基于 ITS2 序列及二级结构对紫苏与其变种、紫苏子与其混伪品的鉴别

郑梦迪， 贺紫涵， 张 春， 汪兴军
（西安医学院 药学院，陕西 西安 710021）

摘要： 采用 ITS2 一级序列联合其二级结构对紫苏与其变种、紫苏子与其混伪品进行鉴定，为紫苏药材的使用提供更科学的分类方法。收集紫苏与其近缘种、紫苏子混伪品基源植物样本，提取 DNA 进行 PCR 扩增；并结合 GenBank 中的序列获得所有物种的 ITS2 序列。应用 MEGA7.0 软件进行序列分析、计算种内种间遗传距离、构建 NJ 树，利用 ITS2 数据库预测各物种的 ITS2 二级结构。利用 4Sale 软件进行一级结构联合二级结构矩阵的比对，运用 ProfDistS 软件构建 PNJ 树。ITS2 序列的扩增成功率高。除白苏以外，紫苏与其他变种的 ITS2 序列具有明显的 Barcoding gap；NJ 树显示，ITS2 可将紫苏、白苏与其他变种区分；紫苏和白苏在 ITS2 二级结构中有差异。紫苏子与其混伪品的 ITS2 序列差异较大，种间具有显著的遗传距离，NJ 树和 PNJ 树显示紫苏子与各混伪品分别各自聚为一支，且有较高的自展支持率。因此，基于 ITS2 条形码可以准确鉴别紫苏子与其混伪品，为规范药材市场和保障临床用药安全提供可靠方法；但对于紫苏与其变种白苏的鉴别需要结合 ITS2 二级结构，或建议将白苏和紫苏合并为一个种，为紫苏属的植物分类提供参考。

关键词： 紫苏；ITS2；二级结构；分子鉴定
中图分类号：R 282.5 **文章编号：**1673-1689(2022)04-0093-09 **DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.04.012

Molecular Identification of *Perilla frutescens* and Its Varieties, *Perillae fructus* and Its Adulterants Based on ITS2 Primary Sequence and Its Secondary Structure

ZHENG Mengdi， *HE Zihan*， *ZHANG Chun*， *WANG Xingjun*
（School of Pharmacy，Xi'an Medical University，Xi'an 710021，China）

Abstract： The identification of Perilla frutescens and its varieties, *Perilla fructus* and its adulterants was studied based on ITS2 primary sequence combined with its secondary structure, providing a more scientific classification method for the usage of *Perilla frutescens* as a medicinal plant. After the collection of *Perillae fructus* and its adulterants, *Perilla frutescens* and its varieties, their DNA was isolated for PCR amplification. The ITS2 sequences of all species were obtained through the combination with the sequences in GenBank. MEGA 7.0 software was used for analysis of sequence,

收稿日期： 2021-07-13
基金项目： 陕西省科技厅自然科学基础研究计划项目(2021JQ-782)；陕西省教育厅专项项目(21JK0900)。
作者简介： 郑梦迪(1988—)，女，博士，副教授，主要从事药用植物研究。E-mail：670677492@qq.com

calculation of intra-species and inter-species genetic distances, and construction of NJ cluster tree. The prediction of ITS2 secondary structure of each species was based on ITS2 database. 4Sale software was used to compare the primary structure with the second structure matrix, and ProfDistS software was used to construct the evolutionary tree of PNJ. ITS2 sequence had high success rate of amplification. Except *P. frutescens* var. *frutescens*, ITS2 sequences of *Perilla frutescens* and other varieties had significant barcoding gap. NJ tree showed that ITS2 could distinguish *Perilla frutescens* and *P. frutescens* var. *frutescens* from other varieties. *Perilla frutescens* and *P. frutescens* var. *frutescens* differed in the secondary structures of ITS2. The ITS2 sequences of *Perilla fructus* and its adulterants were quite different, and there was significant genetic distance between various species. NJ tree and PNJ tree showed that *Perilla fructus* and its adulterants were clustered into separate branches with higher bootstrap values. Based on ITS2 barcode, *Perillae fructus* and its adulterants could be accurately identified, providing a reliable method for standardizing the pharmacopeial herbs market and ensuring the clinical medication safety. However, the identification of *Perilla frutescens* and its variety *P. frutescens* var. *frutescens* should be combined with the secondary structure of ITS2. It is also suggested that *Perilla frutescensa* and *P. frutescens* var. *frutescens* could be combined into one species to provide reference for the classification of *Perilla* genus.

Keywords: *Perilla frutescens*, ITS2, secondary structure, molecular identification

紫苏 *Perilla frutescens*(L.) Britt.为唇形科紫苏属植物,是一种常见的药食两用植物资源[1],据 2015 版《中国药典》记载,紫苏干燥成熟的果实入药称为紫苏子,具有降气化痰、止咳平喘、润肠通便的作用;其干燥叶(或带嫩枝)为紫苏叶入药,具有解表散寒、行气和胃的功效[2]。由于紫苏属下变种较多,历代本草文献中对于紫苏及其变种用途及分类的记载混乱,其植物命名和分类争议存在已久[3-4]。魏晋时期《名医别录》最早记载紫苏入药,分为“苏”和“荏”,“苏”即现代所使用的紫苏,“荏”即指白苏[3]。南宋王介编绘的《履巉岩本草》中记载了野苏,经考证为紫苏的近似种。《本草纲目》中除对紫苏和白苏的记载,另外还收录了一种花紫苏,“其叶细齿,纽如剪成之状,色香茎子并无异者,人称回回苏”[3]。《中国植物志》对紫苏属划分为紫苏 *P. frutescens*(原变种)、白苏 *P. frutescens* var. *frutescens*、回回苏 *P. frutescens* var. *crispa*(Thunb.) Hand.-Mazz.、耳齿紫苏 *P. frutescens* var. *auriculato-dentata* C. Y. Wu. et Hsuan 和野生紫苏 *P. frutescens* var. *purpurascens* (Hayata) H. W. Li[1]。然而由于紫苏属植物在我国广泛人工栽培,属下不同变种植物的表型特征非常相似,并且表型往往受到植物自身生长周期和外界环境因素的影响,从而造成传统鉴定方法易产生混淆,进而危及用药安全。另一方面,紫苏子在加工食品、功能性饮品、保健品及化妆品等领域的应用逐渐增多,但产量低不能满足增长的市场需求量;种苗错误种植、混合种植、混合收购、人为掺入等现象屡见不鲜,再加之药用紫苏子经过炮制后外观特征丢失,常有急性子、沙苑子、白芥子、油菜子和菟丝子等种子混入,从而造成传统方法对紫苏子与其混伪品的鉴别困难[5-6]。

DNA 条形码(DNA barcoding)技术是利用生物基因组上一段具有足够变异,且易于 PCR 扩增的片段,可用来区分不同物种的分子生物学技术,是对传统物种鉴定方法的有效补充[7]。其中 ITS2 (Internal transcribed spacer 2)条形码在植物分类鉴别中的稳定性和适用性已得到广泛验证[8-11]。ITS2 片段位于 5.8S 和 28S 核 rDNA 基因之间。rDNA 转录形成 rRNA,RNA 的一级结构是指 A、U、C、G 4 种核苷酸的排列组合;RNA 的二级结构是指其自身回折形成茎环结构,不配对碱基构成环区,茎干区由配对碱基构成[12-13];而在茎干区,有时可发生补偿性碱基替换(Compensatory base changes,简称 CBC),即为了维持配对结构,一侧碱基发生突变会引起另

一侧碱基的响应配对性突变，如 C–G 配对中，胞嘧啶 C 突变为腺嘌呤 A，原配对中的 G 相应突变为 U，即由 C–G 变化为 A–U，从而维持二级结构的稳定性。研究表明，发生 CBC 的两个个体之间存在生殖隔离，CBC 与杂交不亲和有很强的相关性，即 ITS2 二级结构中的 CBC 是一种对真核生物进行分类的有效方法[14–15]。

近年来对紫苏与其变种的分子鉴别仅停留在核酸序列层面[16]，并且尚无对紫苏子与其混伪品的 DNA 条形码鉴别研究。因此作者拟采用 ITS2 序列结合二级结构，对紫苏与其变种、紫苏子与其混伪品进行分析，为中药材紫苏叶与紫苏子在分子水平上的鉴别提供科学依据，保障临床用药的合理性和有效性。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究收集紫苏植物材料 3 份，分别来自浙江衢州、陕西西安、桂林全州；白苏植物 1 份，来源于江西赣州；于 GenBank 获得 ITS 序列，包括紫苏 3 条、白苏 10 条、野生紫苏 2 条、回回苏 3 条、耳齿紫苏 3 条、3 个日本紫苏品种（文中记为日本紫苏 I、II、III）各 1 条、外类群枸骨 5 条；共 33 份样本信息见表 1。另外，紫苏子与其混伪品样本信息见表 2，

表 1　紫苏与其变种的材料种类和来源的详细资料

Table 1　Detailed information of materials types and sources of *P. frutescens* and its varieties

植物名	拉丁学名	来源	编号/序列号
紫苏	*P. frutescens*	浙江衢州	ZSM2
紫苏	*P. frutescens*	陕西西安	ZS1
紫苏	*P. frutescens*	桂林全州	JG1
紫苏	*P. frutescens*	GenBank	KC011247
紫苏	*P. frutescens*	GenBank	DQ471344
紫苏	*P. frutescens*	GenBank	DQ471341
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	江西赣州	BS1
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	KC011247
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	KC011246
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	KC011245
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	KC011248
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	DQ471340
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	DQ471339
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	KR082768
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	KC011244
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	KF012857
白苏	*P. frutescens* var. *frutescens*	GenBank	DQ667246
野生紫苏	*P. frutescens* var. *purpurascens*	GenBank	KC011253
野生紫苏	*P. frutescens* var. *purpurascens*	GenBank	KC011254
回回苏	*P. frutescens* var. *crispa*	GenBank	KC011249
回回苏	*P. frutescens* var. *crispa*	GenBank	KC011250
回回苏	*P. frutescens* var. *crispa*	GenBank	DQ471342
耳齿紫苏	*P. frutescens* var. *anriculato–dentata*	GenBank	KC011252
耳齿紫苏	*P. frutescens* var. *anriculato–dentata*	GenBank	KC011251
耳齿紫苏	*P. frutescens* var. *anriculato–dentata*	GenBank	DQ471343
日本紫苏 I	*P. citriodora*	GenBank	KT220699
日本紫苏 II	*P. frutescens* var. *hirtella*	GenBank	KT220700
日本紫苏 III	*P. setoyensis*	GenBank	KT220701
枸骨	*Ilex cornuta*	GenBank	MH566938
枸骨	*Ilex cornuta*	GenBank	MH711786
枸骨	*Ilex cornuta*	GenBank	MK240428
枸骨	*Ilex cornuta*	GenBank	MK034010
枸骨	*Ilex cornuta*	GenBank	MH566937

包括紫苏子基源植物样本 2 份,分别来源于浙江衢州和陕西西安;菟丝子和油菜子基源植物样本各 1 份,分别来自广东茂名和陕西西安;GenBank 下载 ITS 序列包括紫苏子 3 条、急性子 4 条、白芥子 5 条、沙苑子 3 条、菟丝子 3 条、油菜子 2 条;共 24 份样本。所有植物材料经西安医学院药学院生药教研室汪兴军老师鉴定,并保存于-80 ℃冰箱。

表 2　紫苏子与其混伪品的材料种类和来源的详细资料

Table 2　Samples of *Perillae fructus* and its adulterants

药材名	基源植物拉丁名	来源	编号/序列号
紫苏子	*P. frutescens*	浙江衢州	ZS1
紫苏子	*P. frutescens*	陕西西安	ZSM2
紫苏子	*P. frutescens*	Genbank	DQ471345
紫苏子	*P. frutescens*	Genbank	DQ471344
紫苏子	*P. frutescens*	Genbank	DQ471341
急性子	*Impatiens balsamina*	Genbank	AY348749
急性子	*Impatiens balsamina*	Genbank	KC905466
急性子	*Impatiens balsamina*	Genbank	MH808398
急性子	*Impatiens balsamina*	Genbank	MH808397
菟丝子	*Cuscuta chinensis*	广东茂名	TS1
菟丝子	*Cuscuta chinensis*	Genbank	MT982782
菟丝子	*Cuscuta chinensis*	Genbank	MT982784
菟丝子	*Cuscuta chinensis*	Genbank	MT982783
白芥子	*Sinapis alba*	Genbank	AY348749
白芥子	*Sinapis alba*	Genbank	FJ609733
白芥子	*Sinapis alba*	Genbank	MG923992
白芥子	*Sinapis alba*	Genbank	MG923991
白芥子	*Sinapis alba*	Genbank	MG923990
沙苑子	*Astragalus complanatus*	Genbank	KT163384
沙苑子	*Astragalus complanatus*	Genbank	KT163386
沙苑子	*Astragalus complanatus*	Genbank	KT163380
油菜子	*Brassica napus*	陕西西安	YC1
油菜子	*Brassica napus*	Genbank	MG235273
油菜子	*Brassica napus*	Genbank	KX709366

1.2　方法

1.2.1　DNA 提取　用体积分数 75%乙醇擦拭新鲜植物样本叶或茎的表面，取约 150 mg 组织于 1.5 mL 灭菌离心管中,迅速放入液氮中冷冻。在液氮环境下,用灭菌小木棒研磨植物组织至粉末状。再按照 DP305 植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 DNA。

1.2.2　PCR 扩增、测序和校正　选择 ITS2 通用引物进行序列扩增[17],ITS2F(5′-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3′)和 ITS2R(5′-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3′)。RCR 反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s、56 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s,循环 40 次,72 ℃ 2 min。PCR 反应体系:DNA 模板1 μL，引物 ITS2F 和 ITS2R 各 1 μL,DNA 聚合酶 2×Taqmix 12.5 μL,ddH_2O 补充至 25 μL。PCR 产物由北京擎科泽西生物科技有限公司完成 Sanger 测序,每个样本重复 3 次测序。通过 Contig Express 软件去除每条序列的两端引物区,检查测序峰图并进行人工校正,最终得到全部序列。

1.2.3　GenBank 序列下载及 ITS2 注释　通过 GenBank(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)分别下载紫苏与其变种、紫苏子与其各混伪品的 ITS 序列,并通过 BLAST 相似性搜索排除可疑序列。将所得序列连同测序序列,基于隐马尔可夫模型 HMM[18]除去位于两端的 5.8S 和 28S 序列，得到所有样本的 ITS2 序列。使用 Clustal omega 在线软件对所有收集到的序列进行比对和矫正。

1.2.4　序列分析、遗传距离计算及 NJ 树构建　MEGA7.0 软件比对序列矩阵,统计 GC 含量、保守位点和变异位点等信息；基于 Kimura 2-parameter

(K2P)模型计算各物种种内和种间遗传距离,采用邻接法(Neighbor joining,NJ)构建系统发育树,设置参数 Bootstrap 自展支持率 1 000 次重复检验各分支。

1.2.5 ITS2 二级结构预测及 PNJ 树构建 利用 ITS2 Database (http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/)中 Predict 功能预测各物种 ITS2 的二级结构。下载各样本的核酸序列和二级结构联合矩阵,通过 4Sale 软件比对联合矩阵,进行序列和二级结构的比对。比对完成后对 ITS2 一级序列和二级结构系统发育树进行构建,4Sale[19]导出的比对结果输入 ProfDistS[20]软件,基于距离法利用剖面邻接 Profile neighbor-joining (PNJ) 构建系统发育树,并自展分析 1 000 次来评价分支系统发育关系的可靠性。

2 结果与分析

2.1 紫苏与其变种 ITS2 变异位点分析

紫苏与其变种的 ITS2 序列长度相近,集中在 231 bp 和 233 bp。3 个日本紫苏品种的 ITS2 序列 GC 含量较高在 81.20%~82.00%,而紫苏与其他变种的序列 GC 含量为 64.20%~65.40%(见表 3)。紫苏 I(序列号 KC011247)在 123 bp 处有 T→G 一个变异位点,即紫苏种内存在 2 种单倍型;回回苏和耳齿紫苏分别在 222 bp 和 22 bp 处各有一个变异位点。野生紫苏在 22、103 bp 处发生变异,共两个变异位点。白苏无变异位点。3 个日本紫苏与其他变种间序列变异较大。变异位点信息如表 4 所示。

表 3 紫苏与其变种的 ITS2 序列差异分析

Table 3 ITS2 sequence analysis of *P. frutescens* and its varieties

物种	GC 含量/%	序列长度/bp	保守位点	变异位点	简约信息位点
紫苏	64.90	231	230	1	0
白苏	65.40	231	231	0	0
耳齿紫苏	64.80	233	233	1	0
野生紫苏	64.80	233	231	2	2
回回苏	64.20	231	230	1	1
日本紫苏 I	81.20	233	228	5	4
日本紫苏 II	82.00	233	229	4	4
日本紫苏 III	81.60	233	232	1	1

表 4 紫苏与其变种的变异位点分析

Table 4 Variation sites of *P. frutescens* and its varieties

物种	22	70	71	103	123	176	180	215	216	222
共有碱基	C	C	T	A	T	T	A	C	C	G
紫苏 I	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*
紫苏 II	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
白苏	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
耳齿紫苏	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*
野生紫苏	T	*	*	T	*	*	*	*	*	*
回回苏	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A
日本紫苏Ⅰ	*	T	C	*	*	C	C	*	A	*
日本紫苏Ⅱ	*	*	C	*	*	C	C	T	*	*
日本紫苏Ⅲ	22	*	C	*	*	*	*	*	*	*

注:表中 * 代表与共有碱基相同的碱基。

2.2 紫苏与其变种遗传距离分析

基于 K2P 模型计算的遗传距离显示(见表 5),紫苏的平均种内遗传距离为 0.002,其余各变种的种内遗传距离均为 0.000。白苏与紫苏的种间遗传距离为 0.001,紫苏的种内遗传距离大于紫苏与白苏种间遗传距离,因此不能将白苏和紫苏区分开。

白苏、紫苏与其他变种种间的遗传距离为0.005~0.033,大于各物种的种内遗传距离 0.000~0.002;即白苏、紫苏分别与其他变种及其他各物种(不含构骨)的种间最小遗传距离大于各物种种内最大遗传距离。因此,从遗传距离水平,ITS2 序列可将紫苏、白苏与其他变种区分开。

表 5　紫苏与其变种的遗传距离

Table 5　Genetic distance table of *P. frutescens* and its varieties

	白苏	紫苏	回回苏	野生紫苏	耳齿紫苏	日本紫苏Ⅰ	日本紫苏Ⅱ	日本紫苏Ⅲ	构骨
白苏	0.000								
紫苏	0.001	0.002							
回回苏	0.005	0.005	0.000						
野生紫苏	0.009	0.010	0.014	0.000					
耳齿紫苏	0.005	0.005	0.009	0.005	0.000				
日本紫苏Ⅰ	0.023	0.024	0.028	0.033	0.028	0.000			
日本紫苏Ⅱ	0.019	0.019	0.023	0.028	0.014	0.023	0.000		
日本紫苏Ⅲ	0.005	0.005	0.009	0.014	0.009	0.019	0.014	0.000	
构骨	0.661	0.664	0.676	0.690	0.683	0.671	0.664	0.661	0.000

2.3　紫苏与其变种二级结构及 CBC 模型分析

紫苏与其变种的 ITS2 二级结构均由一环（主环)四臂(螺旋区)组成(见图 1),并且中心环和茎臂的夹角在不同物种间较为相近。其中紫苏包含 3 个内环和 4 个发夹环,与白苏、耳齿紫苏和回回苏相比在臂 IV 上区少了 2 个内环,与野生紫苏、日本紫苏 I 相比在臂 III 和臂 IV 区上各少 2 个内环，与日本紫苏 II 相比,臂 IV 区少了 2 个内环。白苏包含有 4 个发夹环和 5 个内环,白苏比野生紫苏在臂 III 区少 1 个内环，白苏和耳齿紫苏的臂 IV 区的内环的位置也不同。在臂 IV 区处回回苏的第 1 个内环比耳齿紫苏更靠近中心环。回回苏相比野生紫苏在臂 III 上少 1 个内环，并且臂 IV 区的第 1 个内环更靠近中心环。即紫苏与白苏及其他变种之间,ITS2 二级结构在内环的数量和位置均存在差异。CBC(补偿性碱基替换)模型的统计结果显示,回回苏分别与白苏、耳齿紫苏、野生紫苏在臂Ⅳ区具有 1 个 CBC(203/222 T-A→G-C)和 1 个 hCBC(204/221 T-A→T-G)(见图 2),基于 CBC 模型显示回回苏分别与白苏、耳齿紫苏、野生紫苏符合杂交不亲和现象。综上所述,ITS2 二级结构对于紫苏与其变种的鉴别具有指导意义。

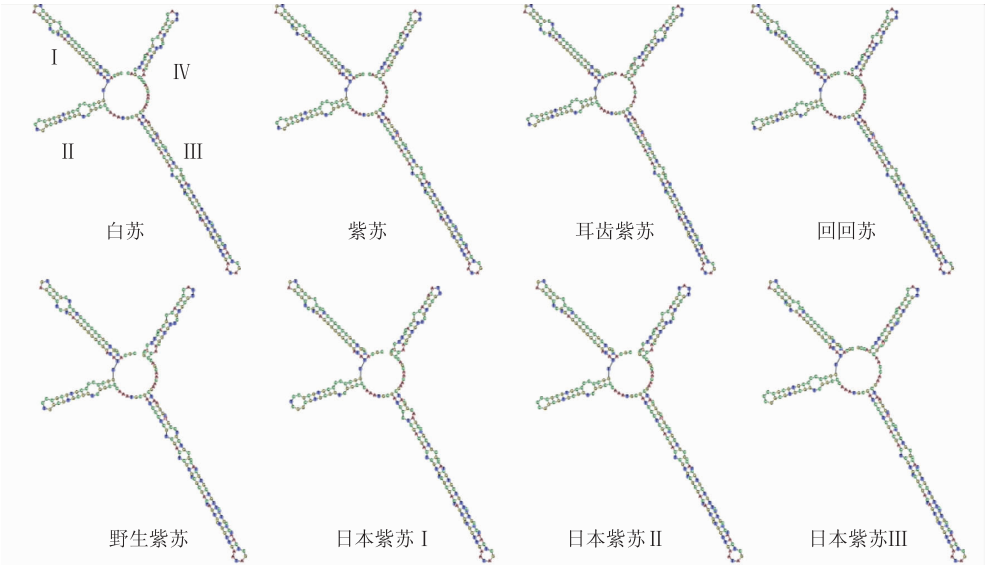


图 1　紫苏与其变种的 ITS2 二级结构图

Fig. 1　ITS2 secondary structure prediction diagram of *P. frutescens* and its varieties

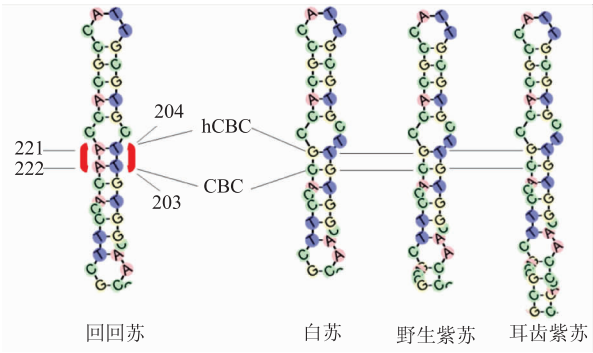


图 2　紫苏与其变种的 ITS2 二级结构 CBC 模型

Fig. 2　CBC of ITS2 secondary structure of *P. frutescens* and its varieties

2.4　紫苏与其变种 NJ 树分析

由 ITS2 序列构建的 NJ 树可以看出,日本紫苏与我国产紫苏与其变种明显区分开(见图 3)。从分支情况和支持率可见,紫苏和白苏样本不能有效的区分开,共聚为一个大分支,二者亲缘关系最近;回回苏、耳齿紫苏和野生紫苏形成姐妹分支,其中野生紫苏与耳齿紫苏亲缘关系较近。冬青科植物枸骨 *Ilex cornuta* 作为外类群。

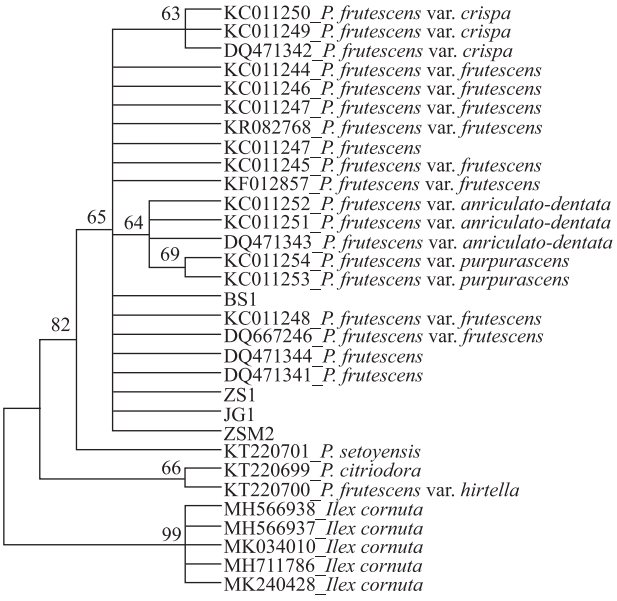


图 3　紫苏与其变种的 NJ 树

Fig. 3　NJ tree of *P. frutescens* and its varieties

2.5　紫苏子与其混伪品的序列和遗传距离分析

紫苏子与其混伪品的 ITS2 序列差异较大(见表 6),序列长度在 191~233 bp,GC 含量在 50.50%~64.90%,物种间也存在大量变异位点。如表 7 所示,基于 K2P 模型计算紫苏子与其混伪品的遗传距离,急性子、白芥子、油菜子种内遗传距离均为0.000,紫苏子种内平均遗传距离为 0.003,种内最大遗传距离的是混伪品沙苑子 0.013。种间最小遗传距离是白芥子和沙苑子 0.627;紫苏子与其混伪品白芥子的遗传距离最小,而紫苏子与其混伪品菟丝子的遗传距离最大。所有物种的种间最小遗传距离(0.627)大于种内最大遗传距离(0.013),并且紫苏子与其混伪品的种间最小遗传距离(0.634)远大于紫苏子种内遗传距离,表明基于 K2P 遗传距离,ITS2 序列能够区分紫苏子与其混伪品(急性子、沙苑子、白芥子、菟丝子和油菜子)。

表 6　紫苏子与其混伪品的 ITS2 序列分析

Table 6　ITS2 sequence analysis of *Perillae fructus* and its adulterants

药材	GC 含量/%	序列长度/bp	保守位点	变异位点	简约信息位点
紫苏子	64.90	231	100	131	131
急性子	50.50	200	194	6	6
菟丝子	51.40	211	116	95	99
白芥子	54.20	192	75	117	116
沙苑子	51.70	233	90	143	139
油菜子	52.90	191	77	114	116

表 7　紫苏子与其混伪品的遗传距离

Table 7　Genetic distance table of *Perillae fructus* and its adulterants

药材	紫苏子	急性子	菟丝子	白芥子	沙苑子	油菜子
紫苏子	0.003					
急性子	0.813	0.000				
菟丝子	1.100	0.693	0.012			
白芥子	0.634	1.034	1.052	0.000		
沙苑子	0.712	0.976	0.929	0.627	0.013	
油菜子	0.727	1.022	1.039	1.029	0.705	0.000

2.6　紫苏子与其混伪品的二级结构预测及分析

紫苏子与其混伪品的二级结构符合被子植物一环(主环)四臂(螺旋区)的特征,其中臂 III 最长,臂 IV 变异最大,其次是臂 I,臂 II 最保守,螺旋上又有大小和数量不等的茎环(见图 4)。紫苏子与其混伪品在环的大小和位置、旋臂的角度上均有较大区别,其中急性子、沙苑子、白芥子和油菜子在臂 I 和臂 IV 之间有一段富含嘌呤的单链结构。因此 ITS2 二级结构对紫苏子与其混伪品的物种鉴别具有一定的参考价值。

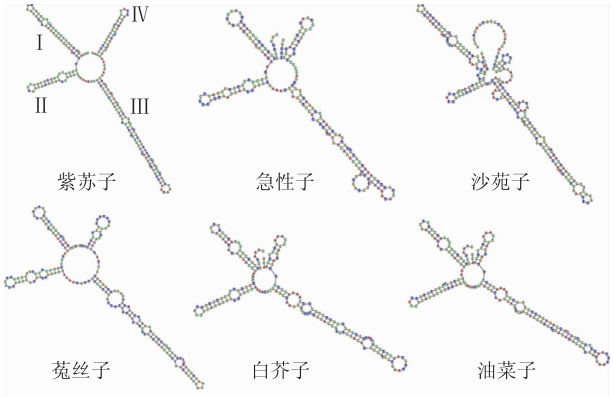


图 4　紫苏子与其混伪品的 ITS2 二级结构图

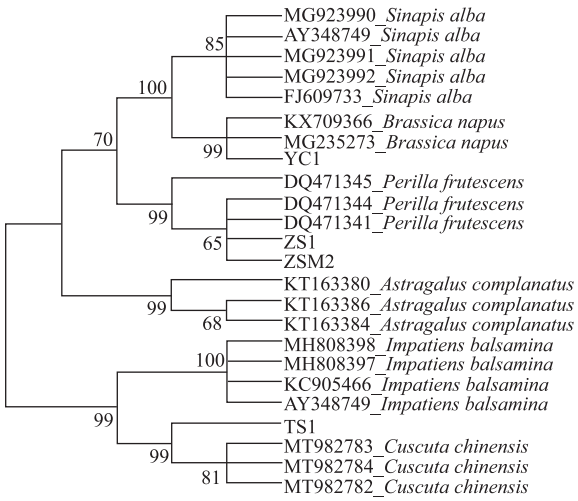
Fig. 4　Prediction diagram of ITS2 secondary structure of *Perillae fructus* and its adulterants

2.7　紫苏子与其混伪品的 NJ 树、PNJ 树分析

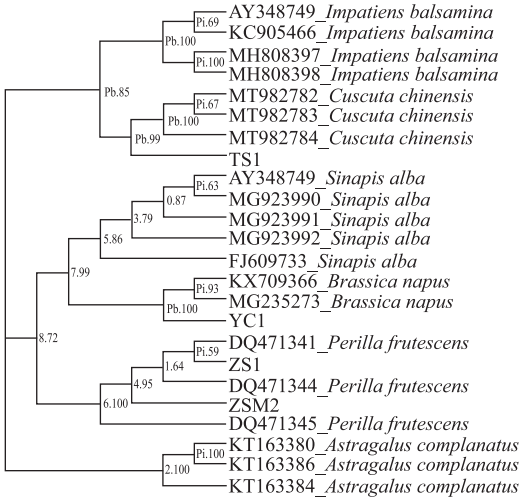
由紫苏子与其混伪品的 NJ 树中可见，紫苏子单独聚为一支，支持率高达 99%，表现出良好的单系性(见图 5)。常见混伪品沙苑子、白芥子、急性子、菟丝子和油菜子也分别聚为一支。ITS2 一级序列与二级结构联合矩阵构建 PNJ 树显示，各物种均能分支区分开与 NJ 树结果吻合，并且 PNJ 树结果比 NJ 树显示出更多的系统发育关系信息位点。

3　结　语

我国是紫苏的原产地，紫苏具有很高的食用价值和药用价值，是药食同源的代表植物。紫苏作为食材是美味的天然调味品，早在两汉时期，已有将



(a) NJ树



(b) PNJ树

图 5　紫苏子与其混伪品的 NJ 树和 PNJ 树

Fig. 5　NJ tree and PNJ tree of *Perillae fructus* and its adulterants

活鲤鱼切成生鱼片搭配紫苏食用，既可去腥又可保持鱼肉的鲜美。并且紫苏在我国用药历史悠久，紫苏叶、紫苏梗和紫苏子被收录为 3 种不同药材，分别具有治疗风寒感冒、调节肠胃、促进气血循环、减轻疼痛、解咳嗽和气喘、缓解便秘的作用。另外，诗经中“荏染柔木，君子树之”，已经用紫苏指代人们美好的情感，后更用“荏苒冬春谢，寒暑忽流易”，将紫苏与流逝的时光联系起来。可见，对中国人来说，紫苏不仅是一种食物、一种药材，更是一种中国文化精神象征。

紫苏属下变种多，且变种易受到环境因素的影响而改变，品种的鉴定依赖于具备植物学和生药学等专业知识且经验丰富的学者。近年来，我国紫苏市场销势活跃，产销两旺，批量成交增加，出口订单上升。而前几年我国紫苏产量少，市场供应缺口逐年加大，短期难以缓解，紫苏的紧缺已使价格大幅上涨，导致市面上出现紫苏子与其混伪品、紫苏与其变种存在不合理的销售问题。

作者采用 ITS2 序列以及二级结构分别对紫苏与其变种、紫苏子与其混伪品进行鉴别，结果显示，仅仅依靠 ITS2 序列不能将紫苏与白苏两个种区分开，但二者的 ITS2 二级结构存在内环数量的差异；紫苏、白苏分别与其他变种均可有效区分，符合种间最小遗传距离大于种内最大遗传距离。在 ITS 序列、K2P 遗传距离、ITS2 二级结构、基于序列的 NJ 树和基于一级结构和二级结构联合矩阵的 PNJ 树

均显示紫苏子与其混伪品可以明显区分。因此，建议 ITS2 可以作为紫苏子与其混伪品的 DNA 条形码，而对紫苏与白苏的鉴别或建议合并的假设还有待进一步研究。

参考文献：

[1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志：第 66 卷[M]. 北京：科学出版社，1977.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：338-339.
[3] 韩碧群，彭勇. “紫苏”和“白苏”的本草学研究[J]. 中药材，2012，35(5)：818-821.
[4] 李英霞，彭广芳. 紫苏子的本草考证[J]. 中医药研究，1996(3)：60-61.
[5] 欧辉鸿，李斯璐，陈奇聪，等. 紫苏子及其混伪品的 DNA 条形码(ITS2)鉴定[J]. 时珍国医国药，2016，27(12)：2934-2936.
[6] 顾晓华. 苏子及其伪品的比较鉴别[J]. 时珍国医国药，2007，18(1)：165.
[7] CHEN S，YAO H，HAN J，et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. **PLoS One**，2010，5：1-7.
[8] 郑梦迪，孙咪咪，贺紫涵，等. 基于 ITS2 序列及二级结构对易混淆药材牛尾独活、当归、独活和羌活的鉴别研究[J]. 药学学报，2021，56(8)：2289-2294.
[9] 郑梦迪，刘静，张寒，等. 基于 psbA-trnH 分子标记的鼠曲草属植物鉴定[J]. 时珍国医国药，2020，31(6)：1383-1386.
[10] 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伪品的鉴别研究[J]. 药学学报，2020，55(3)：522-529.
[11] 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.
[12] ELGAVISH T，CANNONE J J，LEE J C，et al. A：A and A：G base-pairs at the ends of 16S and 23S rRNA helices[J]. **Journal of Molecular Biology**，2001，310：735-753.
[13] LEONTIS N B，WESTHOF E. Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs[J]. **RNA**，2001，7：499-512.
[14] MULLER T，PHILIPPI N，DANDEKAR T，et al. Distinguishing species[J]. **RNA**，2007，13：1469-1472.
[15] MAI J C，COLEMAN A W. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants[J]. **Journal of Molecular Evolution**，1997，44：258-271.
[16] 夏至，李贺敏，张红瑞，等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究[J]. 中草药，2013，44(8)：1027-1032.
[17] CHOU S J，YEN J H，FANG C L，et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers[J]. **Planta Medica**，2007，73：1421-1426
[18] KELLER A，SCHLEICHER T，SCHULTZ J，et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. **Gene**，2009，430：50-57.
[19] SEIBEL P N，MÜLLER T，DANDEKAR T，et al. 4Sale：a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing[J]. **BMC Bioinformatics**，2006，7：498.
[20] WOLF M，RUDERISCH B，DANDEKAR T，et al. ProfdistS：(profile-)distance based phylogeny on sequence-structure alignments[J]. **BMC Bioinformatics**，2008，24：2401-2402.