

云南草果种质资源 DNA 条形码序列分析

胡一凡¹, 张雪梅¹, 石乃星¹, 杨志清^{1,2,3,4*}

1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201
2. 云南农业大学 云南省药用植物生物学重点实验室, 云南 昆明 650201
3. 云南农业大学 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650201
4. 云南省芳香生物工程技术有限公司, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 筛选与评价适用于云南草果居群的 DNA 条形码。方法 以云南省草果种质资源为样本对 ITS、psbA-trnH、matK、rbcL 和 ycf1 5 条 DNA 条形码常用序列进行筛选与评价, 并对草果居群进行扩增, 测序, 测序序列用 Genestar 进行拼接, 然后用 Mega 进行数据处理, 并对草果多样性及其鉴定进行分析。结果 引物 ITS5 和 ITS4 对草果的扩增片段长度大约为 520 bp; rbcLa-F 和 rbcLa-R 对草果的扩增片段长度大约为 498 bp; 引物 ycf1-bF 和 ycf1-bR 对草果的扩增片段长度大约为 800 bp; 引物 psbA-trnH-1F 和 psbA-trnH-1R 对草果的扩增片段长度大约为 400 bp; 引物 matK-2F 和 matK-2R 对草果的扩增片段长度大约为 470 bp。扩增及测序的成功率均较高, 结果大多可用。通过对草果 ITS、psbA-trnH、matK 和 ycf1 序列的扩增结果进行分析, 草果与其他豆蔻属植物都可以被清晰地区分开; ITS 序列所有样本分为 MG5 白花草果居群和其他居群; psbA-trnH 序列所有样本分为 MG5 白花草果居群, MG6 黄花草果居群和其他居群; matK 序列所有样本分为 MG6 黄花草果居群和其他居群, MG5 白花草果样本扩增失败; ycf1 序列所有样本分为 MG6 黄花草果居群和其他居群, MG5 白花草果居群与其他 22 个草果居群聚为一支; rbcL 序列对所有样本的扩增均一致。结论 ITS、matK、psbA-trnH 及 ycf1 序列均能将草果与其他同属植物进行准确区分; MG6 的 matK、psbA-trnH 及 ycf1 序列发现了序列位点的变异, 为草果品种的选育做出贡献。ITS 和 psbA-trnH 序列可将黄花和白花草果序列区分开; 草果白花黄花所有样本 rbcL 序列无任何变异, 且用 rbcL 序列无法鉴别草果与其他同属植物, 可将其舍去。

关键词: 草果; 遗传多样性; 亲缘关系; DNA 条形码; ITS 序列; psbA-trnH 序列; matK 序列; ycf1 序列

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24-6091-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.025

DNA barcoding sequence analysis of *Amomum tsao-ko* germplasm resources in Yunnan Province

HU Yi-fan¹, ZHANG Xue-mei¹, SHI Nai-xing¹, YANG Zhi-qing^{1,2,3,4}

1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China
2. Yunnan Key Laboratory of Medicinal Plant Biology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China
3. National & Local Joint Engineering Research Center on Germplasm Innovation & Utilization of Chinese Medicinal Materials in Southwestern China, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China
4. Yunnan Research Center for Aromatic Biology Engineering Technology, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To screen and evaluate DNA barcoding of *Amomum tsao-ko* populations in Yunnan. **Methods** ITS, psbA-trnH, matK, rbcL, and ycf1 sequences were screened and evaluated using *A. tsao-ko* as samples. The samples of *A. tsao-ko* population were amplified and sequenced. The sequences were spliced with Genestar, and then processed with Mega for data processing. And *A. tsao-ko* diversity and identification were analyzed and discussed. **Results** The length of the amplified fragments of primers ITS5 and ITS4 was approximately 520 bp; The length of the amplified fragments of the primers rbcLa-F and rbcLa-R was approximately 498 bp; The length of the amplified fragments of the primers ycf1-bF and ycf1-bR was approximately 800 bp; The length of the amplified fragments of the primers psbA-trnH-1F and psbA-trnH-1R was approximately 400 bp; The length of the amplified fragments of

收稿日期: 2019-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目: 草果居群的分子鉴定及种质资源评价 (81560615); 云南省社会发展科技计划项目: 云南草果种植加工关键技术研究与示范 (2011CG015); 云南省科技计划项目: 云南省芳香生物工程技术有限公司建设 (2018DH010)

作者简介: 胡一凡 (1994—), 女, 河北承德人, 博士研究生, 研究方向为药用植物资源分子鉴定。Tel: 13187708818 E-mail: huyisarah@163.com

*通信作者 杨志清, 硕士生导师, 教授, 主要从事药用植物栽培与资源评价研究。E-mail: yzq1468@126.com

the primers matK-2F and matK-2R was approximately 470 bp. The success rate of amplification and sequencing was high, and most of the results were available. By analyzing the amplification results of ITS, psbA-trnH, matK and ycf1 sequences of *A. tsao-ko*, *A. tsao-ko* and other *Amomum* genus plants can be clearly distinguished; All samples of the ITS sequence were divided into MG5 white flower *A. tsao-ko* population and other populations; All samples of the psbA-trnH sequence were divided into MG5 white flower *A. tsao-ko* population, MG6 yellow flower *A. tsao-ko* population and other populations; All samples of the matK sequence were divided into MG6 *A. tsao-ko* population and other populations. The MG5 white flower *A. tsao-ko* sample failed to be amplified; All samples of the ycf1 sequence were divided into the MG6 yellow flower *A. tsao-ko* population and other populations, and the MG5 white flower *A. tsao-ko* population was clustered with the other 22 *A. tsao-ko* populations; The amplification of rbcL sequence was consistent for all samples.

Conclusion The ITS, matK, psbA-trnH and ycf1 sequences can accurately distinguish *A. tsao-ko* from other plants of *Amomum* genus; The sequence site variations were found in matK, psbA-trnH and ycf1 sequences of MG6. This research has contributed to the selection and breeding of *A. tsao-ko* varieties. ITS and psbA-trnH sequences can distinguish yellow flower and white flower of *A. tsao-ko*; There is no variation in the rbcL sequence of all samples of white and yellow flowers of *A. tsao-ko*, and *Amomum tsao-ko* and other plants of *Amomum* genus cannot be identified with the rbcL sequence, which can be discarded.

Key words: *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire; genetic diversity; genetic relationship; DNA barcoding; ITS sequence; psbA-trnH sequence; matK sequence; ycf1 sequence

草果 *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemarie 为药食两用的中药材大宗品种之一, 是姜科 Zingiberaceae 豆蔻属 *Amomum* L. 草果亚属 subgen. *Lobulatae* 多年生常绿丛生草本植物^[1]。因草果全株皆有辛香气味, 可作为调味香料, 亦可作为药用^[2]。作为食用, 因其特殊的风味, 草果成为烹饪佐料的上品, 广泛用作食品加工的调味香料。作为中药, 草果具有燥湿温中、除痰截疟等功效, 用于寒湿内阻、脘腹胀痛、痞满呕吐、疟疾寒热等病症^[2]。主要分布于我国云南省东南部和广西壮族自治区的西部, 以及越南、老挝北部的部分地区^[3-5]。其经济价值高、用途广、需求量大, 在国内外市场上供不应求, 因此市场前景极为看好^[6]。

植物的遗传和变异是生物进化和品种选育的基础和保障, 遗传多样性的研究对于培育新品种具有重要意义。多年来草果优良品种缺乏、栽培技术的落后等致使草果生产中产量低、品质差, 对抗突发病虫害或恶劣环境的能力越来越差, 进行草果遗传多样性的研究对草果资源保护和优良品种选育具有理论和实践意义。而可遗传的变异是由 DNA 的改变引起的, 分子标记是 DNA 水平的研究, 不受环境影响, 不随生长发育而产生变化, 因此利用分子标记技术对作物遗传多样性进行研究, 才能更有针对性地从草果种质资源中选择适合的杂交亲本, 在后代中获得更优良的变异, 因而在杂种优势利用研究中培育出优良的品种, 所以亲本的遗传多样性就显得尤为重要, 选择遗传距离远的亲本进行组配, 便可以获得更大的杂种优势, 并能获得更完整的遗传信息, 为个体间和群体间的深入准确研究提供理论基础^[7-11]。

本研究利用 DNA 条形码分子标记技术, 探究各序列对草果种内及其与同属植物鉴定的可行性, 讨论方法对其的适用性, 并揭示草果种质资源的遗传多样性, 探索 24 个草果居群间以及各居群内的亲缘关系, 为云南草果资源的划分奠定基础, 为草果未来品种的选育提供原始材料, 为实现草果产业发展贡献力量。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2016—2017 年间在云南省澜沧、西畴、贡山、泸水、绿春、福贡、金平、马关、龙陵、腾冲 10 个县市, 每个县市的 2~3 个不同海拔地区的共 24 个居群 (每个居群 5~12 份样品, 共 214 份) 进行草果样本采集, 采集生长状况良好的较鲜嫩的 4~5 片草果叶片, 用写有编号的自封袋装好, 并放入变色硅胶进行密封快速干燥保存, 后带回试验室, 置于 4 °C 的冰箱中保存待用。信息见表 1。

1.2 GenBank 序列

在 NCBI 网站的 GenBank 数据库中, 下载姜科豆蔻属植物的 ITS、rbcL、Ycf1、psbA-trnH 和 matK 序列, ITS 序列 17 条, rbcL 序列 11 条, Ycf1 序列 2 条, psbA-trnH 序列 14 条, matK 序列 17 条, 共计 61 条。信息见表 2。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取与检测

本实验采用改良 CTAB 法提取叶片的基因组 DNA, 并用琼脂糖凝胶电泳进行检测其质量。

2.2 DNA 条形码 PCR 的扩增

用 5 对引物对 24 个草果居群 214 份草果样本

表 1 草果叶片采集信息

Table 1 leaf collection and utilization of *A. tsao-ko*

编号	样本名称	采集点	海拔/m	经度	纬度	样品数量
LC1	澜沧-1	澜沧南岭乡	2 267	99°55'56"E	22°50'26"N	11
MG4	马关-4	马关古林菁乡上村委会白木山村小组 (老基地)	1 247	103°58'26"E	22°51'44"N	10
MG3	马关-3	马关蔑厂乡蔑厂村委会小八寨村小组	1 542	103°59'41"E	22°52'14"N	10
JP2	金平-2	金平大寨乡	1 595	103°20'13"E	22°53'28"N	10
JP1	金平-1	金平大寨乡	1 742	103°20'8"E	22°53'49"N	10
MG1	马关-1	马关县仁和镇阿峨村委会新寨村小组新基地 (天然)	1 450	104°18'17"E	22°55'12"N	5
MG2	马关-2	马关县仁和镇阿峨村委会新寨村小组新基地 (移栽)	1 450	104°18'17"E	22°55'12"N	5
MG5	马关-5	马关县仁和镇阿峨村委会新寨村小组新基地 (天然白花)	1 450	104°18'17"E	22°55'12"N	5
MG6	马关-6	马关夹寒菁摩所村 (野生)	1 425	104°31'46"E	22°56'9"N	7
LC1	绿春-1	绿春大兴镇汾水岭	1 781	102°27'29"E	22°58'36"N	11
LC2	绿春-2	绿春戈奎乡 3 km	1 911	102°29'39"E	22°59'25"N	7
LC2	澜沧-2	澜沧富东乡	1 800	99°99'56"E	23°12'81"N	10
XC1	西畴-1	西畴柏林乡三板桥村委会瓦厂村小组	1 324	104°44'21"E	23°14'30"N	5
XC2	西畴-2	畴柏林乡三板桥村委会瓦厂村小组	1 313	104°43'23"E	23°15'39"N	5
LL2	龙陵-2	龙陵龙山董华村	1 968	98°35'56"E	24°34'40"N	8
LL1	龙陵-1	龙陵龙山镇云山社区	1 630	98°39'16"E	24°35'33"N	12
TC1	腾冲-1	腾冲候桥镇	2 012	98°7'24"E	25°22'24"N	10
LS1	泸水-1	怒江泸水鲁掌镇滴水河源头	2 049	98°44'36"E	25°54'47"N	10
LS2	泸水-2	怒江泸水鲁掌镇滴水河桥头	1 570	98°45'42"E	25°54'59"N	10
LS3	泸水-3	怒江泸水三河村	1 350	98°46'42"E	25°55'13"N	10
FG1	福贡-1	福贡石月亮乡资古朵村施哭洛底小组	1 358	99°8'19"E	27°10'5"N	11
FG2	福贡-2	福贡石月亮乡资古朵村达谷小组	1 838	99°8'21"E	27°10'6"N	11
GS1	贡山-1	贡山普拉底乡	1 528	98°44'9"E	27°37'20"N	10
GS2	贡山-2	贡山独龙江	1 469	98°16'12"E	27°40'44"N	10

表 2 豆蔻属植物基本信息及 NCBI 序列登录号

Table 2 Basic information and NCBI serial accessionnumber of *Amomum* genus

序号	中文名	拉丁名	亚属	ITS 序列	rbcL 序列	Ycfl 序列	psbA-trnH	matK 序列
1	草果	<i>A. tsaoko</i> Crevost et Lemarie	草果亚属	FJ972776	FJ972788	—	GQ118655	FJ972785
2	拟草果	<i>A. para-tsaoko</i> S. Q. Tong et Y. M. Xia	草果亚属	AY351997	—	—	—	—
3	野草果	<i>A. koenigii</i> J. F. Gmelin	草果亚属	AY351991	JF940838	—	JN043935	JF953188
4	海南假砂仁	<i>A. chinense</i> Chun	豆蔻亚属	KY438044	—	—	—	KY510019
5	海南砂仁	<i>A. longiligulare</i> T. L. Wu	草果亚属	KY438101	KM411364	—	GU180431	GQ404377
6	砂仁	<i>A. villosum</i> Lour	草果亚属	AF478724	KJ151868	—	GU180423	KJ151822
7	细砂仁	<i>A. microcarpum</i> C. F. Liang et D. Fang	草果亚属	KY438066	JF940850	—	JN043948	JF953203
8	爪哇白豆蔻	<i>A. compactum</i> Soland. ex Maton	草果亚属	FJ972782	FJ972793	MG000589	JN043924	JF953180
9	白豆蔻	<i>A. kravanh</i> Pierre ex Gagnep.	草果亚属	FJ972779	FJ972790	MF991963	GQ118657	FJ972783
10	波翅豆蔻	<i>A. odontocarpum</i> D. Fang	豆蔻亚属	KY438099	—	—	—	—
11	长柄豆蔻	<i>A. longipetiolatum</i> Merr	草果亚属	AF478722	JF940841	—	JN043938	JF953194
12	银叶砂仁	<i>A. sericeum</i> Roxb	豆蔻亚属	AY352005	—	—	JN043972	JF953225
13	九翅豆蔻	<i>A. maximum</i> Roxb	豆蔻亚属	AY351995	JF940845	—	JN043940	JF953196
14	三叶豆蔻	<i>A. austrosinense</i> D. Fang	—	AY351985	—	—	—	AY352015
15	腐花豆蔻	<i>A. putrescens</i> D. Fang	草果亚属	AY352002	—	—	—	AY352032
16	香豆蔻	<i>A. subulatum</i> Roxb	豆蔻亚属	KY438086	—	—	KC598057	KJ872351
17	长果砂仁	<i>A. dealbatum</i> Roxb	豆蔻亚属	KX065427	KX758490	—	JN043929	KX088490
18	疣果砂仁	<i>A. muricarpum</i> Elm	豆蔻亚属	—	JF940854	—	JN043951	JF953205
19	红花砂仁	<i>A. mscarlatinum</i> H. T. Tsai et P. S. Chen	—	—	—	—	JN043970	JF953223

进行扩增，分别为 ITS 序列的上游引物 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和下游引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); psbA-trnH 序列的上游引物 2F (5'-GTT-ATGCATGAACGTAATGCTC-3') 和下游引物 2R (5'-CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC-3'); matK 序列的上游引物 1F (5'-CTTTTTTAGAGGATAA-TCTGTTGCATTTAAATT-3') 和下游引物 1R (5'-AT-ATACTTCATTCGATACAAACTCTGTTTTTTTG-3'); rbcL 序列的上游引物 rbcLa-F (5'-ATGTCACCA-CAAACAGAGACTAAAGC-3') 和下游引物 rbcLa-R (5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'); ycf1 序列的上游引物 ycf1-bF (5'-TCTCGACG-AAAATCAGATTGTTGTGAA-3') 和下游引物 ycf1-bR (5'-ATACATGTCAAAGTGATGGAAA-3')^[10-21]。PCR 扩增体系为 20 μL [2×Taq PCR StartMix 10 μL, 正、反引物 (10 μmol/μL) 各 1 μL, DNA 模板 (50 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 7 μL]。扩增程序为 94 °C 预变性 2 min, 以 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。

2.3 PCR 扩增产物检测与测序

扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用凝胶成像仪采集图片并观察。将电泳条带单一、清晰、明亮的 PCR 扩增产物送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

2.4 序列的处理与分析

测序序列用 Genestar 中的 seqMan 进行拼接; 拼接后的序列用 Mega 中的 Clustalw 进行相似性比对, 并进行剪切校正, 除去序列两端质量差的碱基, 计算相似性系数, 用邻接法构建进化树, 采用 bootstrap method 重复 1 000 次测试系统进化树。

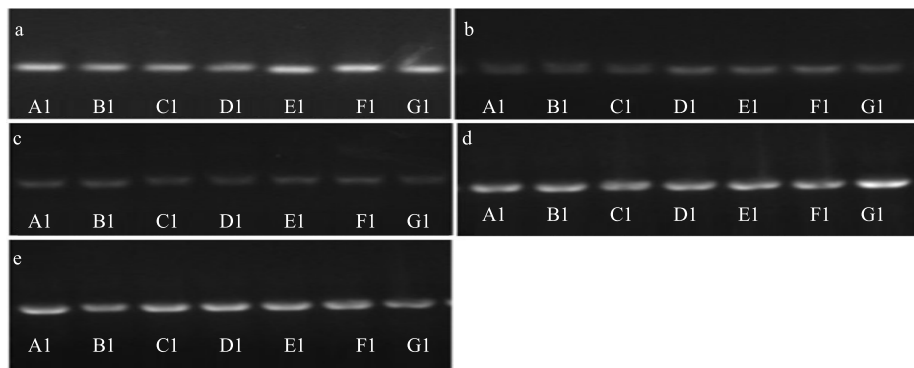
3 结果与分析

3.1 草果 PCR 扩增

利用 5 对引物对 214 份草果样本进行 PCR 扩增, 并采用凝胶电泳对序列进行检验。结果表明, 5 对引物的均能够成功扩增出目标条带, 条带扩增效果良好, 条带清晰, 无拖尾; 草果 ITS5 和 ITS4 的扩增片段长度大约为 520 bp; 引物 rbcLa-F 和 rbcLa-R 的扩增片段长度大约为 498 bp; 引物 ycf1-bF 和 ycf1-bR 的扩增片段长度大约为 800 bp; psbA-trnH-1F 和 psbA-trnH-1R 的扩增片段长度大约为 400 bp; matK-2F 和 matK-2R 的扩增片段长度大约为 470 bp。结果见图 1。扩增及测序的成功率均较高, 结果大多可用。

3.2 草果 ITS 序列的鉴定

对草果样本 ITS 序列进行分析, 可知所有样本间的变异较小; 马关-5 居群 (MG5) 内的 ITS 序列无变异, 其他 23 个居群间及居群内均无变异; MG5 与其他 23 个居群间存在一定变异。建立 K2P 模型,



A1-LC-1 B1-XC-1 C1-GS-1 D1-LS-1 E1-LCH-1 F1-FG-1 G1-JP-1 a-引物 ITS5 和 ITS4 的部分扩增产物 b-引物 psbA-trnH-1F 和 psbA-trnH-1R 的部分扩增产物 c-引物 rbcLa-F 和 rbcLa-R 的部分扩增产物 d-引物 ycf1-bF 和 ycf1-bR 的部分扩增产物 e-引物 matK-2F 和 matK-2R 的部分扩增产物

A1-LC-1 B1-XC-1 C1-GS-1 D1-LS-1 E1-LCH-1 F1-FG-1 G1-JP-1 a-partial amplified product of primers ITS5 and ITS4 b-partial amplified products of primers psbA-trnH-1F and psbA-trnH-1R c-partial amplified products of primers rbcLa-F and rbcLa-R d-partial amplified products of primers ycf1-bF and ycf1-bR e-partial amplified products of primers matK-2F and matK-2R

图 1 部分扩增产物的琼脂糖凝胶检测电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of partial amplified products

对遗传距离进行分析, MG5 与其他 23 个居群的 K2P 遗传距离为 0.0117。

如图 2 所示, 将包括 MG5 与其他 23 个居群在内的豆蔻属 17 种植物的 ITS 序列用邻接法计算出的系统发育树, 大致可以分为 3 个部分。第 1 部分是长柄豆蔻、九翅豆蔻、三叶豆蔻、腐花豆蔻、香豆蔻、银叶砂仁、长果砂仁; 第 2 部分是草果和拟草果; 第 3 部分是野草果、海南假砂仁、海南砂仁、砂仁、细砂仁、白豆蔻、爪哇白豆蔻、波翅豆蔻。

第 1 部分中, 除银叶砂仁和长果砂仁其他都为豆蔻亚属, 而其中银叶砂仁与其他植物的遗传距离较近, 而长果砂仁与其他植物的遗传距离最远。而野草果并没有被划分到仅有草果和拟草果的第 2 部分, 而是被划分到第 3 部分, 与海南假砂仁的遗传距离最近。第 3 部分中共有 8 种植物, 其中白豆蔻、爪哇白豆蔻和波翅豆蔻的遗传距离最近。显而易见的是, 草果与其他豆蔻属植物都可以被清晰地区分开。

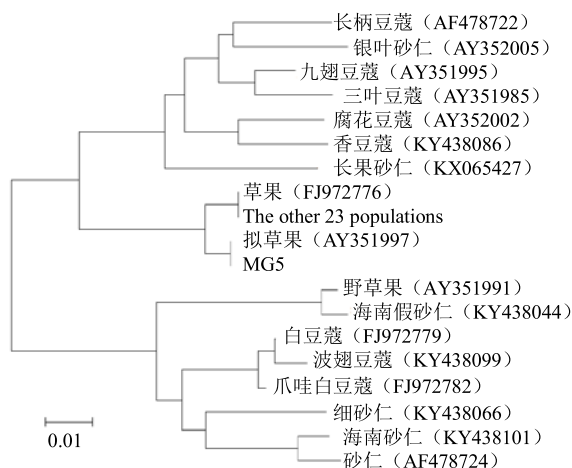


图 2 基于部分豆蔻属植物 ITS 序列的 NJ 进化树
Fig. 2 NJ clustering tree based on ITS sequence of part of *Amomum* genus

3.3 草果 rbcL 序列的鉴定

如图 3 所示, 将 rbcL 引物对样本扩增出的结果, 与 NCBI 数据库中的基因序列进行比对后, 将相似度较高的豆蔻属植物 rbcL 序列进行下载, 并与草果 rbcL 序列进行比对, 并用邻接法生成聚类树。本试验所有样本间的扩增测序结果均无差异, 而与部分豆蔻属植物序列的比较, 有一定鉴别能力; 结果表明, 本实验样本与长果砂仁和疣果砂仁聚为一支, 并无差异; 而野草果、砂仁、细砂仁、爪哇白豆蔻、白豆蔻这 5 种植物聚为一支, 序列无差异, 不能区分; 但对有的植物与同属的区分和鉴定是可行的,

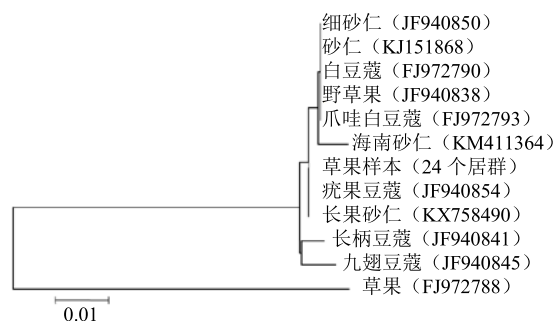


图 3 基于部分豆蔻属植物 rbcL 序列的 NJ 进化树
Fig. 3 NJ clustering tree based on rbcL sequence of part of *Amomum* genus

呈现为只有 1 种植物单独分为一支, 包括海南砂仁、长柄豆蔻和九翅豆蔻。因此, 单独使用 rbcL 序列对草果与其他植物的区分是不可行的。

3.4 草果 ycf1 序列的鉴定

对本实验中的材料进行扩增, 得出 2 种 ycf1 序列基因型, 分别为 MG6 和其他 23 个居群, 将本试验样本的 ycf1 序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对, 相似度较高同属植物的仅有白豆蔻和爪哇白豆蔻, 且与草果的差异并不明显。建立 K2P 模型, 对遗传距离进行分析, MG6 与其他 23 个居群的 K2P 遗传距离为 0.0014。草果 ycf1 序列在位点 74 上的碱基为 C, 而白豆蔻和爪哇白豆蔻为 A; 草果 ycf1 序列在位点 182 上的碱基为 T, 而白豆蔻和爪哇白豆蔻为 G; MG6 草果 ycf1 序列在位点 293 上的碱基为 T, 而其他为 A; 草果 ycf1 序列在位点 387 上的碱基为 T, 而白豆蔻和爪哇白豆蔻为 G。

图 4 为基于草果 ycf1 序列和其他两个同属植物 ycf1 序列所做的系统进化树, 可知 MG6 与其他 23 个居群被分为两支, 它们之间有差异; 而所有草果又与白豆蔻和爪哇白豆蔻为 2 支, 白豆蔻和爪哇白豆蔻的 ycf1 序列间无差异。

3.5 草果 psbA-trnH 序列的鉴定

通过 psbA-trnH 序列的引物对 24 个居群的扩增

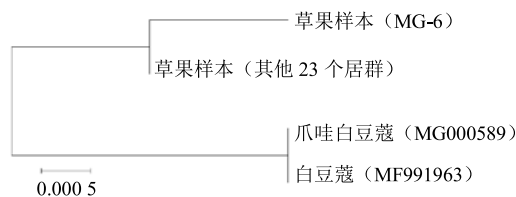


图 4 基于部分豆蔻属植物 ycf1 序列的 NJ 进化树
Fig. 4 NJ clustering tree based on ycf1 sequence of part of *Amomum* genus

结果可知, 24 个居群可被分为 3 种不同的序列, 分别为 MG5、MG6 和其他 22 个居群, 在 NCBI 中比对可得到同属相似序列 14 条, 后构建聚类树, 如图 5 可知, MG5、MG6 和其他 22 个居群之间, 可明显区分, 并且与豆蔻属其他植物能都能清晰区分, 其他豆蔻属植物之间有些序列一致, 不能彼此区分, 其中九翅豆蔻和长果砂仁序列一致, 长柄豆蔻和银叶砂仁序列一致, 海南砂仁、砂仁和细砂仁序列一致, 其余可通过此序列进行区分。

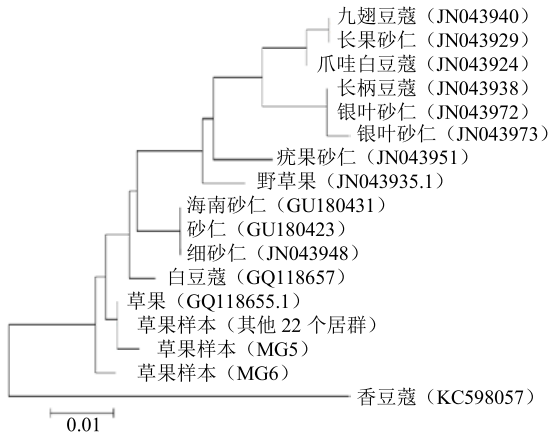


图 5 基于部分豆蔻属植物 psbA-trnH 序列的 NJ 进化树
Fig. 5 NJ clustering tree based on psbA-trnH sequence of part of *Amomum* genus

3.6 草果 matK 序列的鉴定

MG6 和其他 22 个居群 matK 序列扩增成功, 并分为 2 支, 但 MG5 白花草果的 matK 序列扩增失败, 经 NCBI 比对后, 下载 16 条同属相似植物的序列, 计算相似系数后构建的聚类树如图 6 所示, MG6 和其他 22 个居群之间可区分, 并且与 16 个同属植物也可区分开, 但这 16 个同属植物之间多数不可清晰区别开。

3.7 基于 ITS、ycf1、psbA-trnH、matK 序列的草果遗传多样性分析

由于 24 个居群草果居群间的 rbcL 序列并无区别, 因此舍去 rbcL 序列, 构建草果居群间聚类图。图 7 为草果 ITS、ycf1、psbA-trnH、matK 序列所做的 NJ 进化树, MG6 与其他 22 个居群分为一支, 与 MG5 分开; 又由基于草果 ITS、rbcL、ycf1 序列所做的遗传距离 (表 3) 可知, MG6 与其他 22 个居群的遗传距离为 0.001 5, MG5 与其他 22 个居群的遗传距离为 0.003 6, MG5 与 MG6 的遗传距离为 0.005 1。

4 讨论

DNA 条形码分子标记技术基于 DNA 序列本身,

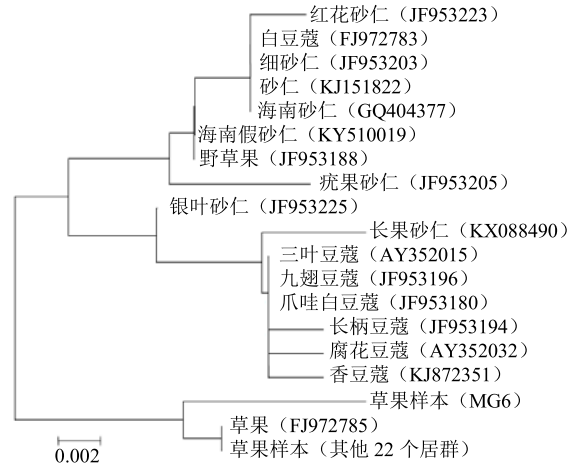


图 6 基于部分豆蔻属植物 matK 序列的 NJ 进化树
Fig. 6 NJ clustering tree based on matK sequence of part of *Amomum* genus

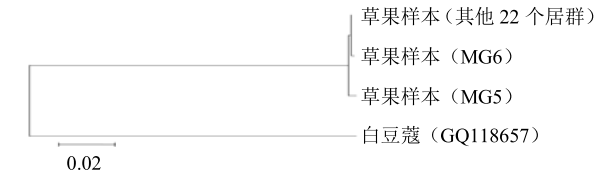


图 7 基于草果 ITS、ycf1、psbA-trnH、matK 序列的 NJ 进化树
Fig. 7 NJ clustering tree based on ITS, ycf1, psbA-trnH, and matK sequence of *A. tsao-ko*

结果比传统形态分类和其他分子标记方法更加准确快捷, 可以快速完成物种的区别和鉴定, 发现新种和隐存种, 重建物种和高级阶元的演化关系^[22]。

4.1 叶绿体序列

matK、rbcL 及 psbA-trnH 3 种序列是比较常用的在叶绿体中的 DNA 条形码, 在姜科及豆蔻属植物中也有应用, 而 ycf1 序列是叶绿体基因组内的片段, 由于其进化速率快, 序列变异较大, 且对于陆地植物物种, 其在 PCR 成功率、序列位点变异率及物种鉴别率等方面优于 matK、rbcL 及 psbA-trnH 等常用叶绿体 DNA 条形码, 因此被认为是最具潜力的陆地植物 DNA 条形码序列^[11]。

在本实验中, matK、psbA-trnH 及 ycf1 序列均能将草果与其他同属植物进行区分; psbA-trnH 序列在 PCR 成功率、序列位点变异率及物种鉴别方面呈现出了比 3 个叶绿体常用序列 matK、rbcL 和 ycf1 更好的结果, psbA-trnH 序列可将白花的 MG-5 和其他黄花草果清晰地区分开, 并且可对黄花草果 MG-6

表 3 基于 ITS、ycf1、psbA-trnH、matK 序列的草果居群间的遗传距离

Table 3 Genetic distance between *A. tsao-ko* populations based on ITS, ycf1, psbA-trnH, and matK sequences

居群	其他 22 个居群	MG5	MG6	白豆蔻
其他 22 个居群	0			
MG5	0.003 6			
MG6	0.001 5	0.005 1		
白豆蔻	0.231 7	0.233 8	0.233 7	0

和其他居群草果进行区分；MG-6 的 matK 和 ycf1 序列相对于其他黄花草果居群，同样发现了序列位点的变异，又已知 MG-6 为无人栽培管理的野生草果，因此提出猜测，因 MG6 与其他居群有限的基因流，引起 MG-6 序列个别位点的变异。但草果 ycf1 序列无法将白花和黄花草果分开；而 matK 序列对 MG-5 白花草果样本扩增失败；rbcL 序列对白花黄花草果所有样本的扩增结果无任何变异，且用 rbcL 序列无法鉴别草果与长果砂仁和疣果砂仁。

4.2 核糖体序列

ITS 序列是位于核糖体上的一段序列，分为 ITS1，5.8 S 和 ITS2 3 个部分，其 2 侧为 16 S 和 28 S 2 段序列。在研究过程中，经过重复的筛选，ITS2 被人们公认成为最适宜作为 DNA 条形码的一段序列。本研究用 ITS5、ITS4 引物对 ITS 序列进行扩增，测序和分析可得，扩增测序结果可将草果序列区分开，序列长度大约为 520，变异位点为 5 个；该序列包括完整的 ITS1，5.8 S 和 ITS2 和部分 16 S 和 28 S。本实验大部分样本扩增出的序列与标准草果 ITS 序列聚为一支，而与 MG-5 样本明显分为 2 支，又已知除 MG-5 和 MG-6 外，样本全部为标准的栽培黄花草果，MG-5 的花为白色，并与拟草果聚为一支，因此猜测本实验的 MG-5 样本为拟草果。

5 结论

ITS、matK、psbA-trnH 及 ycf1 序列均能将草果与其他同属植物进行准确区分；MG-6 的 matK、psbA-trnH 及 ycf1 序列发现了序列位点的变异，为草果品种的选育做出贡献。ITS 和 psbA-trnH 序列可将黄花和白花草果序列区分开；白花、黄花草果所有样本 rbcL 序列无任何变异，且用 rbcL 序列无法鉴别草果与其他同属植物，可将其舍去。

参考文献

- [1] 徐国钧. 常用中药材品种整理和研究 (第 3 册) [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1997.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 张显努, 马 钧, 张文炳. 香料作物栽培新技术 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2009.
- [4] 吴德邻. 中国植物志 (第 16 卷第 2 册) [M]. 北京: 科

学出版社, 1981.

- [5] 王正昆, 杨延康. 草果栽培技术 [M]. 昆明: 云南农业科技, 2006.
- [6] 明建鸿, 胡耀华. 草果的产销动态分析 [J]. 中药材, 2004, 27(6): 499-451.
- [7] 李俊清. 植物遗传多样性保护及其分子生物学研究方法 [J]. 生态学杂志, 1994(6): 27-33.
- [8] 杨志清. 分子标记在作物改良中的应用 [J]. 云南农业科技, 2002(5): 20-22.
- [9] 陈新民, 何中虎, 史建荣, 等. 利用 SSR 标记进行优质冬小麦品种(系)的遗传多样性研究 [J]. 作物学报, 2003(1): 13-19.
- [10] 胡一凡, 狄义宁, 张雪梅, 等. 云南草果 SSR-PCR 反应体系的优化及引物的筛选 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(1): 195-200.
- [11] 胡一凡, 张雪梅, 徐绍忠, 等. 云南草果种质资源的遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5388-5395.
- [12] 辛天怡, 李美妮, 宋经元. 川芎及其近缘物种的 ITS2 序列分析与鉴别研究 [J]. 中国现代中药, 2011, 13(12): 18-21.
- [13] 殷秀梅, 罗 焜, 刘美子, 等. 蛇床及其近缘物种的 ITS2 分子鉴定 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(3): 9-11.
- [14] 郑司浩, 孙稚颖, 黄林芳. 麦冬及其混伪品的 ITS2 序列分析及鉴别研究 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(1): 21-23.
- [15] 钟志敏. 姜科植物的 ITS2 条形码鉴定及聚类分析 [J]. 中药材, 2017, 40(9): 2046-2050.
- [16] 钟志敏, 赖小平, 黄 松, 等. 基于 ycf1 的姜科植物条形码鉴定及聚类分析 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 4089-4092.
- [17] 杨振艳, 张 玲. 姜科砂仁属植物 DNA 条形码序列的筛选 [J]. 云南植物研究, 2010, 32(5): 393-400.
- [18] 王晓玥, 陈晓辰, 廖保生, 等. 基于 DNA 条形码鉴定豆蔻类中药材 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(11): 888-894.
- [19] 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.
- [20] 严美荣. 草果遗传多样性分析及其混淆品的 ITS 序列差异比较研究 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2012.
- [21] 辛天怡. 中药材 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(2): 170-184.
- [22] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.