引物信息见表 2。PCR 扩增反应条件为总体积 25 μ L, 其中 dNTP 1 μ L (10 mmol/L)、Taq Buffer (with MgCl₂) 2.5 μ L (10X)、引物各 1 μ L (10 μ mol/L)、Taq 酶 0.2 μ L (5 U/ μ L)、模板 DNA 1~2 μ L (20~50 ng/ μ L); 扩增程序为预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min (变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 58~59 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 60 s) \times 38 个循环, 修复延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。测序工作由上海生工生物工程股份有限公司完成, 引物为 PCR 扩增中的正向、反向引物 (双向测序)。

收稿日期: 2020-09-07

基金项目: 文山州农业科学院 2019 年度基础科学研究项目 (2019WF04)

作者简介: 黄玉玲 (1987—), 女, 硕士, 农艺师, 从事药用植物资源收集与利用工作。Tel: 15987697865, E-mail: 908973000@qq.com

* 通信作者: 田迎秋 (1981—), 男, 博士, 农艺师, 从事药用植物资源收集与利用工作。Tel: 18896393938, E-mail: 920746242@qq.com

网络出版日期: 2021-08-17

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210817.0950.002.html>

表1 样品信息

物种名	编号			栽培地
	ITS	<i>psbA-trnH</i>	<i>matK</i>	
三七	HYL-1-8	HYL-2-8	HYL-3-8	云南文山
三七	HYL-1-9	HYL-2-9	HYL-3-9	云南文山
三七	HYL-1-10	HYL-2-10	HYL-3-10	云南文山
三七	HYL-1-11	HYL-2-11	HYL-3-11	云南文山
三七	HYL-1-12	HYL-2-12	HYL-3-12	云南文山
姜状三七	HYL-1-18	HYL-2-18	—	云南金平
姜状三七	HYL -1-19	HYL -2-19	—	云南金平
姜状三七	HYL-1-20	HYL-2-20	HYL-3-20	云南金平
姜状三七	HYL-1-21	HYL-2-21	HYL-3-21	云南金平
姜状三七	HYL-1-22	HYL-2-22	HYL-3-22	云南金平
姜状三七	HYL-1-23	HYL-2-23	HYL-3-23	云南金平
屏边三七	HYL-1-2	HYL-2-2	HYL-3-2	云南马关
屏边三七	HYL-1-13	HYL-2-13	HYL-3-13	云南马关
屏边三七	HYL-1-14	—	HYL-3-14	云南马关
屏边三七	HYL-1-15	HYL2-15	HYL-3-15	云南马关
屏边三七	HYL-1-16	HYL-2-16	HYL-3-16	云南马关
屏边三七	HYL-1-17	HYL-2-17	HYL-3-17	云南马关

注：—为测序未成功片段。

表2 引物信息

位点	引物
ITS	正向 GTTCTTTTCCTCCGCT
	反向 AGGAGAAGTCGTAACAAG
<i>matK</i>	正向 CGATCTATTCATTCAATATTTTC
	反向 GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG
<i>psbA-trnH</i>	正向 GTTATGCATGAACGTAATGCTC
	反向 CGCGCATGGTGGATTCAACAATC

2.3 序列处理与数据分析 应用 Geneious Prime 软件对 17 批样品的测序结果进行拼接和比对，去除低质量序列及引物区，再通过 MEGAX64 统计已比对序列的长度、变异位点

表3 3个DNA条形码特征比较 ($\bar{x} \pm s, n=17$)

片段	比对长度/ bp	(变异位点数/ 占比)/%	(信息位点数/ 占比)/%	种内平均变异	种间平均变异	PCR 成功 率/%	测序成功 率/%	含量/ %
ITS	611	45/7.36	40/6.55	0.001 371±0.001 155	0.044 105±0.009 141	94.12	93.75	61
<i>psbA-trnH</i>	508	16/3.15	16/3.15	0.000 931±0.000 833	0.017 859±0.003 365	100	94.12	31
<i>matK</i>	799	18/2.25	16/2.00	0.000 278±0.000 482	0.013 631±0.009 718	100	94.12	35

3.2 序列变异 如表3所示，ITS的比对长度为611 bp，变异位点、信息位点数分别为45、40，所占比例分别为7.36%、6.55%，在3个片段中变异最大；*psbA-trnH*的比对长度为508 bp，在3个片段中长度最短，变异位点、信息位点数均为16，所占比例为3.15%；*matK*比对长度为799 bp，变异位点、信息位点数分别为18、16，所占比例分别为2.25%、2.00%，是3个片段中变异最小的。

在种内种间平均遗传距离上，4个片段的种间分歧均大于种内分歧，均满足条形码标准。其中，ITS的种间平均变异(0.044 105)、种内平均变异(0.001 371)大于另外

及信息位点数量，并计算其K2P遗传距离。为确定物种鉴定成功率，即检验同一物种的不同个体能否聚类到一起，采用MEGAX64建立NJ树，通过Kimura两参数模型(Kimura 2-parameter model)重复1 000次的靴带分析法(Bootstrap method)进行，Gaps和Missing data采用配对状态删除(pairwise deletion)。NJ树上每个物种形成单系、支持率不低于50%的物种则认为鉴定成功，并且统计各候选片段的扩增成功率、测序成功率、物种鉴定成功率。

3 结果

3.1 PCR扩增与测序 见表3。

2个片段，*psbA-trnH*次之(0.017 859、0.000 931)，*matK*最小(0.013 631、0.000 278)。综上所述，ITS、*psbA-trnH*、*matK*序列种内种间平均遗传距离差异较大，均适合作为三七及其两个近缘种鉴别的DNA条形码。

PCR成功率变化范围在94.12%~100.00%之间，测序成功率变化范围在93.75%~94.12%之间。3个片段中*psbA-trnH*、*matK*的PCR成功率达100%，单次测序成功率均为94.12%；ITS的PCR成功率和测序成功率较*psbA-trnH*、*matK*稍低，分别为94.12%、93.75%。

3.3 NJ系统发育树 ITS片段在人参属6个种中的物种

鉴定成功率为100%。除人参 (*Panax ginseng*)、西洋参 (*Panax quinquefolius*) 外,三七 (*Panax notoginseng*)、屏边三七 (*Panax stipuleanatus*)、姜状三七 (*Panax zingiberensis*)、疣瘠七 (*Panax japonicas* var. *bipinnatifidus*) 支持率均大于90%,即得到成功鉴定,见图1。

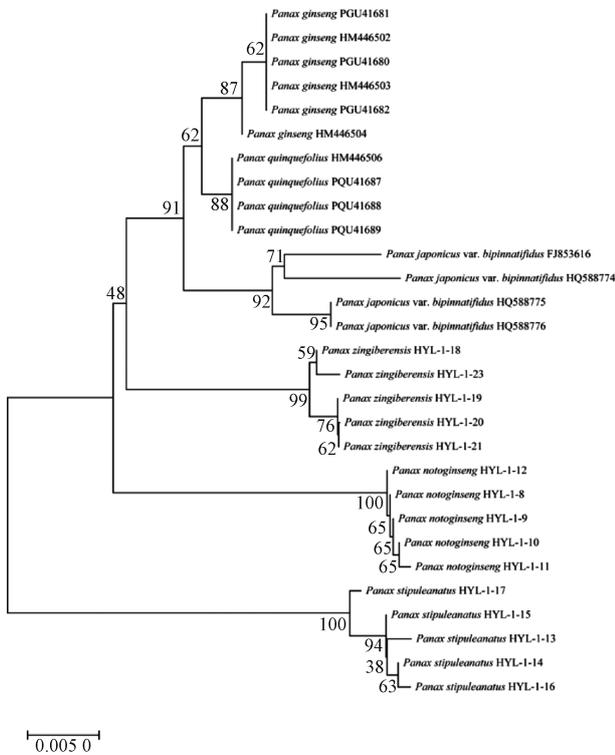


图1 基于ITS片段的人参属的NJ树(建树采用K2P模型)

psbA-trnH 片段在人参属6个种的物种鉴定中,仅姜状三七 (*Panax zingiberensis*)、三七 (*Panax notoginseng*) 支持率大于90%,屏边三七 (*Panax stipuleanatus*) 也得到准确鉴定,支持率为79%,见图2。

matK 片段在屏边三七 (*Panax stipuleanatus*)、假人参 (*Panax pseudo-ginseng*)、三七 (*Panax notoginseng*) 的鉴定中,支持率均大于80%,均得到成功鉴定,见图3。

4 讨论

由于三七 (*Panax notoginseng*)、姜状三七 (*Panax zingiberensis*)、屏边三七 (*Panax stipuleanatus*) 在形态特征上相似且化学成分存在差异,为保证三七用药的安全性,有必要对三者进行准确鉴别,由于传统鉴定方法多是基于形态学特征,依赖长期经验的积累,物种鉴定困难。本研究通过分析三七及其近缘种的3个DNA条形码的特征,计算物种的种内、种间遗传距离,评估序列的 barcoding gaps,使用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统树等方法来评估3个DNA条形码在三七及其两个近缘种鉴定中的适用性。实验结果表明,综合引物通用性、序列变异、信息位点、种内种间平均遗传距离、扩增成功率及测序成功率、物种鉴定成功率等方面,可知ITS片段和 *psbA-trnH* 片段可用于三七 (*Panax notoginseng*)、姜状三七 (*Panax*

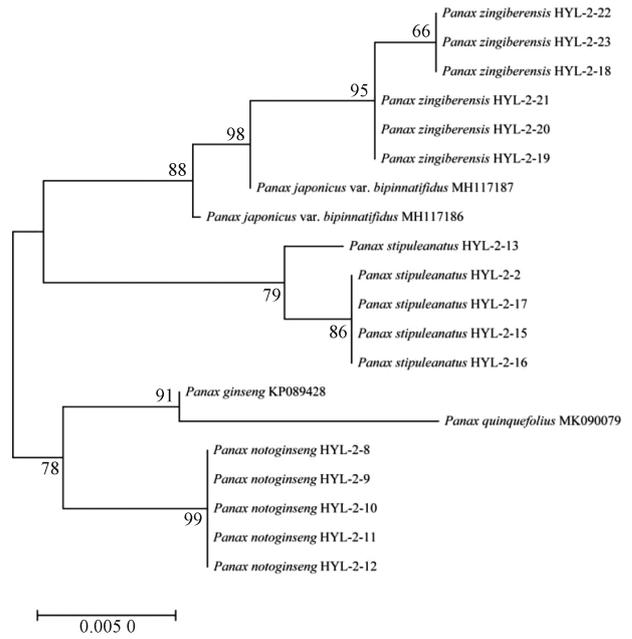


图2 基于psbA-trnH片段的人参属的NJ树(建树采用K2P模型)

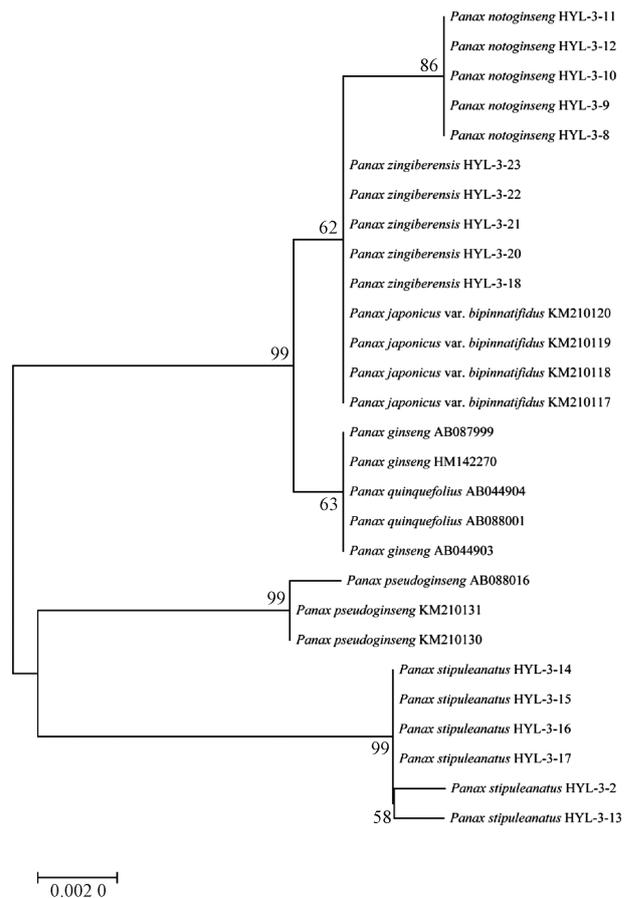


图3 基于matK片段的人参属的NJ树(建树采用K2P模型)

zingiberensis) 及屏边三七 (*Panax stipuleanatus*) 的分子鉴定中, *matK* 可用于鉴别三七 (*Panax notoginseng*) 和屏边

三七 (*Panax stipuleanatus*)。虽 *psbA-trnH* 的物种鉴定率稍低 (50%), 但这可能是由于疙瘩七 (*Panax japonicas* var. *bipinnatifidus*)、人参 (*Panax ginseng*)、西洋参 (*Panax quinquefolius*) 的个体数过少 (1~2 个个体) 导致的, 加大取样量可能有助于解决鉴定率低的问题, 未来可通过加大取样量来提高鉴定的准确性。

综上所述, ITS 在 3 个片段中的序列变异最大 (有 45 个变异位点和 40 个信息位点), 物种鉴定率最高 (100%), 可作为三七 (*Panax notoginseng*)、姜状三七 (*Panax zingiberensis*)、屏边三七 (*Panax stipuleanatus*) 的快速鉴定条形码; *psbA-trnH* 虽物种鉴定率稍低 (50%), 但三七 (*Panax notoginseng*)、姜状三七 (*Panax zingiberensis*)、屏边三七 (*Panax stipuleanatus*) 均得到了准确鉴定; *matK* 能准确鉴别出三七 (*Panax notoginseng*) 及其屏边三七 (*Panax stipuleanatus*), 可用于三七及其屏边三七的物种鉴定。三七具有较高的药用价值和经济价值, 分子鉴定的开展有助于解决产品掺假等问题, 进而维持市场稳定、保护消费者权益。

参考文献:

[1] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.

[2] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (31): 12794-12797.

[3] 蒋超, 罗宇琴, 袁媛, 等. 多重位点特异性 PCR 鉴别人参, 三七, 西洋参掺杂[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (7): 1319-1323.

[4] 魏妙洁, 石林春, 赵晴, 等. 三七片 DNA 条形码分子鉴定及方法学考察[J]. *中草药*, 2020, 51(7): 1893-1900.

[5] 夏召弟, 刘霞, 冯玛莉, 等. 基于 ITS2 条形码鉴定藏柴胡及其易混品[J]. *中草药*, 2020, 51(23): 6062-6069.

[6] 林凤越, 曹辉, 任欢欢, 等. 基于 ITS2 序列的人参及同属易混品西洋参种子的分子鉴定[J]. *中草药*, 2019, 50 (9): 2188-2193.

[7] 邢建永, 周红, 吴正军, 等. 九里香药材及其近缘物种 ITS2 分子鉴定研究[J]. *世界中医药*, 2020, 15 (11): 1559-1564.

[8] 马丽杰, 吴云, 谷巍, 等. 基于 ITS2 序列的东北透骨草及其混伪品 DNA 分子鉴定[J]. *中草药*, 2019, 50(23): 5830-5837.

[9] 赵晴, 谢红波, 央拉, 等. 基于 DNA 条形码技术的北柴胡种子分子鉴定[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26 (14): 182-189.

[10] 熊瑶, 金晨, 王晓云, 等. 鸡血藤及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定研究[J]. *中草药*, 2020, 51 (12): 3274-3283.

[11] 张丹纯, 官璐, 黄志海. 中药白头翁及混伪品的 DNA 条形码分子鉴定[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (2): 896-899.

[12] 韦雅露, 张雁春, 李秋娥, 等. 含岩白菜素药用植物 DNA 条形码的鉴定研究[J]. *华西药学杂志*, 2021, 36(1): 44-50.

[13] Nguyen V B, Park H S, Lee S C, et al. Authentication markers for five major *Panax* species developed via comparative analysis of complete chloroplast genome sequences[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(30): 6298-6306.

[14] Kane N, Sveinsson S, Dempewolf H, et al. Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA[J]. *Am J Bot*, 2012, 99 (2): 320-329.

[15] Zuo Y J, Chen Z J, Kondo K, et al. DNA barcoding of *Panax* species[J]. *Planta Med*, 2011, 77(2): 182-187.