

## 不同产地何首乌叶绿体 *psbA-trnH* 基因序列分析

张宏意<sup>1</sup>, 袁林林<sup>1</sup>, 饶秋红<sup>1</sup>, 李威<sup>2</sup>, 严寒静<sup>1\*</sup>

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 采用叶绿体基因 *psbA-trnH* 间隔区序列探讨不同产地何首乌的分子鉴定方法。方法 分别提取 7 省区 15 个居群 116 份何首乌样品的总 DNA, 经 PCR 扩增 *psbA-trnH* 间隔区序列, 纯化后测序, 采用 MEGA 6.06 软件对序列进行分析。结果 何首乌各居群间的遗传距离为 0.001~0.187, 最大似然法系统树中何首乌 15 个居群样品聚为 2 支。结论 何首乌的遗传变异较显著, *psbA-trnH* 序列可作为道地种源德庆种源与其他种源分子鉴定的依据。

**关键词:** 何首乌; *psbA-trnH* 基因; 最大似然法系统树

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)05-1146-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.024

## Sequence analysis of *psbA-trnH* gene in chloroplast of *Polygonum multiflorum* from different producing areas

ZHANG Hong-yi<sup>1</sup>, YUAN Lin-lin<sup>1</sup>, RAO Qiu-hong<sup>1</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, YAN Han-jing<sup>1</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** The molecular identification method of *Polygonum multiflorum* from different producing areas was explored by using the sequencing of intergenic region of chloroplast genes *psbA-trnH*. **Methods** A total of 116 samples of *P. multiflorum* were collected from 15 populations in seven provinces and autonomous regions. The total DNA was extracted and the sequences of *psbA-trnH* were amplified by PCR. The purified PCR products were sequenced and analyzed by MEGA 6.06 software. **Results** The genetic distances among the populations of *P. multiflorum* are 0.001—0.187. In the maximum likelihood phylogenetic tree, 15 populations of *P. multiflorum* were clustered into two branches. **Conclusion** The genetic variation of *P. multiflorum* is significant and the *psbA-trnH* sequences of *P. multiflorum* can be used as germplasm source for molecular identification between Deqing regarded as geo-authentic habitat and other producing areas.

**Key words:** *Polygonum multiflorum* Thunb.; *psbA-trnH* gene; maximum likelihood phylogenetic tree

何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 为蓼科多年生草本植物, 以干燥块根入药, 为大宗常用中药<sup>[1]</sup>。现代药理研究证实, 何首乌具有增强免疫功能<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、延缓大脑衰老<sup>[4]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[5]</sup>、改善记忆力<sup>[6]</sup>、调血脂<sup>[7]</sup>、防辐射<sup>[8-9]</sup>等作用。何首乌生长范围广, 主要分布在广西、广东、贵州、四川、湖北、江苏、河南等省区, 此外, 云、陕、陇、湘、赣、浙、闽等地也有分布<sup>[10-11]</sup>。其中广东省德庆县数百年来一直为何首乌的道地产区。近年来,

由于种植何首乌经济效益不高, 德庆产区的何首乌种植面积大量萎缩, 而附近的一些县市如广东高州、高要等县市, 反而纷纷引种, 大量种植何首乌。

*psbA-trnH* 基因间隔区位于编码光合系统 II 反应中心 D1 蛋白的 *psbA* 基因和编码 tRNA 组氨酸的 *trnH* 基因之间, 被认为是叶绿体基因组中进化速率最快的基因间隔区之一<sup>[12]</sup>。目前, 已将 *psbA-trnH* 序列分析用于百合属 *Lilium* L.<sup>[13]</sup>、石斛属 *Dendrobium* Sw.<sup>[14]</sup>、明党参属 *Changium* Wolff<sup>[15]</sup>、

收稿日期: 2017-08-09

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20163010, 20182076); 大学生创新创业训练计划项目 (201710573016); 广东省科技厅项目 (2017A020213023)

作者简介: 张宏意 (1977—), 女, 博士, 讲师, 主要从事植物种质资源研究。E-mail: drizzlezhy@163.com

\*通信作者 严寒静 (1972—), 女, 博士, 教授, 从事中药资源和药用植物质量标准方面的教学与研究。

Tel: (020)39352327 E-mail: yanhanjing1211@163.com

薯蓣属 *Dioscorea* L. [16] 多样性研究或者是对一些常用药材和混淆品的研究中[17-18]。王娟等[19]发现 psbA-trnH 序列在广西莪术中的物种水平鉴定成功率达到 100%，并且种间、内变异存在也较明显。

本实验拟通过对 7 省区 15 个居群的野生何首乌 116 个单株的 psbA-trnH 序列进行分析，以期对不同种质和不同产区的何首乌进行鉴定和区分，为建立何首乌产区鉴别和种质资源基因库提供分子指标，为何首乌的种质资源研究提供基础。

### 1 材料

所有材料均采自原产地，经广东药科大学中药资源系严寒静教授鉴定为何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb.，加入干燥剂，-20 °C 保存在广东药科大学中药资源系实验室。116 份何首乌样品的来源见表 1。实验用 10×PCR Buffer（含 Mg<sup>2+</sup>）、Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司，引物 psbA-trnH 由华大基因有限公司合成。

表 1 何首乌样品的来源

Table 1 Source of samples of *P. multiflorum*

居群编号	采集地	样品编号	经度(E)	纬度(N)
1	广东德庆高良镇	1~13	111°55'31"	23°18'43"
2	广东高要禄步镇	14~20	112°14'46"	23°11'59"
3	广东高州石鼓镇	21~33	110°44'02"	21°50'45"
4	广东新兴天堂镇	34~43	111°59'48"	22°31'25"
5	浙江杭州西湖区	44~50	120°05'51"	30°14'33"
6	河南南阳淮源镇	51~58	113°23'35"	32°23'55"
7	贵州凯里鸭塘镇	59~63	107°57'53"	26°33'38"
8	贵州雷山西江镇	64~67	108°12'19"	26°22'28"
9	安徽六安太阳乡	68~76	116°09'47"	31°07'40"
10	江苏南京玄武区	77~78	118°49'40"	32°03'22"
11	广西南宁江南区	79~84	108°12'27"	22°49'54"
12	广西田林八桂乡	85~90	106°10'48"	24°15'24"
13	浙江天台山河乡	91~100	120°59'21"	29°07'22"
14	浙江舟山普陀区	101~111	122°16'30"	30°01'03"
15	贵州赤水旺隆镇	112~116	105°55'36"	28°32'28"

### 2 方法

#### 2.1 基因组总 DNA 的提取

取干燥叶片约 1 g，低温研磨 5 min，使用植物基因组 DNA 提取试剂盒（北京百泰克公司）提取总 DNA。

#### 2.2 PCR 体系的建立

2.0 μL 模板 DNA，2 μmol/L 引物 F 0.25 μL，2

μmol/L 引物 R 0.25 μL，Taq 0.125 μL，10×PCR Buffer 2.5 μL，2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μL，ddH<sub>2</sub>O 加至 25 μL。引物序列为 psbA：5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'；trnH：5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'。

#### 2.3 PCR 反应程序

94 °C 预变性 4 min，94 °C 变性 30 s，52 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共循环 34 次，72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。采用琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 2.4 DNA 测序

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测，根据大小确定为目的带、无杂带干扰且产物的浓度达到测序要求后，由华大基因技术有限公司测序，测序引物同 PCR 引物。

#### 2.5 DNA 片段序列比对与拼接

测序结果先用 Chromas 2 软件打开测序彩图，要求测序图峰形整齐，峰间达到基线分离，无干扰和重叠峰。

#### 2.6 序列分析

获得的测序峰图采用 CodonCode Aligner V3.7.1 (CodonCode., 美国) 校对拼接，去除引物区及低质量区。通过与 Genbank 序列进行 Blastn 比对，通过参考序列进行注释，获得 psbA-trnH 序列。用 Mega 6.06 软件进行序列比对，基于 Kimura-2-parameter (K2P) 模型计算遗传距离，并用最大似然法 (ML) 法构建系统聚类树，利用 bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。

### 3 结果与分析

#### 3.1 何首乌居群 psbA-trnH 序列扩增结果分析

供试的 116 个何首乌 psbA-trnH 序列的长度范围为 375~433 bp，排序后两端切平获得的序列长度为 377 bp；当空缺 (gap) 始终作缺失处理，保守位点有 229 bp，占序列总长度的 62.74%，变异位点有 136 bp，占序列总长度的 37.26%，变异类型主要为碱基缺失和替换。简约信息位点有 107 bp，占序列总长度的 29.32%。其中来自江苏南京和安徽六安的居群都缺失了一段 47 bp 的序列，长度为 375 bp；序列最长的为来自浙江天台的居群，长度为 433 bp，比其他样品多了一段 11 bp 的序列。

#### 3.2 何首乌居群聚类分析

采用 MEGA6.06 软件中的 K2p 模型计算何首乌不同居群间 psbA-trnH 序列的遗传距离并构建序列距离矩阵，结果见表 2。何首乌各居群间的遗传距

表 2 15 个何首乌居群遗传距离

Table 2 Genetic distances among 15 populations of *P. multiflorum*

居群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	0.005													
3	0.005	0.001												
4	0.005	0.002	0.002											
5	0.171	0.174	0.175	0.172										
6	0.089	0.091	0.091	0.089	0.141									
7	0.044	0.043	0.043	0.042	0.146	0.088								
8	0.025	0.022	0.022	0.022	0.165	0.088	0.023							
9	0.032	0.033	0.033	0.031	0.163	0.076	0.041	0.028						
10	0.094	0.096	0.096	0.093	0.140	0.092	0.092	0.090	0.071					
11	0.025	0.021	0.021	0.021	0.167	0.090	0.023	0.003	0.030	0.092				
12	0.025	0.021	0.021	0.023	0.168	0.090	0.024	0.003	0.031	0.093	0.001			
13	0.085	0.088	0.088	0.086	0.101	0.090	0.076	0.080	0.074	0.090	0.081	0.082		
14	0.150	0.153	0.153	0.150	0.068	0.129	0.130	0.144	0.141	0.134	0.146	0.147	0.094	
15	0.044	0.041	0.041	0.042	0.187	0.107	0.044	0.024	0.050	0.112	0.023	0.023	0.103	0.166

离为 0.001~0.187；其中浙江杭州居群与贵州赤水居群间的遗传距离为最大，为 0.187，杭州居群与广东省的 4 个居群的遗传距离在 0.171~0.175，也较大。广东省的 4 个居群由于为栽培居群，遗传距离非常小，在 0.001~0.005，另外广西的 2 个居群遗传距离也非常小，只有 0.001。

采用最大似然法 (ML) 对何首乌 15 个居群进行聚类分析并构建遗传关系树，结果见图 1。由图 1 可看出，15 个何首乌居群的 116 个单株可聚成 2 支。浙江舟山和杭州的 2 个居群、浙江天台居群的 5 个样品和河南南阳居群的 4 个样品聚为一支；剩

下的其他居群和样品聚为另外一支。广东的 4 个居群除了德庆的 3 个样品外，其他都先聚在一起。在该分支中，广西南宁和田林的居群、贵州凯里、雷山、赤水等居群的大部分样品以及广东德庆的 3 个样品再聚为一个分支；最后与浙江天台的部分样品、安徽六安、江苏南京以及河南南阳的部分样品聚在一起。

#### 4 讨论

在 116 个样品中，其中江苏、安徽和河南的 3 个居群具有 47 个相同片段的碱基缺失。浙江天台的居群则有一段 11 个 bp 的插入片段。另外何首乌

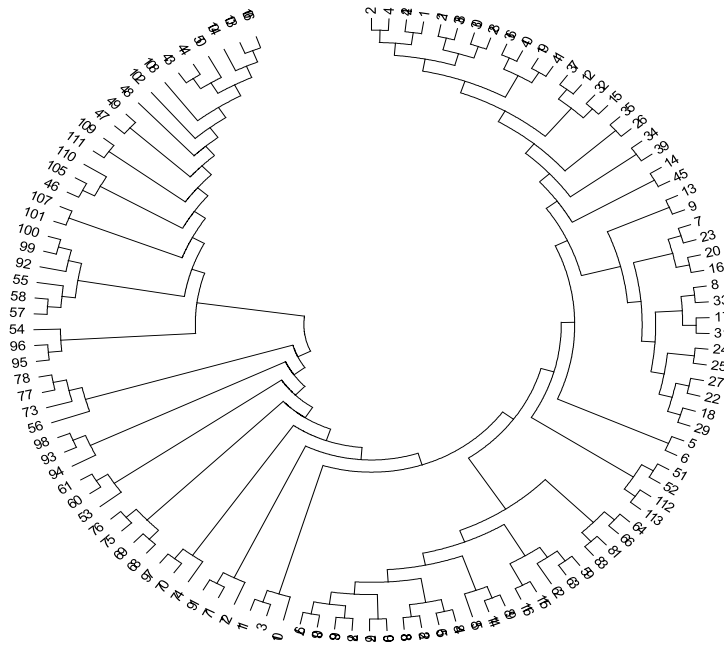


图 1 基于 psbA-trnH 序列分析的何首乌 15 个居群的最大似然法系统树

Fig. 1 Maximum likelihood phylogenetic tree of 15 populations of *P. multiflorum* based on psbA-trnH sequence analysis

的序列分析结果发现, 简约信息位点有 107 bp, 占序列总长度的 29.32%。这些结果表明何首乌的遗传变异较大, 其原因可能与其分布较广, 植物形态为藤状草本等有关。

psbA-trnH 序列聚类的结果基本与样品产地的分布相一致。广东的 4 个居群均为栽培居群, 聚类结果表明广东德庆的大部分样品, 高州、高要和新兴的样品彼此聚类, 表明这几个产地的何首乌种源来源单一, 可能都引种于广东德庆。广东德庆有 3 个样品没有与广东的居群聚为一支, 而是与广西贵州的居群聚在一起; 这个结果可能与这几年广东德庆的从广西或贵州引种有一定关系。由于道地产区广东德庆的何首乌块根产量较低, 经济效益不高。当地农民从广西等地引种了表型为大叶的何首乌, 分子聚类结果揭示了其原产地。广东省 4 个居群的遗传距离都非常小, 除了广东德庆的居群与其他 3 个居群遗传距离为 0.005, 其他 3 个居群之间只有 0.001~0.002。这个结果可能与栽培种源的广东何首乌采用扦插的繁殖方式有关。

浙江杭州和舟山 2 个居群、浙江天台、河南南阳的部分样品独立为一支。浙江杭州的居群分布于西湖区西湖景区周边, 由于城市化的进程, 杭州居群处于一个孤立的小生境, 缺少与何首乌其他种群的交流。舟山种群情况类似, 由于该居群孤立于海岛上, 更缺少与大陆其他何首乌种群的基因交流, 这 2 个居群可能遗传背景相似, 因此聚在一起。而浙江天台、河南南阳的样品其中一部分和浙江杭州和舟山的居群聚为一支, 另外部分与安徽六安、江苏南京的样品聚为一个分支; 这个分支最终与广西、贵州、广东等地的居群聚为一支, 该聚类结果是否与何首乌的扩散路径相关, 有待更多的材料验证。

总的来说, psbA-trnH 序列分析结果表明我国何首乌遗传变异较大。序列聚类结果基本与样品产地的分布相一致。广东几个产区的何首乌栽培种源来源单一。psbA-trnH 序列可以对不同产地的何首乌进行分子鉴定。

#### 参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
 [2] 葛朝亮, 刘颖. 何首乌多糖对免疫功能低下小鼠的免疫保护作用 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(24): 2040-2042.  
 [3] Yu J, Xie J, Mao X J, et al. Comparison of laxative and antioxidant activities of raw, processed and fermented *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(1): 63-67.

[4] 刘一流, 李续娥. 何首乌蛋白质和葱醌苷对半乳糖衰老小鼠学习记忆及代谢产物的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 160-163.  
 [5] 方微, 张慧信, 王绿娅, 等. 何首乌总苷抗氧化与实验性小鼠主动脉粥样硬化病变的形成 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1320-1323.  
 [6] 楚晋, 叶翠飞, 李林, 等. 二苯乙烯苷对 D-半乳糖致脑老化小鼠学习记忆及神经营养因子的影响 [J]. 中国药房, 2005, 16(1): 13-16.  
 [7] Yang P Y, Almofti M R, Lu L, et al. Reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and decrease of expressions of intracellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor in foam cells by a water-soluble fraction of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 99(3): 294-300.  
 [8] Chen Y, Wang M, Rosen R T, et al. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(6): 2226-2228.  
 [9] Ryu G, Ju J H, Park Y J, et al. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from *Polygonum multiflorum* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2002, 25(5): 636-639.  
 [10] 肖培根. 中药植物原色图谱 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.  
 [11] 孔令武, 孙海峰. 现代实用中药栽培养殖技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.  
 [12] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene 1 complements the noncoding trnH-psbA spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e508.  
 [13] 崔金腾, 杨雪珍, 张克中, 等. 基于 trnH-psbA 条形码技术的百合 (*Lilium*) 系统关系分析 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(9): 2029-2037.  
 [14] 邵世光, 韩丽, 马艳红, 等. 枫斗类石斛 cpDNA psbA-trnH 的序列分析与鉴别 [J]. 药学学报, 2009, 44(10): 1173-1178.  
 [15] 宋春风, 吴宝成, 周伟, 等. 基于 psbA-trnH 序列变异分析川明参属亲缘关系及分类地位 [J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(2): 19-26.  
 [16] 张佳佳, 霍秀文, 王志敏, 等. 薯蓣属 28 种山药 psbA-trnH 序列系统学分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(6): 2412-2419.  
 [17] 杨培, 周红, 马双姣, 等. 叶绿体 psbA-trnH 序列鉴定药食同源肉桂类药材 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 1496-1499.  
 [18] 林爽, 吴海燕, 张宏意, 等. 不同地理居群破布叶的 psbA-trnH 和 ITS2 序列及其聚类分析 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1403-1408.  
 [19] 王娟, 侯艳芳, 白淮. 广西莪术 DNA 条形码通用序列的筛选 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 100-103.