

• 药材与资源 •

基于 DNA 条形码的多花黄精系统发育和变异位点分析研究

周先治^{1,2}, 饶宝蓉³, 高 晖¹, 陈 阳¹, 林永胜¹

1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003

2. 农业农村部福州热带作物科学观测实验站, 福建 福州 350003

3. 福建省南平市农业科学研究所, 福建 南平 354200

摘要:目的 对来自不同地域的多花黄精野生资源的核糖体内转录间隔区 2(internal transcribed spacer 2, ITS2)和 psbA-trnH 基因间隔区序列进行系统发育分析, 探索不同地理来源的多花黄精资源的遗传多样性和亲缘关系。方法 用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的方法扩增获得多花黄精 ITS 和 psbA-trnH 的核酸序列, 与美国国家技术信息中心(NCBI)相对应的核酸序列比对获得多花黄精 ITS2 和 psbA-trnH 核酸序列。用邻接法(Neighbor joining)构建系统发育树, 用 Kimura two-parameter (K2-P)模型分析遗传距离, 用 Mega 和 DNAMAN 软件进行多重比对分析。结果 安徽青阳样品的 ITS2 序列为 224 bp, 其余 24 份样品的 ITS2 序列均为 225 bp, 福建泰宁的 1 份样品为 620 bp, 其余 24 份多花黄精样品的 psbA-trnH 序列均为 621 bp, 2 个序列分别存在 7 个和 4 个变异位点。采用 ITS2 序列构建的系统发育树将 25 份资源分为 2 个大的类群, 湖南和贵州的 5 份资源种群聚为一类, 其他 20 份资源聚为一类, 遗传距离显示来自贵州花溪、剑河的样品和来自福建建阳的遗传距离最大; 采用 psbA-trnH 序列构建的系统发育树则无法将不同地域多花黄精资源区分开。结论 系统发育和变异位点分析为多花黄精资源的进化研究、道地性评价奠定了理论基础, 变异位点的分析可用于相关资源的鉴定。

关键词: 多花黄精; ITS2; psbA-trnH; 系统发育; PCR; 遗传多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)15-4003-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.15.020

Phylogenetic and mutation point analysis of DNA barcoding sequences in *Polygonatum cyrtonema*ZHOU Xian-zhi^{1,2}, RAO Bao-rong³, GAO Hui¹, CHEN Yang¹, LIN Yong-sheng¹

1. Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

2. Fuzhou Tropical Crop Scientific Observation Experimental Station, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fuzhou 350003, China

3. Nanping Institute of Agricultural Sciences of Fujian Province, Nanping 354200, China

Abstract: Objective In this work, phylogenetic analysis was used to compare the ITS2 and psbA-trnH sequences of *Polygonatum cyrtonema* samples from different geographical sources, so as to explore the genetic diversity and genetic relationship of these resources. **Methods** PCR method was used to amplify the regions of ITS and psbA-trnH, and the sequences of ITS2 and psbA-trnH were obtained after the amplified fragment sequences were blasted in NCBI database. The neighbor joining (NJ) and maximum parsimony (MP) methods were used to construct phylogenetic trees and Kimura two-parameter (K2-P) model was used to calculate the genetic distance of different samples. Mega and DNAMAN softwares were applied for multiple alignment of ITS2 and psbA-trnH sequences of 25 samples of *P. cyrtonema*. **Results** The lengths of ITS2 and psbA-trnH sequences of Anhui Qingyang and Fujian Taining samples of *P. cyrtonema* were 224 bp and 620 bp, respectively. The lengths of ITS2 and psbA-trnH of the remaining 24 samples were 225 bp and 621 bp, respectively. ITS2 and psbA-trnH had seven and four mutation points, respectively. These 25 samples were clustered into two groups based on ITS2 sequences. Five samples in Hunan and Guizhou were clustered into one group, while the other 20 samples were clustered into another group. The genetic distance showed that the samples from Huaxi and Jianhe in Guizhou Province and Jianyang in Fujian Province had the largest genetic distance. Phylogenetic tree constructed by psbA-trnH sequences were

收稿日期: 2019-12-10

基金项目: 福建省农业科学院药用植物创新团队项目(STIT2017-2-8); 热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室开放课题(1630052017020-3); 工信部中药材生产基地建设项目“多花黄精规范化种植及野生抚育产业基地建设”

作者简介: 周先治(1976—), 助理研究员, 主要从事中药材种植方面研究。Tel: (0591)87410081 E-mail: xianzhizhou@126.com

unable to distinguish 25 samples from different geographical sources. **Conclusion** Phylogenetic and mutation analysis will provide the theoretic foundation to utilize the resources of *P. cyrtoneuma*, investigate their evolution, and evaluate their genuineness. The results of mutation point will also be used in the identification of related *P. cyrtoneuma* resources.

Key words: *Polygonatum cyrtoneuma* Hua; ITS2; psbA-trnH; phylogenetics; PCR; genetic diversity

多花黄精 *Polygonatum cyrtoneuma* Hua 为百合科黄精属植物, 是《中国药典》2015 年版药材黄精的基原物种之一^[1]。肥厚的地下根茎为多花黄精主要药用部位, 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾等功效, 是酒黄精炮制和保健品的主要原料。黄精多糖是其主要的化学成分, 许多研究表明黄精多糖具有抗肿瘤、抗衰老、抗病毒、抗菌以及降血糖、调血脂和预防动脉硬化的功效^[2-5]。多花黄精是药食两用的多年生草本植物, 为我国大宗传统药材, 主要分布于我国的贵州、四川、广西、湖南、湖北、河南、江苏、浙江、安徽、江西、福建等地区。多花黄精遗传多样性方面的研究较少, 李金花等^[6]研究了安徽省的琅琊山、天堂寨、九华山、黄山、绩溪 5 个居群的多花黄精叶片组织结构, 发现不同居群的叶表皮特征存在一定差异, 叶肉的构成、内含物、气孔器类型、表皮细胞形成等可作为分类依据, 具有种间稳定性。蒋燕锋等^[7]收集了浙江省各县市及湖北、安徽的 17 份多花黄精资源, 发现不同地域多花黄精的生长期、株高、地下根茎生长量、根茎多糖含量及生态习性方面存在显著差异。徐惠龙等^[8]采用简单序列间扩增多态性技术 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 研究了福建省不同地域多花黄精的遗传多样性, 发现黄精种质的亲缘关系远近不全由地理距离决定, 还可能与地形、气候、海拔等因素有关。张恒庆等^[9]采用 ISSR 技术分析了大连地区黄精和多花黄精的遗传多样性, 发现黄精和多花黄精种群均具有较高的遗传多样性, 但黄精种群遗传多样性明显低于多花黄精。周新华等^[10]对野生多花黄精种群表型变异进行了研究, 发现种群内变异是多花黄精变异的主要来源, 随着经度的增加, 多花黄精的性状变异呈减小趋势, 但不同种群表型性状的聚类与地理距离无关联性。

多花黄精产品主要以野生资源为主, 质量参差不齐, 长期依赖野生资源导致多花黄精资源的枯竭和破坏, 为保护野生资源, 提高多花黄精的产量和质量, 人工林下栽培是多花黄精资源可持续利用的有效途径。为此本项目组从福建、江西、安徽、浙江、湖南、湖北等多花黄精主要分布区域收集多花黄精资源 25 份, 拟采用中药材资源评价中广泛应

用的核糖体内转录间隔区 Internal Transcribed Spacer (ITS) 和叶绿体 psbA-trnH 间隔区 2 个 DNA 条形码序列^[11-13], 对不同地域来源的多花黄精资源开展遗传多样性研究, 为优质种源鉴定和筛选奠定理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

25 份多花黄精样品采自福建、江西、安徽、浙江、贵州和广东等多花黄精分布区域, 均为野生样品的新叶或新鲜根茎, 经福建省农科院陈敏健副研究员鉴定为多花黄精 *Polygonatum cyrtoneuma* Hua。具体的采集地、海拔及经纬度信息见表 1。

1.2 试剂与仪器

冷冻离心机 (Sigma 3K15, 德国 Sigma 公司); 手掌型离心机 (LX-100, 日本松下公司); PCR 仪 (LifeECO, 杭州博日科技有限公司); 全自动凝胶成像系统 (D-56-26.M, 法国 UVITEC 公司); 电泳仪 (Power B PP-1150, 北京凯元信瑞仪器有限公司)。

引物由铂尚生物技术 (上海) 有限公司合成; 琼脂糖、Rnase 酶、Premix TaqTM、pMD-19 克隆载体购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; GOLDVIEW 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; M5 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒购自北京聚合美生物科技有限公司; 酵母提取物、胰蛋白胨、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、凝胶 DNA 回收试剂盒、4X Tris-HCl/SDS 缓冲液 (pH 6.8) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

2 方法

2.1 总 DNA 提取及 PCR 扩增

取新鲜的多花黄精根茎或叶片 0.5 g, 按照基因组试剂盒说明提取总 DNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像并保存。ITS2 序列扩增: 正向引物 ITS2 F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', 反向引物 ITS2 R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACA-3'。ITS2 的 PCR 反应条件为 95 °C 预变性 1 min, 98 °C 变性 10 s, 退火温度 55 °C、30 s, 72 °C 延伸 30 s、34 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。psbA-trnH 扩增: 正向引物 psbA F: 5'-GTTATGCATGAACGTAATG-

表 1 材料信息

Table 1 Material information of *P. cyrtoneura*

编号	样品	采集地	纬度	经度	海拔/m	ITS2 序列号	psbA-trnH 序列号
1	FJGZ	福建光泽	27.599 180	117.345 930	616	MK397054	MK463559
2	FJJY	福建建阳	27.391 160	117.841 360	515	MK397055	MK463560
3	FJTN1	福建泰宁	26.917 800	117.014 190	692	MK397056	MK463561
4	FJTN2	福建泰宁	26.001 490	117.142 250	634	MK397057	MK463562
5	FJTN3	福建泰宁	27.085 900	117.102 420	662	MK397058	MK463563
6	FJJL1	福建将乐	26.966 990	117.440 250	703	MK397059	MK463564
7	FJJL2	福建将乐	26.879 960	117.437 530	564	MK397060	MK463565
8	FJYX	福建尤溪	26.170 040	118.190 490	565	MK397061	MK463566
9	FJYD	福建永定	24.445 520	116.859 860	602	MK397062	MK463567
10	FJSX	福建沙县	26.516 240	117.593 720	583	MK397063	MK463568
11	JXJA	江西靖安	28.858 530	114.913 780	1 513	MK397064	MK463569
12	JXLA	江西乐安	27.256 180	115.975 320	605	MK397065	MK463570
13	JXZX	江西资溪	27.705 940	117.061 010	526	MK397066	MK463571
14	JXSY	江西上犹	25.956 620	114.086 100	620	MK397067	MK463572
15	ZJSC	浙江遂昌	28.542 280	119.236 210	902	MK397068	MK463573
16	AHQY	安徽青阳	30.477 472	117.815 236	702	MK397069	MK463574
17	HBTS	湖北通山	29.606 380	114.482 760	754	MK397070	MK463575
18	HBYA	湖北远安	31.180 660	111.415 430	582	MK397071	MK463576
19	HBMC	湖北麻城	31.173 330	115.008 690	543	MK397072	MK463577
20	HNHJ	湖南洪江	27.074 300	109.643 620	708	MK397073	MK463578
21	HNZX	湖南资兴	25.962 970	113.258 670	518	MK397074	MK463579
22	HNXN	湖南新宁	26.455 980	110.643 210	796	MK397075	MK463580
23	GZHX	贵州花溪	26.390 671	106.676 271	1 092	MK397076	MK463581
24	GZJH	贵州剑河	26.624 770	108.536 280	739	MK397077	MK463582
25	GDLN	广东连南瑶族自治县	24.723 730	112.293 610	1 011	MK397078	MK463583

CTC-3', 反向引物 trnH R: 5'-CGCGCATG-GTGGATTCAACAATCC-3'。psbA-trnH 的 PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 之后进入下一循环, 94 °C、30 s, 57 °C、30 s, 72 °C、60 s, 40 个循环后 72 °C 延伸 10 min。扩增体系均为 20 μL, 正、反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, Premix TaqTM 10 μL, ddH₂O 补齐。扩增产物于 4 °C 保存。1.0% 琼脂糖凝胶于 110 V 电泳 40 min, 用凝胶成像采集系统采集图片。

2.2 目的 DNA 片段的测序

用 UNIQ-10 柱式微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化 PCR 产物中的目的 DNA 片段, 纯化后 DNA 片段连接到 pMD-19 载体构建重组质粒, 并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑选单克隆菌斑由铂尚生物科技有限公司进行双向测序。

2.3 DNA 序列分析

所得序列采用 BLAST 工具在 NCBI 数据库上与黄精有关序列进行比对, 确定序列的可靠性, 其中 ITS2 的参考序列为 KX375075, psbA-trnH 的参考序

列为 KJ745884。利用 MEGA 6.0 软件做 ClustalW 多序列比对, 用 Kimura 2-Parameter (K2-P) 法计算不同多花黄精样品 ITS2 和 psbA-trnH 序列的遗传距离, 以滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl 的 ITS2 序列和 psbA-trnH 序列为系统发育树外群, 以 NJ 法构建系统聚类树。用 Mega 和 DNA man 软件对不同样品多花黄精的 ITS2 和 psbA-trnH 序列进行多重比对。

3 结果与分析

本研究分别扩增了 25 份多花黄精资源的 ITS 序列和 psbA-trnH 区段 DNA 序列。ITS2 序列包括部分 5.8 S rRNA 序列+ITS2 序列+部分 28 S rRNA 序列, psbA-trnH 序列包括 psbA 基因全长+psbA-trnH 间区全长+trnH 基因全长。参照 KX375075 和 KJ745884 序列提取 25 个样品的 ITS2 和 psbA-trnH 序列后进行分析, 安徽青阳样品的 ITS2 序列和 psbA-trnH 序列分别为 224 bp 和 620 bp, 其余 24 个样品的 ITS2 序列和 psbA-trnH 序列分别为 225 bp 和 621 bp。这些样品的 ITS2 序列和 psbA-trnH 序列在 G+C 含量方面较为接近 (表 2)。

表 2 25 个多花黄精样品的 ITS2 和 psbA-trnH 序列长度和碱基分布频率

Table 2 Length and base pair frequency in ITS2 and psbA-trnH sequences from 25 samples of *P. cyrtoneura*

编号	ITS2		psbA-trnH	
	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%
1	225	80.00	621	35.43
2	225	80.00	621	35.27
3	225	80.00	621	35.43
4	225	80.00	621	35.43
5	225	80.00	621	35.43
6	225	80.00	621	35.43
7	225	80.00	621	35.43
8	225	80.00	621	35.43
9	225	80.00	621	35.43
10	225	80.00	621	35.43
11	225	80.00	621	35.43
12	225	80.00	621	35.43
13	225	80.00	621	35.43
14	225	79.56	621	35.43
15	225	79.56	621	35.43
16	224	79.46	620	35.48
17	225	79.56	621	35.43
18	225	79.56	621	35.43
19	225	79.56	621	35.43
20	225	79.56	621	35.43
21	225	79.56	621	35.43
22	225	79.56	621	35.43
23	225	79.56	621	35.43
24	225	79.56	621	35.27
25	225	80.00	621	35.43

以滇黄精 ITS2 序列和 psbA-trnH 序列为外群, 用邻接法基于 ITS2 序列和 psbA-trnH 序列构建系统发育树 (图 1)。结果显示, ITS2 序列可将 25 份多花黄精资源分为 2 个大的类群, 其中来自湖南洪江、新宁和资兴的样品和来自贵州花溪、剑河的样品组成一个类群, 其中贵州剑河和花溪的样品又组成一个小的类群; 其余 20 份资源组成另一个大的类群, 其中湖北通山、雅安和麻城的样品组成一个小的类群, 安徽青阳和浙江遂昌的样品组成一个小的类群, 其余的来自福建、江西和广东的 15 个样品则无法区分开, 基于 ITS2 序列构建的系统树显示出多花黄精资源具有地理遗传多样性。基于 psbA-trnH 序列构建的系统发育树则无法将 25 个样品区分开, 但来自贵州剑河、福建泰宁和福建建阳的样品同其他 22 个样品具有一定差异。相对 psbA-trnH 序列, ITS2 序列构建的系统发育树对不同地域来源的多花黄精样品区分度更好。



图 1 基于 ITS2 (A) 和 psbA-trnH (B) 序列的多花黄精资源的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of *P. cyrtoneura* based on ITS2 (A) and psbA-trnH (B) sequences

对 25 个多花黄精样本之间的遗传距离进行分析 (表 3 和 4), 发现不论 ITS2 序列还是 psbA-trnH 序列, 这些样本的遗传距离均较小, 尤其是 psbA-trnH 序列。对于 ITS2 序列, 福建光泽、福建泰宁、福建将乐、福建永定、福建尤溪和广东连南的 9 个样品间的遗传距离为 0, 贵州花溪和贵州剑河的样品遗传距离为 0, 湖北通山、雅安和麻城的 3 个样品遗传距离为 0, 湖南洪江和湖南新宁的样品遗传距离为 0, 江西靖安和江西乐安的遗传距离为 0, 贵州花溪、剑河和福建建阳的遗传距离最大为 0.013。对于 psbA-trnH 序列, 安徽青阳和福建建阳、福建泰宁 3、贵州剑河 3 个样品的遗传距离最大为 0.002。

对 25 个样品的 ITS2 序列进行分析, 发现 ITS2 序列存在 7 个变异位点, 安徽青阳样品的碱基“G”缺失, 安徽青阳样品与其他 24 个样品之间的“C”-“T”碱基互换, 贵州花溪、贵州剑河、湖南洪江、湖南新宁、

表 3 25 个多花黄精样本 ITS2 序列的 K2-P 模型遗传距离

Table 3 K-2-P model genetic distances of ITS2 sequences among 25 samples of *P. cyrtoneura*

样品	AHQY	FJGZ	FJL1	FJL2	FJYJ	FJSX	FJTN1	FJTN2	FJTN3	FJYD	FJYX	GDLN	GZHX	GZJH	HBMC	HBTS	HBYA	HNHJ	HNXN	HNZX	JXJA	JXLA	JXSJ	JXZX	ZISC
AHQY	0.000																								
FJGZ	0.004	0.000																							
FJL1	0.004	0.000	0.000																						
FJL2	0.004	0.000	0.000	0.000																					
FJYJ	0.009	0.004	0.004	0.004	0.000																				
FJSX	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000																			
FJTN1	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000																		
FJTN2	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000																	
FJTN3	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000																
FJYD	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000															
FJYX	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000														
GDLN	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
GZHX	0.014	0.009	0.009	0.009	0.013	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000												
GZJH	0.014	0.009	0.009	0.009	0.013	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000	0.000											
HBMC	0.009	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.013	0.013	0.000										
HBTS	0.009	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.013	0.013	0.000	0.000									
HBYA	0.009	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.013	0.013	0.000	0.000	0.000								
HNHJ	0.009	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.009	0.009	0.009	0.000							
HNXN	0.009	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.009	0.009	0.009	0.000	0.000						
HNZX	0.009	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.009	0.009	0.009	0.000	0.000	0.000					
JXJA	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000			
JXLA	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000		
JXSJ	0.009	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.013	0.013	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.004	0.004	0.000		
JXZX	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.004	0.000	
ZISC	0.004	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.013	0.013	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.004	0.004	0.009	0.004	0.000

表 4 25 个多花黄精样本 psbA-trnH 序列的 K2-P 模型遗传距离

Table 4 K-2-P model genetic distances of psbA-trnH sequences among 25 samples of *P. cyrtoneura*

样品	AHQY	FJGZ	FJL1	FJL2	FJYJ	FJSX	FJTN1	FJTN2	FJTN3	FJYD	FJYX	GDLN	GZHX	GZJH	HBMC	HBTS	HBYA	HNHJ	HNXN	HNZX	JXJA	JXLA	JXSJ	JXZX	ZISC
AHQY	0.000																								
FJGZ	0.000	0.000																							
FJL1	0.000	0.000	0.000																						
FJL2	0.000	0.000	0.000	0.000																					
FJYJ	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000																				
FJSX	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000																			
FJTN2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000																		
FJTN1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000																	
FJTN3	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.000																
FJYD	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000															
FJYX	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000														
GDLN	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000													
GZHX	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000												
GZJH	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000											
HBMC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000										
HBTS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
HBYA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000								
HNHJ	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000							
HNXN	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
HNZX	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
JXJA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
JXSJ	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
JXLA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
JXZX	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
ZISC	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

湖南资兴等 5 个样品和其余 20 个样品之间的“A”-“C”碱基互换，湖南洪江、湖南新宁和湖南资兴等 3 个样品和其余 22 个样品之间的“T”-“C”碱基互换，江西上犹和其余 24 个样品间的“T”-“C”碱基互换，浙江遂昌和其余 24 个样品间的“T”-“C”碱基互换（图 2）。对 25 个样品的 psbA-trnH

序列进行分析，发现 psbA-trnH 序列存在 4 个变异位点，贵州剑河样品和其余 24 个样品间的“T”-“C”碱基互换，福建泰宁 FJTN3 样品和其余 24 个样品间的“G”-“C”碱基互换，安徽青阳样品的碱基“T”缺失，福建建阳样品和其余 24 个样品间的“T”-“C”碱基互换（图 3）。

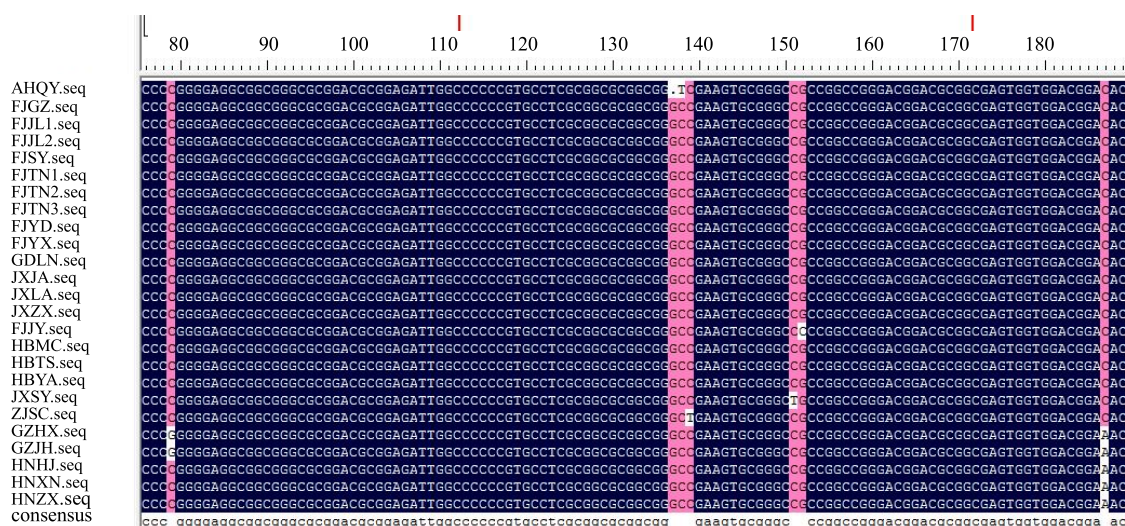


图 2 25 个多花黄精样本的 ITS2 序列多重比对结果

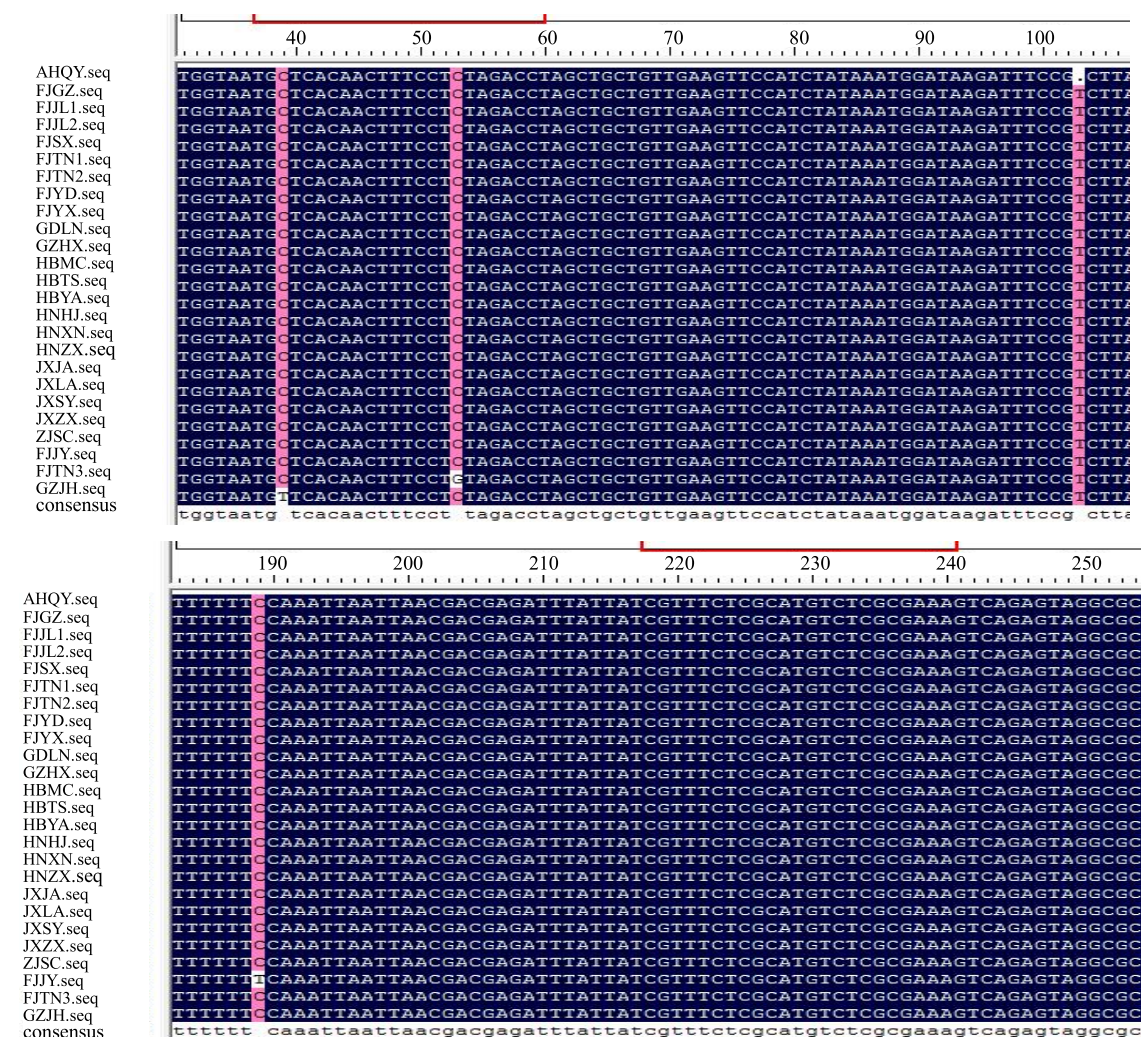
Fig. 2 Mutiple alignment of ITS2 sequences from 25 samples of *P. cyrtoneura*

图 3 25 个多花黄精样本的 psbA-trnH 序列多重比对结果

Fig. 3 Mutiple alignment of psbA-trnH sequences from 25 samples of *P. cyrtoneura*

4 讨论

药材的道地性是一项辨别优质中药材的独特综合标准,对中药资源的利用具有至为重要的意义,过去对中药材道地性的研究主要停留在产地、性状和生态环境等方面,其本质及规律性方面的研究还不够深入。随着分子生物技术的发展,目前,许多学者采用分子手段评价道地药材^[14-16]。植物 DNA 条形码技术已广泛应用于中药材种质资源评价^[17]、中药材鉴别^[18-20]、中药材种子识别^[21]、中药材系统发育^[22-23]等方面研究。中国中医科学院中药研究所建立了中药材 DNA 条形码鉴定系统 <http://www.tcmbarcode.cn/china/>,中药材 DNA 条形码鉴定系统的建立对于药材研究和创新利用具有重要意义,可作为中药材 4 大经典鉴定方法(原植物、性状、显微、理化)的有效补充;有利于实现中药基原鉴定的标准化、中药新资源的开发利用、中药资源的多样性研究和中药材流通的数据化管理。

多花黄精作为传统中药材在中国分布广泛,但缺乏道地产区的认证,导致种质资源参差不齐,对于多花黄精资源的系统评价对于这一传统中药资源的优良种质选育和推广种植具有重要意义。本研究将 DNA 条形码技术应用于多花黄精资源的系统发育研究。扩增了 ITS2 和 psbA-trnH 2 个中药材 DNA 条形码鉴定系统推荐并常用的 DNA 序列,用系统发育方法分析来自不同区域的 25 个多花黄精样本。ITS2 序列聚类结果显示,25 份多花黄精资源可分为 2 个大的类群,来自较低经度的湖南和贵州的 5 份资源聚为一类,其余 20 份资源聚为一类,聚类结果显示多花黄精资源具有一定地理遗传多样性,如贵州剑河和花溪的样品聚为一个小类群,湖北通山、雅安和麻城的样品组成一个小的类群,这说明在生境相似、地理位置相近的区域多花黄精亲缘关系近。但聚类结果无法将福建、安徽、江西和广东的多花黄精样品区分开,这说明多花黄精资源间亲缘关系的远近不完全由地理距离决定,这与周新华等^[10]研究结果相似。多花黄精生长于阴凉、潮湿的林下、灌木丛和山阴坡处,福建、安徽、江西和广东等多花黄精来源地的生境相似,这种选择性的生境与地理位置改变关系不大,这说明生境对多花黄精遗传多样性具有显著影响,具体机制还有待深入研究。对多花黄精的 psbA-trnH 序列的聚类结果则无法将 25 份资源区分开,可将多花黄精和滇黄精区分开,这说明 psbA-trnH 片段在多花黄

精种内较为保守,可以作为多花黄精种判别的一个有效补充序列。

本研究对 25 份多花黄精资源的 DNA 条形码聚类分析和遗传多样性研究,同一类群内的不同来源的样本之间的遗传距离很小,甚至样本间没有遗传差异,这说明同一类群样本的种质较为一致。聚类结果发现,ITS2 序列比 psbA-trnH 序列具有更高的区分度,这可能是由于 ITS2 序列比 psbA-trnH 序列具有更快的进化速率,因此 ITS2 序列更准确反映多花黄精的进化状态。结果说明 ITS2 序列更为适合多花黄精资源的鉴定。ITS2 符合理想条形码的规定,片段较短,易于扩增和测序,种间差异大^[24]。因此,中药材 DNA 条形码系统中将 ITS2 序列作为中药材鉴定的核心序列。

遗传漂变可导致种群间明显的遗传分化,不同地域的种群,在进化中固定了不同的等位基因,导致较大比例的遗传多样性存在于不同的种群间^[25]。以多花黄精 ITS2 序列突变位点来看,安徽青阳样品的碱基“G”缺失和“C”-“T”碱基互换,贵州剑河和花溪样品的“G”-“C”碱基互换,浙江遂昌样品的“T”-“C”碱基互换,贵州花溪、贵州剑河、湖南洪江、湖南新宁、湖南资兴等样品的“A”-“C”碱基互换;安徽青阳样品的 psbA-trnH 序列碱基缺失,这些变异与多花黄精的地域分布有一定关系。生境可能对多花黄精的遗传变异具有影响,福建建阳样品生长在竹林下,竹林地的土壤相对较为贫瘠,而江西上犹样品采自阴坡地,周边温泉丰富,这两地样品的 ITS2 或 psbA-trnH 序列发生碱基突变与生境是否有关还有待研究。有关地域和生境对多花黄精遗传变异的影响,还需要采集更多样品和多 DNA 片段进一步验证。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 罗敏,章文伟,邓才富,等. 药用植物多花黄精研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(6): 1467-1469.
- [3] 何连军,干雅平,吕伟德,等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定多花黄精多糖的单糖组成 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1671-1676.
- [4] 陶爱恩,张晓灿,杜泽飞,等. 黄精属植物中黄酮类化合物及其药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(9): 2163-2171.
- [5] 赵文丽,赵 晔, Tseng Y. 黄精药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4439-4445.

- [6] 李金花, 周守标, 王 影, 等. 多花黄精五个居群叶片的比较解剖学研究 [J]. 广西植物, 2007, 27(6): 826-831.
- [7] 蒋燕锋, 刘跃钧, 蓝云龙, 等. 不同种源多花黄精生物生态特性研究 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(12): 1616-1620.
- [8] 徐惠龙, 汪英俊, 陈 鸣, 等. 基于 ISSR 标记的福建省多花黄精与长梗黄精种质鉴别及遗传多样性分析 [J]. 福建农业学报, 2017, 32(6): 619-624.
- [9] 张恒庆, 贾 鑫, 刘华健, 等. 大连地区多花黄精与多花黄精遗传多样性的 ISSR 比较研究 [J]. 辽宁师范大学学报: 自然科学版, 2018, 48(2): 233-238.
- [10] 周新华, 曾平生, 武晓玉, 等. 野生多花黄精种群表型变异研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(6): 99-106.
- [11] 李园园, 蔡 莉, 杨继勇, 等. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列的金钗石斛 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018(8): 3516-3524.
- [12] 吕泽良, 张永刚, 韩 梅, 等. 不同产地黄芩 ITS2 和 psbA-trnH 条形码序列分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(1): 42-48.
- [13] 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.
- [14] 王晓玥, 宋经元, 谢彩香, 等. RNA-Seq 与道地药材研究 [J]. 药学学报, 2014, 49(12): 1650-1657.
- [15] 臧艺玫, 李妍芃, 乔 晶, 等. 基于 β -香树脂醇合成酶基因 SNP 的甘草道地性机制研究 [J]. 药学学报, 2015, 50(7): 906-909.
- [16] 高 飞, 李彤彤, 汤玲平, 等. 基于 DNA 条形码的龙葵系统发育及变异位点分析 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 114-121.
- [17] 陈晓梅, 田丽霞, 单婷婷, 等. 铁皮石斛种质资源和遗传育种研究进展 [J]. 药学学报, 2018, 53(9): 1493-1503.
- [18] 张彩云, 黄珊珊, 颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2306-2312.
- [19] 鹿江南, 成 航, 樊佳佳, 等. 基于 ITS2 序列的 5 种鬼臼类中药材 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3907-3911.
- [20] 段宝忠, 李 巍, 邓海星, 等. 基于 DNA 条形码技术的民族药紫丹参及其近缘种鉴定研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1204-1211.
- [21] 赵 晴, 谢红波, 赵红玲, 等. 中药材种子 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3471-3476.
- [22] 杨金宏, 孔卫青. 基于 *rbcL* 和 *matK* 序列探讨马鞭草科部分植物的系统学位置 [J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21(2): 116-122.
- [23] 夏 至, 王璐静, 黄 勇, 等. 地黄属植物 DNA 条形码鉴定及地黄栽培起源研究 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 648-654.
- [24] LI D Z, GAO L M. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceed Nat Acad Sci Unit Stat Amer*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [25] 孙 靛, 郑玉光, 袁 媛, 等. 白术遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3381-3385.