

• 药材与资源 •

川芎种质鉴定标记开发和系统发育研究

熊 淼^{1,2}, 袁 灿^{1,3#}, 彭 芳^{1,3}, 陶 珊^{1,3}, 吴 宇^{1,3}, 施田田^{1,3}, 余小芳^{2*}, 张 超^{1,3*}

1. 四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所, 四川 成都 610300

2. 四川农业大学, 四川 成都 611130

3. 国家中药材产业技术体系成都试验站, 四川 成都 610300

摘要: 目的 基于藁本属 *Ligusticum* 叶绿体基因组高频插入缺失区域开发 InDel 标记, 同时结合通用条形码对道地川芎及其常用混伪品进行种质鉴定和系统发育研究。方法 通过 8 个 DNA 通用条形码 *ycf1*、*matK*、*ITS2*、*rpoC1*、*rbcL*、*rpoB*、*trnK*、*psbA-trnH* 序列片段对采集的 26 个川芎样品及其常用混伪品进行了扩增和测序, 采用了遗传距离统计法、*barcoding gap* 分析法和构建系统发育树法进行亲缘关系和系统发育研究。同时利用 InDel 分子标记, 采用构建进化树法对道地川芎及其混伪品物种进行分子鉴定。结果 *rbcL* 片段保守位点最多 (97.32%), 且 GC 含量最高 (44.9%)。*rbcL+rpoB* 片段具有最小的平均种内遗传距离 (0.002 5), *psbA-trnH* 片段具有最大的平均种间遗传距离 (0.429 2)。*trnK* 片段和 *rbcL+rpoB* 片段具有最高的种间变异, *psbA-trnH* 片段的“*barcoding gap*”区重叠度最小。采用的 8 对 DNA 通用条形码无法准确地鉴定道地川芎药材与其他混伪品物种。InDel 分子标记的聚类分析中, 24 对 InDel 引物中的 4 对引物组合能准确地鉴定出道地川芎, 并将道地川芎及其混伪品物种聚类为 4 个分支, 其中一个分支为采集的道地川产川芎药材。结论 InDel 标记对道地川芎及其常用混伪品的鉴定能力高于通用条形码。对于传统的通用 DNA 条形码, 由于遗传成分差异大, 无法区分川芎及其常用混伪品。新开发出的 InDel 分子标记可以有效地鉴定道地川芎及其常用混伪品, 从分子水平上为川芎道地性研究提供有效手段。

关键词: DNA 条形码; 川芎; 种质鉴定; InDel; 分子标记**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)01-0169-13**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.023Development of germplasm identification markers and phylogenetics analysis of *Ligusticum chuanxiong*XIONG Miao^{1,2}, YUAN Can^{1,3}, PENG Fang^{1,3}, TAO Shan^{1,3}, WU Yu^{1,3}, SHI Tian-tian^{1,3}, YU Xiao-fang², ZHANG Chao^{1,3}

1. Institute of Industrial Crop Research, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610300, China

2. Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

3. Chengdu Comprehensive Experimental Station of Chinese Medicinal Materials Industrial Technology Research System, Chengdu 610300, China

Abstract: Objective In this study, InDel markers were developed based on the high frequency Insertion/Deletion region of chloroplast genome of *Ligusticum*. Germplasm identification and phylogenetic development of *Ligusticum chuanxiong* and its common adulterants were studied with universal barcode. **Methods** The 26 samples of *L. chuanxiong* and its common adulterants were amplified and sequenced by eight DNA universal barcodes: *ycf1*, *matK*, *ITS2*, *rpoC1*, *rbcL*, *rpoB*, *trnK*, and *psbA-trnH*. Genetic distance statistics, *barcoding gap* and phylogenetic tree analysis methods were used to study the phylogenetic relationship and

收稿日期: 2019-06-06**基金项目:** 四川省育种攻关 (2016WY0036-4-1); 四川省财政创新提升工程 (2016TSCY-001); 四川农业科学院优秀论文基金 (2018LWJJ-019)**作者简介:** 熊 淼, 硕士研究生, 从事植物遗传育种研究。E-mail: xiongcd123@foxmail.com***通信作者** 余小芳, 副教授, 从事园林植物遗传育种、抗逆性研究。E-mail: xiaofangyu@sicau.edu.cn

张 超, 博士, 研究员, 从事中药材等经济作物的资源创新、遗传育种和栽培技术研究。E-mail: jychoazhang@163.com

#并列第一作者 袁 灿, 研究实习员, 从事中药材资源创新与品种选育。E-mail: scnkyjzsxy@163.com

phylogeny of *L. chuanxiong*. At the same time, the evolutionary tree was constructed to study molecular identification of *L. chuanxiong* and its common adulterants. **Results** The results showed that *rbcL* conserved site was the highest (97.32%) with the highest GC content (44.9%). The *rbcL*+*rpoB* fragment had the smallest average intraspecific genetic distance (0.002 5). The *psbA*-*trnH* sequence fragment had the largest average interspecific genetic distance (0.429 2). The *trnK* and *rbcL*+*rpoB* sequence had the highest interspecific genetic distance. The overlap of the “barcoding gap” region of *psbA*-*trnH* was the least. The species of *L. chuanxiong* and other adulterated species were not accurately identified by the eight pairs of DNA barcodes. The cluster analysis of 24 InDel markers could accurately identify genuine *L. chuanxiong* and classify the species of *L. chuanxiong* and its adulterants into four categories, one of which was genuine *L. chuanxiong* collected from Sichuan. **Conclusion** The ability of InDel markers to identify authentic *L. chuanxiong* and its common adulterants was higher than that of common barcode. According to the above studies, it is found that it is impossible to distinguish *L. chuanxiong* and its common adulterants by the traditional DNA barcodes because of the large difference in genetic components. The newly developed InDel molecular markers can effectively identify *L. chuanxiong* and its commonly used adulterants, and provide an effective method for the genuineness of *L. chuanxiong* at molecular level.

Key words: DNA barcode; *Ligusticum chuanxiong* Hort.; germplasm identification; InDel; molecular marker

川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 为伞形科藁本属植物,以干燥的根入药,是我国传统的中药材。川芎具有活血行气、祛风止痛的功效,常用于胸痹心痛、经闭痛经、风湿痹痛等症状的治疗。四川、江西、云南、吉林、甘肃、贵州等省都有川芎分布,四川省川芎产量丰富,为川芎道地产区,其中都江堰、彭州、崇州市是主产区,产量占全国产量的 90% 以上^[1]。随着中药材市场的发展,当正品中药材数量不能满足市场需求时,经常会出现中药材真伪优劣的问题。市场上使用其近缘物种等大量混用品、替代品。如川芎,特别是四川产川芎药效高于其他藁本属类似药材^[2]。随着川芎产品的不断开发,市场需求量不断增加,部分川芎的混伪品流入市场。另外,不同产地的川芎混伪品在当地被作为道地川芎药材混用,同名异种的“川芎”在各地也出现用药不规范的问题。在四川道地川芎与其他种质资源之间亲缘关系和系统发育的研究中,有研究认为川芎和日本川芎二者基原一致^[3],川芎与日本川芎 *Cnidium officinale* Makino 亲缘关系非常密切^[4]。也有研究认为抚芎 *Ligusticum sinense* Hort. cv. *fluxiong* 实为藁本 *Ligusticum sinense* Oliv. 的栽培品^[5]。道地药材与非道地药材来源一致或十分相近,在形态、生物药性及化学成分等特征上也具有高度相似性,导致道地药材的鉴别不易。因此迫切地需要研究利用新的方法提高道地川芎的鉴别能力。

随着 DNA 分子鉴定方法不断深入, DNA 条形码鉴定技术已发展成为中药材分子鉴定和进化研究的重要方法。DNA 条形码技术是通过利用短的、标准的序列片段对物种进行鉴定^[6]。能够快速、准确地对不同物种进行分析,在物种鉴定方面显示了广阔的应用前景^[7]。包括利用 4 个通用条形码对中国樟科植物

进行系统发育重建^[8]。推荐联合通用条形码 ITS+*matK* 作为中国海岸带耐盐植物 DNA 条形码^[9]。通过对 110 余科 700 多属 6 600 余份实验样本表明条形码 ITS2 序列的物种鉴定效率高达 92.7%^[10]。在国际上首先验证并确立 ITS2 序列作为药用植物通用条形码,并在川芎、金钱草 *Lysimachia christinae* Hance、京大戟 *Euphorbia peginensis* Rupr.、蛇床 *Cnidium monnieri* L.、麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Linn. f.) Ker-Gawl. 等药材基原物种及其混伪品的鉴定工作中得到良好应用^[11-12]。生命条形码联盟 (CBOL) 更是建议将叶绿体基因 *rbcL*、*matK*、*psbA*-*trnH* 和核基因 ITS 作为陆地植物通用的 DNA 条形码^[13]。中药川芎常用的 DNA 条形码鉴定方法有 *matK* 和 ITS 等,利用该技术通用引物扩增短的条形码序列来实现药材的快速鉴定。通过利用 ITS 和 *matK* 序列,探讨中、日川芎物种间鉴别,其结果显示 ITS 测序难以区分中国川芎和日本川芎^[14]。通过 ITS2 条形码研究川芎与羽苞藁本 *Ligusticum dauroides* (Franch) Franch. 等藁本属植物的遗传差异,结果显示 ITS2 条形码可以有效地鉴别川芎及其近缘物种^[15]。也有研究通过对蛇床子和川芎叶绿体 *trnK* 基因序列的测定,建立了一种鉴别日本川芎和川芎的有效方法^[16]。但上述研究中使用研究材料种类较少,并无市场中川芎常见的混伪品种如抚芎、云南藁本 *Ligusticum yunnanense* Oliv. 等,并且少有结合道地川芎药材的研究报道。另外,在上述研究中所使用的通用 DNA 条形码较少,缺乏开发新条形码的创新性研究,缺少关于市场上道地川芎及其混伪品问题的有效解决方法。

普通用于鉴定植物的 DNA 条形码,由于片段长度的限制,单一序列或多序列组合的条形码在物种鉴定特别是针对近缘物种之间的鉴定存在很大的

局限性^[17]。叶绿体普遍存在于植物中,而相对于核基因组以及线粒体基因组,叶绿体基因组大多为母系遗传,进化速率较慢,序列较为保守^[18]。植物叶绿体基因组作为筛选 DNA 条形码序列的研究热点,其本身也可以作为超级条形码用于系统进化、亲缘关系以及物种鉴定研究。根据叶绿体基因组中的插入缺失位点,设计一些扩增这些插入缺失位点的 PCR 引物,就是叶绿体插入/缺失多态性(chloroplast insertion/deletion polymorphism, cpInDel)标记^[19]。有学者通过在 15 个小麦 *Triticum aestivum* L. 野生近缘属种基因组 DNA 的扩增分析发现 11 对 InDel 标记引物^[20]。也有研究发现在 B73 玉米 *Zea mays* L. 全基因组序列

中发现 13 个共显性 InDel 标记,利用这些共显性 InDel 标记可以进行快速准确的玉米杂交种纯度鉴定^[21]。通过比较 2 种粳稻 *Oryza saliva* subsp. Keng 的基因组序列,设计出 634 对 InDel 候选标记,可以在涉及粳稻亚种的基因定位和分子育种中应用^[22]。但是对于川芎的 InDel 标记尚未见相关研究。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选取了藁本属的 26 个物种为材料,每个种包括了 6~14 个个体。实验材料均为野外和农田地采集,以新鲜的叶片供 DNA 的提取。其余序列来源于 Genbank 数据库。材料信息见表 1。

表 1 材料信息

Table 1 Information of matrtials

编号	学名	拉丁名	材料来源
1	日本川芎	<i>C. officinale</i>	日本
2	辽藁本	<i>L. jeholense</i>	四川
3	辽藁本		四川
4	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>Chuanxiong</i>	四川
5	短片藁本	<i>L. brachylobum</i>	四川
6	长茎藁本	<i>L. thomsonii</i>	四川
7	藁本	<i>L. sinense</i>	四川
8	抚芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>Fuxiong</i>	江西
9	云南藁本	<i>L. yunnanense</i>	云南
10	云南藁本	<i>L. yunnanense</i>	云南
11	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	云南马厂
12	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	云南马厂
13	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	甘肃华亭
14	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
15	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
16	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
17	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
18	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
19	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
20	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
21	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
22	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
23	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
24	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
25	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
26	川芎	<i>L. sinense</i> cv. <i>chuanxiong</i>	四川
27	尖叶藁本	<i>L. acuminatum</i>	Genbank: KC295 187.1
28	丽江藁本	<i>L. delavayi</i>	Genbank: MF963582.1
29	加拿大藁本	<i>L. calderi</i>	Genbank: MG224714.1
30	抽葶藁本	<i>L. scapiforme</i>	Genbank: MF786825.1
31	短尖藁本	<i>L. mucronatum</i>	Genbank: KX527310.1
32	苏格兰本藁	<i>L. scoticum</i>	Genbank: D44575.1
33	加拿大藁本	<i>L. canbyi</i>	Genbank: MG221848.1
34	归叶藁本	<i>L. angelicifolium</i>	Genbank: JF279384.1

1.2 DNA 提取及通用引物 PCR 扩增测序

采用 CTAB 法提取研究材料 DNA。使用 psbA-trnH、rpoB、rpoC1、rbcL、matK、ITS2、trnK 和 ycf1 的 8 个通用 DNA 条形码对进行扩增。PCR 反应体积为 20 μ L, 体系内包含上下游混合引物 2 μ L、ddH₂O 6 μ L, mix 10 μ L。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶分离检测。取 4 μ L 扩增产物点样, 2.5 μ L 1 kb DNA ladder 点样作为相对分子质量标记。用 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液电泳, 电压 160 V, 电流 120 A, 25 min 后在凝胶成像分析系统下检测 PCR 反应结果并拍照。将扩增成功的 PCR 产物(出现明显 PCR 条带), 送往生工生物工程成都部门双向测序。部分用 ITS2 引物扩增的 PCR 产物, 用克隆测序方法。PCR 产物用琼脂糖凝胶分离, 用 Trans 公司的简易快速凝胶提取试剂盒进行回收和纯化。然后连接入 Trans 公司的平端克隆载体, 反应体系含 1 μ L Trans 公司的平端克隆载体, 4 μ L 胶回收产物。连接后再转化到感受态细胞 Trans1-T1 大肠杆菌感受态细胞中, 挑选阳性克隆, 菌落 PCR 检测, 验证后将扩增成功的 PCR 产物, 送往生工生物工程有限公司成都分公司双向测序。部分用 ITS2 引物扩增的 PCR 产物, 用克隆测序方法, 挑选阳性克隆, 菌落 PCR 检测, 验证后将合适的含单克隆菌液送往生工生物工程有限公司成都分公司正向测序。

1.3 InDel 引物设计

从 GenBank 数据库中, 下载 12 个藁本属植物的叶绿体全基因组序列, 通过 Mafft 在线比对软件(<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)进行比对, 在细叶藁本的叶绿体全基因组序列上, 找到插入(IN)缺失(DEL)位点。利用 Primer Blast 软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在 InDel 位点两侧设计引物, 引物长度大于 20 bp, 以 25 bp 最优选择, 退火温度为 50~60 $^{\circ}$ C, 以 56 $^{\circ}$ C 为最优选择, GC 含量为 55%~60%, PCR 产物大小在 100~500 bp。

1.4 毛细管电泳检测

由毛细管电泳仪器 Fragment AnalyzerTM 系统检测, 实现双链核酸(DNA 或 RNA)的全自动、高通量分离和定量。采用高效毛细管电泳技术, 并利用琼脂糖凝胶电泳筛选出 InDel 引物, 对 26 份藁本属实验材料进行遗传多样性分析。取 FA 分离胶(FA dsDNA Gel 35~800 bp) 80 mL 加入 4 μ L 的插入染料(Intercalating Dye)充分混匀, 放入仪器 GEL-1 的锥形瓶中。确保液体管插入到瓶子的底部, 勿吸

入气泡, 否则会引起压力性误差。放入分离胶后, 及时更新仪器的控制软件(solution levels)溶液水平, 并输入正确的 GEL-1 体积。取 20 mL 的 5 $\times$ 毛细管清洗液加入 180 mL 的超纯水, 充分混匀, 放入相应的锥形瓶中, 更新仪器的控制软件(solution levels)溶液水平。取 20 mL 的缓冲液(5 $\times$ 930 DNA Inlet buffer)加入 80 mL 的超纯水, 混匀并静止。将配置好的液体加入深孔板中, 每孔 1 mL, 切勿使孔内产生气泡。将 96 深孔板放入仪器的 1 抽提中。取 96 孔板一个, 每孔加入 30 μ L 的 Maker 液体, 并加入一滴矿物油, 适当离心, 切勿产生气泡。将配制好的 Maker 放入 3 抽提中。将 PCR 产物 10 μ L, 依次加入 96 孔反应板中, 向其中加入 14 μ L 的 1 XTE 溶液并混匀, 最后一孔加入 24 μ L 75~400 bp DNA ladder, 3 000 r/min, 离心 1 min。离心后静止片刻, 切勿使孔内产生气泡, 将样品板放入 4 抽提中。启动仪器, 开始进行电泳。

1.5 数据分析

PCR 扩增测序结果利用 DNAMAN 校对拼接, 去除引物区。克隆测序结果用 VecScreen(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)软件在线分析并去除载体序列。利用 MEGA 5.0(molecular evolutionary genetics analysis)对所有序列进行分析比对, 统计不同引物扩增序列的序列长度、比对后序列长度、平均碱基组成百分比、保守位点和变异位点等, 并基于 K2P 模型进行遗传距离分析, 采用邻接(neighbor-joining, NJ)法、最大简约(maximum parsimony)法、最大似然(maximum likelihood)法、贝叶斯法(bayesian inference)构建聚类分析树, 利用 Bootstrap 值检验各分支的支持率, 自展数据集 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和测序成功率

PCR 扩增和测序成功率存在较大的差异, 8 个引物片段效率的扩增效率为 100%, 但是测序成功率为 87.5%, 在 ITS2 片段扩增中, 尽管使用了 3 对 ITS2 引物(ITS5 和 ITS4、ITS-S2F 和 ITS-S3R、ITS1 和 ITS4), 并对 PCR 反应条件进行了优化。但是样品材料中均有样品无法得到完整的 ITS2 序列, 返回的测序结果峰值图谱中多为双峰或者三峰重叠的峰值情况, 以 17 号四川川芎其中一段显示为三峰重叠图谱的序列为例(图 1)。研究将挑出的阳性菌液测序结果经过比对, 横坐标为碱基序列

位置, 有 1 个或多个突变缺失位点, 造成 PCR 扩增产物测序峰值图混乱。所以在结果分析中不考虑 ITS2 序列片段。

2.2 序列信息

所选用的 7 个通用 DNA 条形码片段的序列特征信息见表 2。对于的 26 份藁本属材料, 结合 Genbank 数据库中已发表的其他藁本属序列基因序列结果进行对比分析, 比对结果显示 matK、rpoB、rpoC1、ycf1、rbcL、psbA-trnH 和 trnK 序列比对后总长度分别为 542、340、504、908、523、

157 和 1 220 个核苷酸, 平均 GC 含量分别为 35.9%、40.5%、41.7%、33.0%、44.9%、33.1%和 32.5%, 变异位点为 7.38%、46.47%、73.41%、51.32%、2.62%、51.59%和 1.97%。遗传发育的信息位点比例分别为 3.50%、0.002%、48.41%、50.44%、2.25%、39.49%和 1.07%。在 7 个单个通用条形码序列片段中, rbcL 片段的保守位点最多, rpoC1 片段的保守位点最少、变异位点最多, ycf1 片段的信息位点最多, rpoB 的自裔位点最少, rbcL 片段的 GC 含量最高。

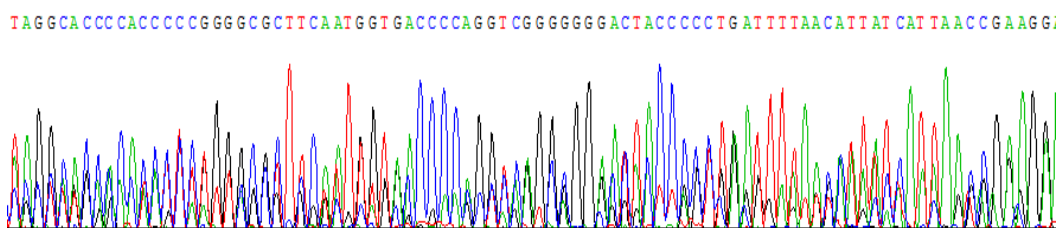


图 1 ITS2 引物扩增四川川芎 17 号 PCR 产物测序峰值

Fig. 1 Amplification of PCR product sequencing peak map of ITS2 sequence from *L. chuanxiong*

表 2 基于 7 个叶绿体通用 DNA 条形码片段的特征信息

Table 2 Sequence data analysis of seven universal chloroplast barcodes

条形码	长度范围/bp	序列对比长度/bp	平均 GC 含量/%	保守位点/%	变异位点/%	信息位点/%	自裔位点/%
matK	996~1 253	542	35.9	91.70	7.38	3.500	3.87
rpoB	329~341	340	40.5	44.41	46.47	0.002	46.17
rpoC1	502~517	504	41.7	25.99	73.41	48.410	25.00
ycf1	876~898	908	33.0	48.56	51.32	50.440	0.01
rbcL	707~728	523	44.9	97.32	2.62	2.250	0.03
psbA-trnH	280~303	157	33.1	47.13	51.59	39.490	12.10
trnK	1 205~1 230	1 220	32.5	96.80	1.97	1.070	0.90

对 7 个通用 DNA 条形码序列片段种间和种内的 K2P 遗传距离进行统计分析, 通过对单个通用 DNA 条形码片段的种内、种间序列变异分布进行 Wilcoxon 秩和检验, 发现 rpoC1 序列的种内、种间序列变异最为显著 (表 3)。同时, 7 个通用 DNA 条形码序列片段的种间遗传距离平均值均大于种内遗传距离平均值。rbcL 序列片段具有最小的平均种间遗传距离和平均种内遗传距离, 分别为 0.003 1 和 0.002 5。psbA-trnH 具有最大的平均种间遗传距离, 遗传距离值 0.429 2, 其余依次为 rpoC1、ycf1、rpoB、trnK 和 matK。rpoC1 的平均种内遗传距离为 0.256 1, 具有最大的平均种内遗传距离, 其次是 ycf1、rpoB、psbA-trnH、trnK、

matK (表 4)。在 15 组引物组合序列片段中, 种间遗传距离平均值均大于种内遗传距离平均值, rbcL+rpoB 具有最小的平均种间遗传距离和平均种内遗传距离分别为 0.001 8 和 0.001 6。matK+rpoB+rpoC1 具有最大的平均种间遗传距离 0.034 0, rbcL+rpoB+rpoC1 具有最大的平均种内遗传距离 0.031 3 (表 5)。

种间与种内遗传变异研究结果显示 (表 6、7), 所考察的 7 个单引物序列候选片段和 15 个组合引物序列候选片段中, trnK 序列和 rbcL+rpoB 组合序列拥有较高的种间变异, psbA-trnH 序列、psbA-trnH+trnK 组合序列和 matK+psbA-trnH+rpoB 组合序列具有相对较低的种内变异。

表 3 单个通用 DNA 条形码片段的种内、种间变异分布的 Wilcoxon 秩和检验

Table 3 Wilcoxon signed rank tests of inter-specific and intra-specific divergence loci of single barcodes

条形码	种间样本量	种内样本量	Wilcoxon 秩和检验	P 值
tK	192	133	25 465.0	$2.460 6 \times 10^{-16}$
psbA-trnH	192	133	25 748.5	$9.044 6 \times 10^{-13}$
rbcL	192	133	25 311.0	$1.178 9 \times 10^{-19}$
rpoB	192	133	30 648.0	0.206 81
rpoC1	192	133	25 170.0	$2.394 8 \times 10^{-20}$
ycf1	192	133	24 093.5	$5.862 1 \times 10^{-20}$
trnK	192	133	24 392.0	$4.908 1 \times 10^{-17}$

表 4 单条形码片段对藁本属植物的遗传距离分析

Table 4 Genetic distance analysis of single barcode for *Ligusticum*

条形码	所有种间遗传距离	最小种间遗传距离	所有种内遗传距离	平均变异	种内最大变异
matK	0.003 7±0.000 7	0.002 6±0.005 7	0.003 6±0.003 7	0.003 2±0.002 2	0.022 2±0.012 9
rpoB	0.115 4±0.014 0	0.565 9±0.447 4	0.115 2±0.114 8	0.068 5±0.182 1	0.259 6±0.411 1
rpoC1	0.291 4±0.022 6	0.046 5±0.230 3	0.256 1±0.362 2	0.168 5±0.289 9	0.432 9±0.580 9
ycf1	0.125 7±0.008 9	0.606 6±0.477 7	0.124 6±0.124 1	0.074 1±0.194 9	0.276 7±0.439 7
rbcL	0.003 1±0.001 1	0.000 7±0.001 6	0.002 5±0.002 5	0.003 7±0.003 1	0.001 0±0.006 1
psbA-trnH	0.429 2±0.062 0	0.007 2±0.014 3	0.111 5±0.101 5	0.155 9±0.137 7	0.475 3±0.266 3
trnK	0.007 8±0.001 5	0.001 8±0.003 0	0.005 7±0.004 6	0.004 0±0.004 4	0.008 7±0.007 4

表 5 不同引物片段组合对藁本属植物的遗传距离分析

Table 5 Genetic distance analysis of combined barcodes for *Ligusticum*

条形码	所有种间遗传距离	最小种间遗传距离	所有种内遗传距离	平均变异	种内最大变异
matK+rpoB	0.005 8±0.001 5	0.005 4±0.004 2	0.004 5±0.003 7	0.002 6±0.003 5	0.007 6±0.002 8
psbA-trnH+trnK	0.008 9±0.001 6	0.005 8±0.004 9	0.006 4±0.004 1	0.004 5±0.004 1	0.009 4±0.003 9
rbcL+rpoB	0.001 8±0.000 7	0.001 7±0.001 2	0.001 6±0.001 5	0.000 8±0.001 4	0.002 1±0.001 6
rpoB+ycf1	0.002 3±0.000 8	0.001 7±0.001 6	0.001 8±0.001 3	0.001 1±0.001 3	0.002 7±0.001 5
rpoC1+ycf1	0.031 9±0.002 2	0.022 7±0.062 1	0.031 3±0.031 0	0.001 0±0.016 8	0.053 7±0.090 1
ycf1+trnK	0.004 6±0.001 0	0.003 3±0.002 9	0.003 3±0.002 2	0.002 2±0.002 1	0.004 2±0.002 6
matK+psbA-trnH+rpoB	0.009 1±0.001 8	0.006 8±0.004 4	0.006 9±0.004 9	0.004 5±0.004 6	0.008 8±0.004 9
matK+rbcL+rpoB	0.004 5±0.001 1	0.004 0±0.003 4	0.003 6±0.003 1	0.002 0±0.002 9	0.005 3±0.002 7
matK+rpoB+rpoC1	0.034 0±0.002 3	0.025 3±0.063 0	0.033 1±0.032 6	0.010 5±0.017 5	0.056 6±0.091 3
psbA-trnH+rbcL+ycf1	0.005 1±0.001 0	0.003 2±0.002 9	0.004 2±0.003 0	0.002 8±0.002 9	0.005 5±0.003 3
psbA-trnH+rpoB+ycf1	0.005 0±0.001 2	0.002 8±0.002 4	0.003 8±0.002 4	0.002 7±0.002 3	0.005 4±0.002 0
psbA-trnH+rpoC1+ycf1	0.031 2±0.002 0	0.021 6±0.055 1	0.030 3±0.029 0	0.010 3±0.015 7	0.050 3±0.080 5
psbA-trnH+ycf1+trnK	0.006 6±0.001 1	0.004 4±0.003 6	0.004 8±0.003 2	0.003 3±0.003 1	0.006 3±0.003 2
rbcL+rpoB+rpoC1	0.031 5±0.002 0	0.022 3±0.062 9	0.031 3±0.031 2	0.009 4±0.016 3	0.053 7±0.091 6
rbcL+rpoC1+ycf1	0.022 6±0.001 4	0.016 2±0.042 7	0.022 1±0.021 9	0.007 0±0.011 7	0.037 1±0.062 2
rpoB+rpoC1+ycf1	0.025 2±0.001 7	0.017 9±0.048 8	0.024 7±0.024 4	0.010 2±0.020 7	0.042 2±0.070 7
matK+rpoC1+trnK	0.022 4±0.001 5	0.016 2±0.036 3	0.020 7±0.019 8	0.007 3±0.011 1	0.034 0±0.052 2

表 6 不同条形码片段种间变异的秩和检验

Table 6 Wilcoxon signed rank tests of inter-specific divergence loci from different barcodes

W ⁺	W ⁻	相对秩和		n	P 值	结果
		W ⁺	W ⁻			
psbA-trnH	trnK	613	8 033	30	≤0.000 1	trnK>psbA-trnH
trnK	ycf1	7 029	1 536	37	≤0.000 1	trnK>ycf1
trnK	rbcL	8 128	0	6	≤0.000 1	trnK>rbcL
trnK	rpoC1	5 886	2 242	19	≤0.000 1	trnK>rpoC1
trnK	matK	6 069	2 032	25	≤0.000 1	trnK>matK
matK+rpoB	rbcL+rpoB	190	4 661	19	≤0.000 1	rbcL+rpoB>matK+rpoB
psbA-trnH+trnK	rbcL+rpoB	53	8 858	42	≤0.000 1	rbcL+rpoB>psbA-trnH+trnK
rbcL+rpoB	rpoB+ycf1	4 639	2 147	36	≤0.000 1	rpoB+ycf1<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	rpoC1+ycf1	5 641	1 145	21	≤0.000 1	rpoC1+ycf1<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	ycf1+trnK	8 393	253	13	≤0.000 1	ycf1+trnK<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	matK+psbA-trnH+rpoB	5 510	15	5	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	matK+rbcL+rpoB	4 661	190	19	≤0.000 1	matK+rbcL+rpoB<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	matK+rpoB+rpoC1	4 661	190	19	≤0.000 1	matK+rpoB+rpoC1<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	psbA-trnH+rbcL+ycf1	7 189	71	5	≤0.000 1	psbA-trnH+rbcL+ycf1<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	psbA-trnH+rpoB+ycf1	7 225	35	7	≤0.000 1	psbA-trnH+rpoB+ycf1<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	psbA-trnH+rpoC1+ycf1	7 189	71	5	≤0.000 1	psbA-trnH+rpoC1+ycf1<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	psbA-trnH+ycf1+trnK	8 878	33	3	≤0.000 1	psbA-trnH+ycf1+trnK<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	rbcL+rpoB+rpoC1	2 490	2 166	59	0.553 2	psbA-trnH+ycf1+trnK=rbcL+rpoB+rpoC1
rbcL+rpoB	rbcL+rpoC1+ycf1	5 698	1 688	22	≤0.000 1	rbcL+rpoC1+ycf1<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	rpoB+rpoC1+ycf1	5 544	1 242	33	≤0.000 1	rpoB+rpoC1+ycf1<rbcL+rpoB
rbcL+rpoB	matK+rpoC1+trnK	7 919	468	15	≤0.000 1	matK+rpoC1+trnK<rbcL+rpoB

表 7 不同条形码片段种内变异的秩和检验

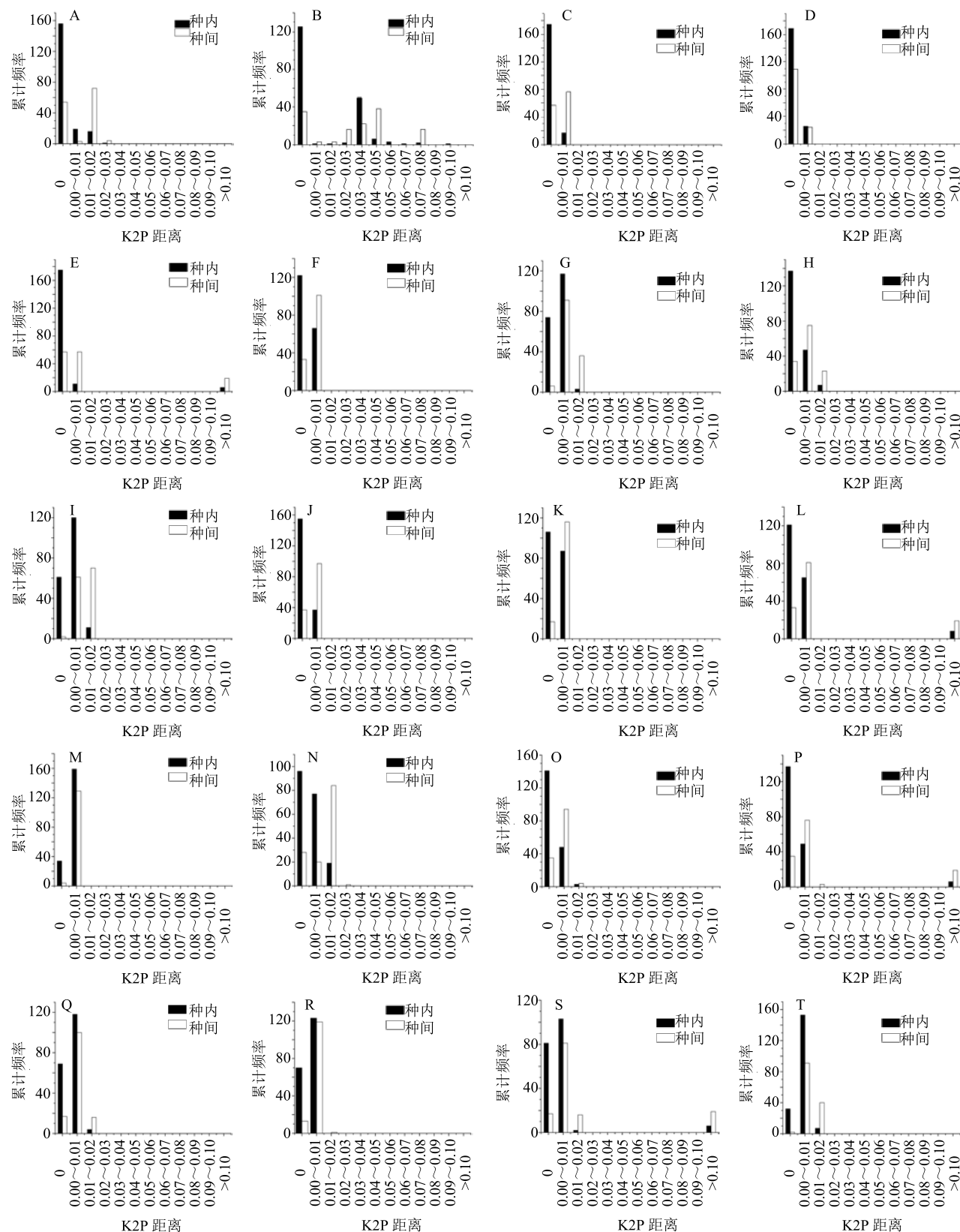
Table 7 Wilcoxon signed rank tests of intra-specific divergence loci from different barcodes

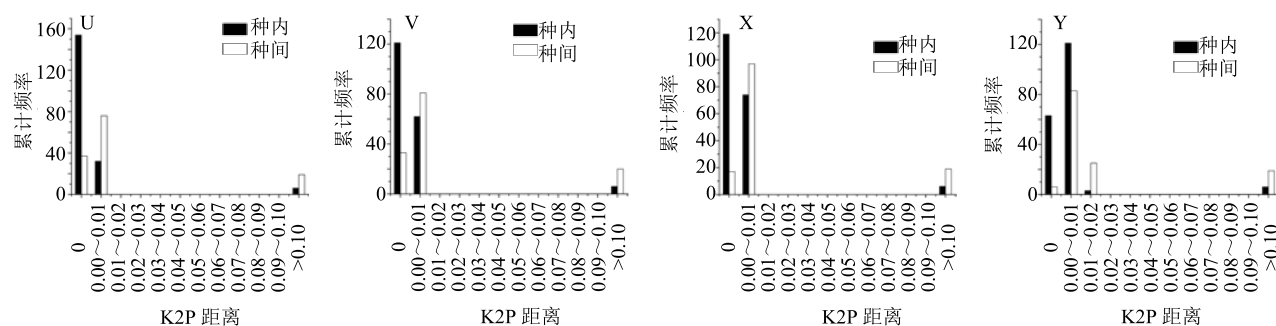
W ⁺	W ⁻	相对秩和		n	P 值	结果
		W ⁺	W ⁻			
matK	psbA-trnH	3 316	170	17	≤0.000 1	matK>psbA-trnH
psbA-trnH	rbcL	0	2 278	67	≤0.000 1	psbA-trnH<rbcL
psbA-trnH	rpoB	120	3 283	15	≤0.000 1	psbA-trnH<rpoB
psbA-trnH	rpoC1	393	1 953	6	≤0.000 1	psbA-trnH<rpoC1
psbA-trnH	ycf1	1 034	5 182	44	≤0.000 1	psbA-trnH<ycf1
psbA-trnH	trnK	1 581	5 922	55	≤0.000 1	psbA-trnH<trnK
matK+rpoB	psbA-trnH+trnK	209	1 331	29	≤0.000 1	matK+rpoB<psbA-trnH+trnK
matK+rpoB	matK+psbA-trnH+rpoB	4 243	510	30	≤0.000 1	matK+rpoB>matK+psbA-trnH+rpoB
psbA-trnH+trnK	rbcL+rpoB	66	8 580	11	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<rbcL+rpoB
psbA-trnH+trnK	rpoB+ycf1	1 533	11 347	43	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<rpoB+ycf1
psbA-trnH+trnK	rpoC1+ycf1	2 233	10 647	40	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<rpoC1+ycf1
psbA-trnH+trnK	ycf1+trnK	1 618	11 262	35	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<ycf1+trnK
psbA-trnH+trnK	matK+psbA-trnH+rpoB	3 340	5 438	66	0.017 1	psbA-trnH+trnK<matK+psbA-trnH+rpoB
psbA-trnH+trnK	matK+rbcL+rpoB	73	8 705	60	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<matK+rbcL+rpoB
psbA-trnH+trnK	matK+rpoB+rpoC1	1 054	7 724	29	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<matK+rpoB+rpoC1
psbA-trnH+trnK	psbA-trnH+rbcL+ycf1	1 338	11 542	33	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<psbA-trnH+rbcL+ycf1
psbA-trnH+trnK	psbA-trnH+rpoB+ycf1	2 745	10 135	52	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<psbA-trnH+rpoB+ycf1
psbA-trnH+trnK	psbA-trnH+ycf1+trnK	1 654	11 226	36	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<psbA-trnH+ycf1+trnK
psbA-trnH+trnK	rbcL+rpoB+rpoC1	843	7 935	17	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<rbcL+rpoB+rpoC1
psbA-trnH+trnK	rbcL+rpoC1+ycf1	1 724	11 156	35	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<rbcL+rpoC1+ycf1
psbA-trnH+trnK	rpoB+rpoC1+ycf1	1 910	10 970	37	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<rpoB+rpoC1+ycf1
psbA-trnH+trnK	matK+rpoC1+trnK	833	7 945	60	≤0.000 1	psbA-trnH+trnK<matK+rpoC1+trnK
rbcL+rpoB	matK+psbA-trnH+rpoB	4 648	105	14	≤0.000 1	rbcL+rpoB>matK+psbA-trnH+rpoB
rpoB+ycf1	matK+psbA-trnH+rpoB	7 733	1 312	41	≤0.000 1	rpoB+ycf1>matK+psbA-trnH+rpoB
rpoC1+ycf1	matK+psbA-trnH+rpoB	7 285	1 760	44	≤0.000 1	rpoC1+ycf1>matK+psbA-trnH+rpoB
ycf1+trnK	matK+psbA-trnH+rpoB	10 007	2 873	68	≤0.000 1	ycf1+trnK>matK+psbA-trnH+rpoB
matK+psbA-trnH+rpoB	matK+rbcL+rpoB	0	4 753	95	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<matK+rbcL+rpoB
matK+psbA-trnH+rpoB	matK+rpoB+rpoC1	567	4 186	6	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<matK+rpoB+rpoC1
matK+psbA-trnH+rpoB	psbA-trnH+rbcL+ycf1	1 290	7 755	39	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<psbA-trnH+rbcL+ycf1
matK+psbA-trnH+rpoB	psbA-trnH+rpoB+ycf1	2 343	6 702	44	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<psbA-trnH+rpoB+ycf1
matK+psbA-trnH+rpoB	psbA-trnH+rpoC1+ycf1	2 030	7 015	44	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<psbA-trnH+rpoC1+ycf1
matK+psbA-trnH+rpoB	psbA-trnH+ycf1+trnK	3 480	9 400	33	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<psbA-trnH+ycf1+trnK
matK+psbA-trnH+rpoB	rbcL+rpoB+rpoC1	564	4 168	6	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<rbcL+rpoB+rpoC1
matK+psbA-trnH+rpoB	rbcL+rpoC1+ycf1	1 758	7 287	44	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<rbcL+rpoC1+ycf1
matK+psbA-trnH+rpoB	rpoB+rpoC1+ycf1	2 027	7 018	46	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<rpoB+rpoC1+ycf1
matK+psbA-trnH+rpoB	matK+rpoC1+trnK	2 047	6 731	45	≤0.000 1	matK+psbA-trnH+rpoB<matK+rpoC1+trnK

2.3 Barcoding gap 检验

结合种间与种内的遗传变异分布图来评价候选引物序列片段的适应性,为了评价所考察的片段

是否存在明显的条形码间隔区,本研究对 7 个引物片段及 15 个引物片段组合的种内与种间距离以 0.01 为单位绘制遗传变异分布图(图 2)。研究结果





A-matK B-psbA-trnH C-rbcL D-rpoB E-rpoC1 F-ycf1 G-trnK H-matK+rpoB I-psbA-trnH+ycf1 J-rbcL+rpoB K-rpoB+ycf1 L-rpoC1+ycf1 M-ycf1+trnK N-matK+pabA-trnH+rpoB O-matK+rbcL+rpoB P-matK+rpoB+rpoC1 Q-psbA-trnH+rbcL+ycf1 R-psbA-trnH+rpoB+ycf1 S-psbA-trnH+rpoC1+ycf1 T-psbA-trnH+ycf1+trnK U-rbcL+rpoB+ycf1 V-rbcL+rpoC1+ycf1 X-rpoB+rpoC1+ycf1 Y-matK+rpoC1+trnK

图 2 候选序列引物片段种间、种内 K2P 距离频率直方图

Fig. 2 Frequency distribution of inter- and intra-specific Kimura 2-parameter (K2P) distance for candidate regions

显示, 候选片段都不存在像动物 COXI 基因的种内和种间分布那样明显的间隔区, 而是存在或多或少的重叠区。其中, psbA-trnH 的重叠度最小, 间隔区最大。但是其他引物序列片段的种内和种间遗传变异的分布并不存在明显的“barcoding gap”区。

2.4 物种分辨率

本研究采用 Tree-based 方法, 利用 NJ、UPGMA、ML 等不同建树方式, 建立多种系统发育

树, 检验每个物种的单系性。在所考察的 7 个通用条形码片段中, 基于 ML 树、UPGMA 树、NJ 树和贝叶斯树中, 各通用条形码片段及其条形码片段组合均不能区分所有种, 更无法准确辨别道地川芎及其混伪品物种。以保守位点较高 matK 条形码的 UPGMA 树 (图 3) 和 ML 树 (图 4) 为例, 道地川芎与其他物种混为一个分支, 物种分辨率低, 其他建树方法均支持这一结果。

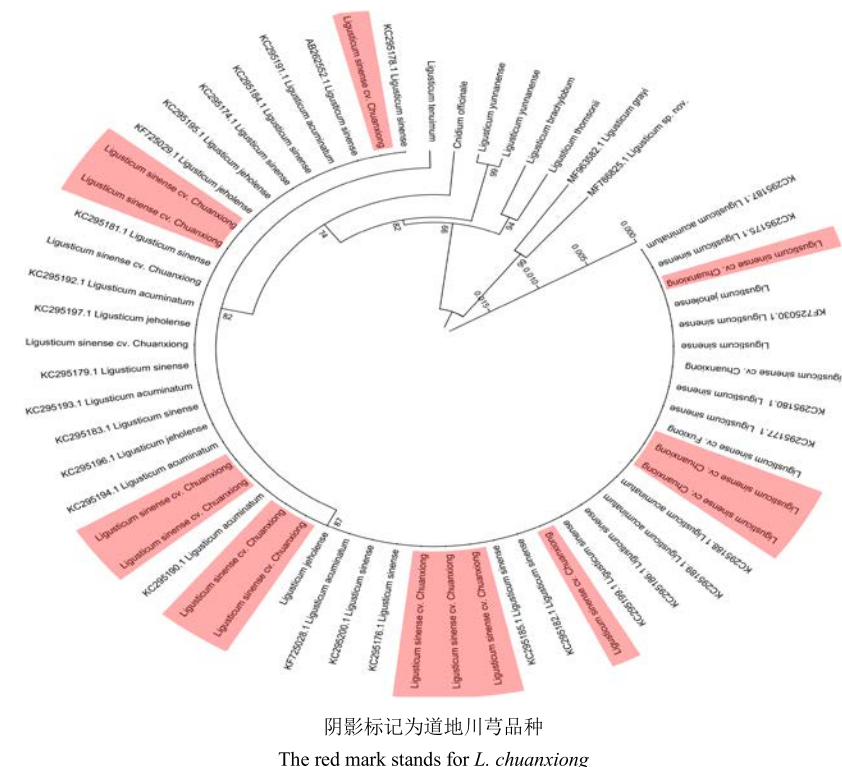
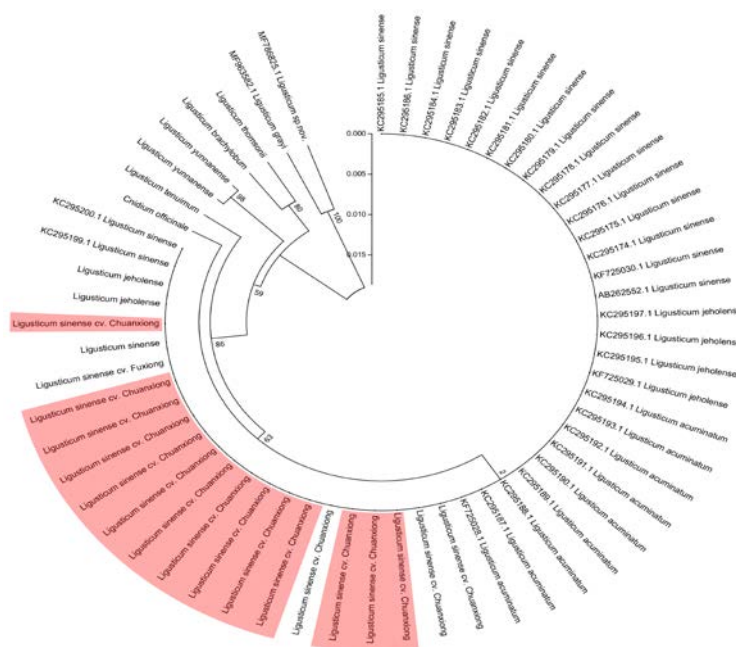


图 3 基于 K2P 距离的通用条形码 matK 矩阵得到的 UPGMA 树
Fig. 3 UPGMA tree based on K2P-distance of universal barcode matK

2.5 InDel 标记分析

从 24 对 InDel 引物中挑选出 23 对引物在 26 份藁本属材料都能产生清晰条带的引物。基于细叶

藁本叶绿体基因组新开发出的 InDel 引物位置 (图 5), 发现标记分布广泛, 覆盖了 LSC 区、SSC 区和 IR 区。InDel 引物详细信息见表 8。



阴影标记为道地川芎品种

The red mark stands for *L. chuanxiong*

图 4 基于 K2P 距离的通用条形码 matK 矩阵得到的 ML 树

Fig. 4 ML tree based on K2P-distance of universal barcode matK

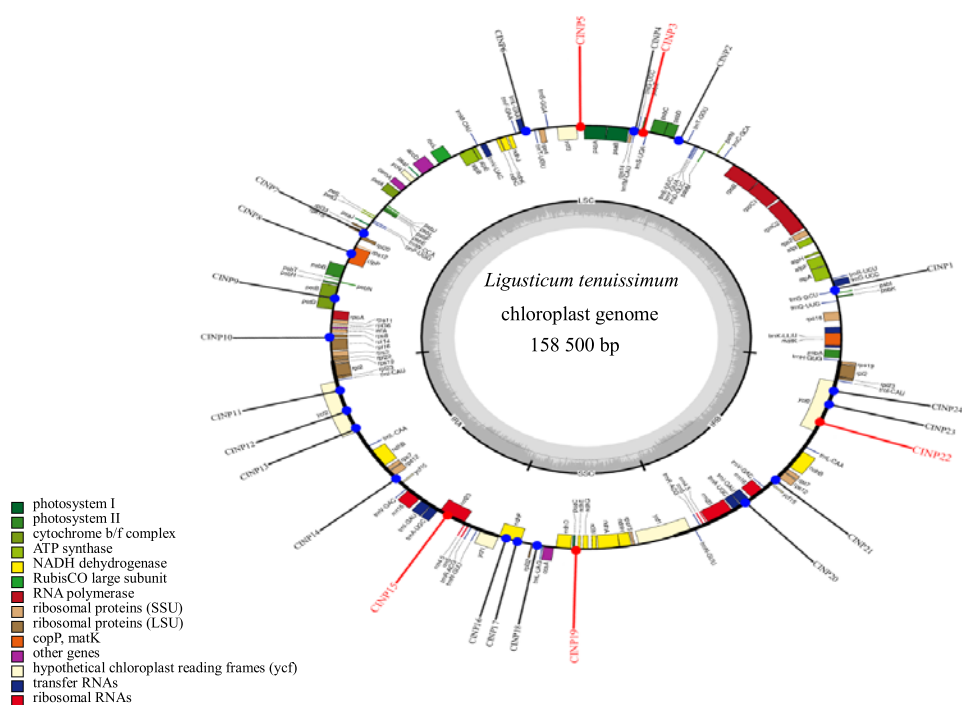


图 5 细叶藁本叶绿体基因注释及 InDel 标记位置

Fig. 5 Chloroplast genome map of *L. tenuissimum* and positions of InDel markers

表 8 InDels 引物信息

Table 8 Information of InDel primers

引物名称	插入/缺失位置	正向引物 (5'→3')	区域	反向引物 (5'→3')	温度/℃	产物长度/bp	基因类型	位置大小/bp
CINP3	插入	TCTGACACTGCACAACAGGA	LSC	CATCTTAGCGCGATAGCGGG	58	164	psbZ 到 tmG-UCC 之间	19
CINP5	插入	TTCTTGCCAGAGGAATGGTCC	LSC	GGTTGAAGATCACGAGGCGT	58	159	psaA 到 ycf3 之间	7
CINP19	插入	ACGTAGCAGACATGCGGATT	SSC	CGCTGAAGCCGCTATTGGA	58	183	psaC 到 ndhE 之间	5
CINP22	缺失	AAAGCACTCGCTTTTCGCTG	IRB	ACAGCCGTTCTAAACCCGAA	58	445	ycf15 到 ycf2 之间	1 403

2.6 毛细管电泳结果

利用毛细管电泳技术检测扩增产物,根据毛细管电泳的结果,设置相应的参数,校对电泳峰图,并读取有效峰值。将有效峰值转换为谱带的 0/1 系统进行记录,有带计为“1”,无带计为“0”。通过 NTSYSpc 2.10 软件对 26 份藁本属资源进行聚类分析。结果显示,在 4 对 InDel 引物 C1NP3、C1NP5、C1NP19、C1NP22 组合中,可以明显区分道地川芎及其混伪品为 2 个分支,26 份道地川芎及其混伪品的遗传相似系数在 0.37~1.00,表明品种间亲缘关系较为亲近。如图 6 所示,在相似系数为 0.43,供试的 26 份藁本属材料划分为 4 大类。其中第 1 类可分为 2 个亚类,A 类包括日本川芎、辽藁本、长茎藁本和云南川芎 2 号。B 类包括云南川芎 1 号、藁本、短片藁本、抚芎和云南红杆藁本。第 2 类包括甘肃川芎、辽藁本和云南绿杆藁本。第 3 类又分为 2 个亚类,A 类包括四川产川芎 18、45 号。B 类包括四川产川芎 44、46、47、48、49、50、51、52、53。第 4 类包括四川产川芎 42、43、54 号。

从聚类结果中可知,四川产川芎和其他藁本属材料可以明显分为2个分支。四川产川芎单独聚合

为一类, 遗传相似系数为 0.68。其他藁本属材料均聚合为一类, 遗传相似系数为 0.43, 其中日本川芎与辽藁本聚合为一个分支, 短片藁本、长茎藁本和云南川芎 2 号聚合为一个分支, 云南川芎 1 号、藁本、抚芎和云南红杆藁本聚合为一个分支, 从形态特征上看, 除了茎秆形状不同外, 其叶型具有很相似的形态特征。甘肃川芎、辽藁本和云南绿杆藁本聚合为一个分支, 亲缘关系较近。

3 讨论

3.1 DNA 通用条形码的评价

DNA 片段引物通用性是条形码评价的重要标准之一。本研究选用的 8 个 DNA 片段中, ITS2 引物通用性较低 (PCR 测序成功率最低)。这与辛天怡等的研究结果不同, 实验过程中虽采用了辛天怡等^[15]研究中的相同 ITS2 条形码序列, 但还是存在失败的测序结果。后面采用了多种 ITS2 条形码通用序列, 测序成功依旧很低, 与这可能是 DNA 的多态性, 不同的品种基因组 DNA 具有差异性, 拉取的这一段刚好存在碱基缺失等位点, PCR 产物自然就有多种类型, 测序出现重叠峰。将其克隆到载体上, 再进行测序。由于挑的是单菌落, 未出现重叠峰, 但是由于测出的样品序列大多都是同样的差异序列, 所以获得完整的 ITS2 引物序列的成功率较低。

通过对种内和种间遗传变异分布的分析, *psbA-trnH* 序列具有相对明显的“*barcoding gap*”, 但是其他叶绿体片段序列 *matK*、*rbcL*、*rpoB*、*rpoC1*、*ycf1*、*trnK* 的“*barcoding gap*”不明显。因此, 在物种分辨方面 *psbA-trnH* 条形码序列作为藁本属材料的 DNA 条形码具有明显的优势, 但是其较低的保守位点区域可能是其作为该属 DNA 条形码的主要限制因素^[23]。*matK*、*rbcL* 和 *trnK* 条形码序列的变异虽然小于 *psbA-trnH*, 但其较高的引物通用性和可作为该属的 DNA 条形码或条形码组合的一部分。*rpoB*、*ycf1*、*rpoC1* 序列的变异小于 *psbA-trnH*, 但是片段长度变异较大, 含有多个插入缺失位点,

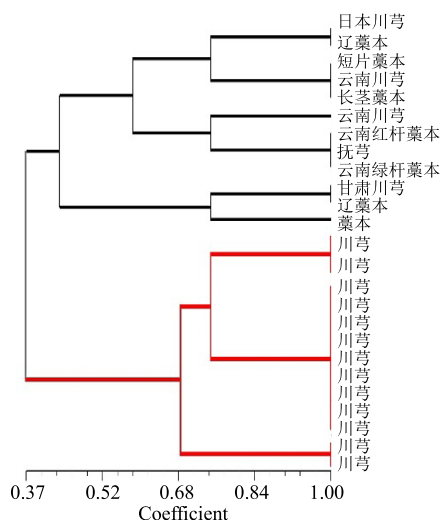


图 6 道地川芎及其混伪品种的聚类图

Fig. 6 Dendrogram of *L. chuanxiong* and its adulterants

可能会对序列比对造成困难,但利用好插入缺失位点会帮助对物种的鉴定^[24]。

3.2 基于 InDel 标记的道地川芎及其混伪品的遗传多样性和亲缘关系

在分子标记研究遗传多样性实验中,遗传相似系数的变化范围越大,说明群体的遗传分化就越大,群体的遗传多样性也就越高。有学者采用 ISSR 标记对 285 份川芎种质资源进行分析,发现川芎具有较高的遗传多样性^[25]。还有学者采用 AFLP 标记和 ISSR 标记对 3 个产地的川芎种质资源进行分析,发现 3 个产地的川芎材料群体遗传分化大,但群体间亲缘关系近^[26]。本研究利用 24 对 InDels 标记对 26 份藁本属材料进行了分子标记的统计及聚类分析,确定了其中 4 对 InDel 引物在藁本属材料间存在一定程度的遗传分化,并且藁本属材料间的亲缘关系较近。

川芎为常用中药材,有悠久的栽培和使用历史,中药藁本属植物自古就有争议,藁本属中部分属下的种间亲缘关系,种级界限、进化关系等方面还不完善,导致川芎与其混伪品之间的系统发育存在争议。

在本研究聚类树状图中,日本川芎与辽藁本聚为一个分支,日本川芎的原产地、外观形态均与辽藁本类似。研究把日本川芎在分类学上最早被归于山芎属 *Conioselinum* DC. *Cnidium officinale* 由牧野富太郎定名^[27]。北川政夫根据日本川芎形态近于中国东北的辽藁本 *Ligusticum jeholense* Nakai et Kitagawa, 重新命名为 *Cnidium officinale*^[28]。更有研究比较了日本川芎、川芎和藁本的染色体核形,支持将其从蛇床子属移至藁本属^[29]。辽藁本也有可能是川芎、尤其是非主栽川芎种质的野生种源。一般来说,形态特征相似的品种之间具有较近的亲缘关系,如短片藁本、云南川芎 2 号和长茎藁本,云南产川芎从叶型上来说更接近藁本。但云南川芎 1 号、藁本、抚芎和云南红杆藁本,其形态特征和产地各有特点,经分析聚为一个分支。另外,甘肃川芎、辽藁本和云南绿杆藁本聚为一个分支,而研究发现甘肃川芎又被称为西芎,本草中记载的西芎原植物应为藁本。有学者将四川川芎引种到甘肃华亭后,观察到其地下和地上形态均变得与藁本极为相似,认为西芎与川芎相比,在形态、形状上酷似藁本,其粉末特征、化学成分与川芎一致,与藁本差异较小,提示二者之间可能有更近的亲缘关系——

西芎可能是川芎引种到甘肃后的变种,川芎也可能是西芎引种到四川后的变种^[30]。从遗传相似系数可知,四川产川芎聚为一个分类,其遗传相似系数高达 0.70,高于其他藁本属材料。表明四川产川芎之间具有更独特的亲缘关系。在四川产川芎分类中,不同的四川产川芎材料聚为不同的分支,由于本次研究的所用引物较多,导致聚类分析中不同的四川产川芎材料遗传关系分散。

在藁本属植物中,川芎与藁本的亲缘关系最近,但是对于通用条形码的研究很少,使用的条形码较为单一,所以对藁本属种质资源进行深入分子遗传研究,对于藁本属植物研究开发 InDel 分子标记和应用,有利于利用分子标记手段改良提高产量和品质。四川产川芎药效含量高,品质佳,再加上市场川芎混伪品泛滥,InDel 分子标记技术为鉴定道地川芎种类提供了有效手段。同时药材的道地性具有丰富的遗传特质,InDel 分子标记技术与药用植物有效成分含量结合的研究方法将为以后道地性研究提供思路。

参考文献

- [1] 刘彩霞,廖梦霞,邓天龙. 川产道地药材川芎的品种和质量 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 2-4.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 高婷,姚辉,陈士林. 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, 12(2): 418-423.
- [4] Kendo K, Terabayashi S, Okada M, et al. Phylogenetic relationships of medicinally important *Cnidium officinale* and Japanese Apiaceae based on rbcL sequences [J]. *Plant Res*, 1996, 109(1): 21-27.
- [5] 单锋,郝近大. 川芎的本草源流考 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(16): 2306-2310.
- [6] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J R, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [7] Laurence P, Jason G, Cory S, et al. DNA barcoding and the mediocrity of morphology [J]. *Mol Ecol Res*, 2009, 9(1): 42-50.
- [8] 候勤曦,慈秀芹,刘志芳. 基于 DNA 条形码评估西双版纳国家级自然保护区对樟科植物进化历史的保护 [J]. 生物多样性, 2018, 26(3): 217-228.
- [9] 魏亚男,王小梅,姚鹏程. 比较不同 DNA 条形码对中国海岸带耐盐植物的辨识率 [J]. 生物多样性, 2017, 25(10): 1095-1104.

- [10] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): 8613.
- [11] 殷秀梅, 罗焜, 刘美子. 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.
- [12] 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.
- [13] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for landplant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19451-19452.
- [14] 刘玉萍, 曹晖, 韩桂茹. 中日产川芎的 matK、ITS 基因序列及其物种间的亲缘关系 [J]. 药学学报, 2002, 37(1): 63-68.
- [15] 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.
- [16] Shu Z, Hirotoishi F, Han G R, *et al.* Molecular identification of “Chuanxiong” by nucleotide sequence and multiplex single base extension analysis on chloroplast trnK gene [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(3): 527-531.
- [17] John K, David E. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): 508.
- [18] Mehrdad H, Daniel H J, John M B, *et al.* DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 1(4): 968-971.
- [19] Yang M, Zhang X W, Liu G M, *et al.* The complete chloroplast genome sequence of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) [J]. *Annals Bot*, 2010, 86(4): 859-909.
- [20] 吴磊, 王丹, 苏文悦. 利用比较基因组学开发山羊草属 InDel 分子标记 [J]. 作物学报, 2012, 38(7): 1334-1338.
- [21] 张体付, 葛敏, 韦玉才. 玉米功能性 Insertion/Deletion 分子标记的挖掘及其在杂交种纯度鉴定中的应用 [J]. 玉米科学, 2012, 20(2): 64-68.
- [22] 初志战, 郭海滨, 曾栋昌, 等. 籼粳稻基因组 295 个 InDel 标记的开发 [J]. 作物学报, 2016, 42(6): 932-941.
- [23] Goremykin V V, Holland B, Hirsch-Ernst K I, *et al.* Analysis of *Acorus calamus* chloroplast genome and its phylogenetic implications [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 6(22): 1813-1822.
- [24] Rogers M B, Gilson P R, Su V, *et al.* The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte bigelowiella natans: Evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts [J]. *Mol Biol Evol*, 2006, 5(24): 54-62.
- [25] 王岚, 肖海波, 马逾英. 川芎道地性的 ISSR 分析 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45(6): 1472-1476.
- [26] 陈要臻, 王岚, 唐琳. 利用 ISSR 和 AFLP 两种分子标记技术研究川芎遗传多样性 [A] // 中华中医药学会药用植物化学与中药有效成分分析论文集 (下) [C]. 深圳: 中华中医药学会, 2008.
- [27] 刘圆, 贾敏如. 山川芎与川芎药材质量研究 [J]. 中药材, 2003, 26(9): 623-625.
- [28] Nafio T, Ikeya Y. Two phthalides from *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 233.
- [29] 张海道. 常用中药材品种整理和质量研究 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(6): 132-160.
- [30] 王伯崇. 西芎的考察 [J]. 中草药, 1986, 17(8): 34.