

• 药材与资源 •

基于 SCoT 标记对壮药材滇桂艾纳香常混淆基原植物假东风草和东风草的鉴别研究

苏宏娜^{1,2}, 李学学^{1,2}, 张绍山^{2,3}, 孔苑琳^{1,2}, 谭玲^{1,2}, 赵雪莲^{1,2}, 李奕松^{1,2}, 李进³, 陈仕勇^{4*}, 刘圆^{2,5*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610225

2. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225

3. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川 成都 610225

4. 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610225

5. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610225

摘要: 目的 从分子水平快速、准确鉴别壮药材滇桂艾纳香的 2 个常混淆基原植物假东风草 *Blumea riparia* (小花种) 和东风草 *B. megacephala* (大花种), 研究假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 的亲缘关系。方法 采用 SCoT 分子标记研究, 利用 23 条引物对 30 个植物样本进行扩增, NTSYS 软件进行聚类分析, SPSS 20.0 软件进行主成分分析, 并构建 DNA 指纹图谱, 利用 R 语言进行 Mantel test 分析。结果 从 23 条 SCoT 引物中筛选出多态性较好且条带清晰、重复性高的引物 11 条, 共扩增出 213 条带, 不同引物扩增出的多态性条带数为 8~30 条, 平均为 19.0 条, 多态性比率为 98.12%。UPGMA 聚类分析结果显示, 供试品种间 Dice 遗传相似系数为 0.373~0.849, 遗传相似性 (genetic similarity coefficients, GS) 在 0.421 处可将 30 个样本分为 3 大类, 其中第 I 类为假东风草 (小花种), 第 II 类与第 III 类均为东风草 (大花种), 主成分分析结果与聚类结果一致。SCoT 引物 3 所构建的指纹图谱多态性好、条带清晰、种间差异明显, 可用于 2 个品种的鉴定。Mantel test 分析结果显示遗传距离与地理距离呈显著相关性 ($r=0.392\ 9$, $P=0.01$)。结论 SCoT 分子标记可以准确地区分开假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 2 个物种, 为壮药材滇桂艾纳香的鉴别提供了新的方法。

关键词: 假东风草; 东风草; 分子标记; 主成分分析; 遗传距离; 相关性分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)15-4658-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.024

Identification of original plants *Blumea megacephala* and *B. riparia* of Zhuang herbs Dianguaiainaxiang based on SCoT markers

SU Hong-na^{1,2}, LI Xue-xue^{1,2}, ZHANG Shao-shan^{2,3}, KONG Yuan-lin^{1,2}, TAN Ling^{1,2}, ZHAO Xue-lian^{1,2}, LI Yi-song^{1,2}, LI Jin³, CHEN Shi-yong⁴, LIU Yuan^{2,5}

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China

2. Sichuan Engineering Laboratory of Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology, Chengdu 610225, China

3. Institute of Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China

4. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China

5. Ethnic Medicine Institute, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China

Abstract: Objective To establish a method for quick identification of *Blumea megacephala* and *B. riparia* of Zhuang herbs Dianguaiainaxiang from molecular level. **Methods** Thirty samples were used to amplify by 23 SCoT primers. Cluster analysis

收稿日期: 2020-12-13

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1708005); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资助 (2020NGD01)

作者简介: 苏宏娜 (1996—), 女, 白族, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要研究方向为民族药资源与鉴定。

Tel: 18328380447 E-mail: 634159339@qq.com

*通信作者: 陈仕勇 (1984—), 男, 副教授, 博士, 主要从事牧草遗传育种研究。E-mail: chengshi8827@163.com

刘圆 (1968—), 女, 教授, 博士, 主要从事民族药品种、品质评价及新药资源保护与利用研究。

Tel: (028)85528812 E-mail: 499769896@qq.com

was performed by NTSYS software. Principal component analysis was performed by SPSS 20.0 software. DNA fingerprint was constructed. Mantel test was analyzed by R language. **Results** *B. riparia* and *B. megacephala* were separated by 11 SCoT primers screened out from 23 SCoT primers, with good polymorphism, clear bands and high repeatability. A total of 213 bands were amplified from all samples. The number of polymorphic bands ranged from 8 to 30, with an average of 19.0. The polymorphism ratio (ppb) was 98.12%. The UPGMA cluster analysis showed that the genetic similarity coefficient (GS) of all samples was 0.373—0.849, and all samples could be divided into three groups at GS (genetic similarity coefficients) of 0.421, in which the first group was *B. riparia* (small flower species), both the remaining two groups were *B. megacephala* (big flower species). The principal component analysis were consistent with the results of clustering analysis. In addition, the fingerprint was also constructed using SCoT primer 3, and the fingerprint showed good polymorphism, clear bands and obvious interspecific differences, which can be used for the identification of *B. riparia* (small flower species) and *B. megacephala* (big flower species). The results of Mantel test showed that there was a significant correlation between genetic distance and geographical distance ($r=0.392\ 9$, $P=0.01$). **Conclusion** *B. riparia* (small flower species) and *B. megacephala* (big flower species) could be successfully identified using SCoT markers, which provided a new method for the identification of Zhuang herbs Dianguaiinaxiang.

Key words: *Blumea riparia* (Bl.) DC.; *B. megacephala* (Randeria) Chang et Tseng; molecular markers; PCA; genetic distance; relevance analysis

滇桂艾纳香作为广西壮医中的常用药材,具有活络经血、祛风除湿、止血、利尿等功效,用于治疗经期不准、产后大出血、不孕症、阴疮、风湿骨痛等症^[1-3]。《广西省药材标准(第2册)》1996年版、《湖南省中药材标准》2009年版收载假东风草 *Blumea riparia* (Bl.) DC. 作为滇桂艾纳香的基原植物,别名白花九里明、华艾纳香等。课题组实地考察中发现和文献记载的“大花种”——东风草 *B. megacephala* (Randeria) Chang et Tseng, 别名大头艾纳香、管芽,在广西壮医中也常作为滇桂艾纳香使用^[4-6]。假东风草(小花种)和东风草(大花种)均为攀援状草质藤本,依靠形态特征难以区分。林雀跃等^[7]对假东风草和东风草的品种、资源分布等进行了系统梳理和调查,发现假东风草于1836年^[1]被正式命名,而东风草于1974年^[1]被命名并作为假东风草的变种,后来的研究中将二者分列为同属不同种植物,但仍有学者认为二者为一个植物种。

近年来,SCoT分子标记技术发展迅速并应用于药用植物的遗传多样性研究,评价药用植物种内、种间的遗传多样性以及亲缘关系,对药用植物的种质资源保护、分子育种等方面有重要的价值;其具有操作简单、稳定性和重复性好、多态性高、遗传信息丰富等优点^[8-10]。目前,利用SCoT分子标记对假东风草和东风草的研究未见报道。因此,本研究拟采用SCoT分子标记研究假东风草(小花种)和东风草(大花种)的亲缘关系,建立2个品种的DNA指纹图谱,为快速、准确鉴别壮药材滇桂艾纳香的2个常混淆基原植物假东风草和东风草提供分子鉴定方法,为后续种质资源鉴定提供新的技术参考,

也为滇桂艾纳香药材的开发利用提供技术保障。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

假东风草(小花种)和东风草(大花种)均由课题组自采于广西百色市、南宁市,经西南民族大学刘圆教授、李莹副教授鉴定为假东风草 *B. riparia* (Bl.) DC.和东风草 *B. megacephala* (Randeria) Chang et Tseng, 标本现存于西南民族大学民族药材标本馆,采集信息见表1。

Plant Genomic DNA Kit 植物基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)#S7412(天根生化科技北京有限公司), EDTA 2Na (Siker) 和 GEL RED 核酸染料(擎科), 2×Es Taq Master Mix (北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 仪器

SCIENTZ-48 高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司)、Fresco 17 冷冻高速离心机(赛默飞世尔科技中国有限公司)、超微量分光光度计(thermo scientific 公司)、T100™ PCR 仪(BIO-RAD 公司)、DYY-6C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、Universal hood II 凝胶成像分体系统仪(BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 DNA 提取及浓度测定

取于液氮冷冻存贮的假东风草(小花种)和东风草(大花种)样品,剪碎,加液氮研磨,DNA的提取参照DNA提取试剂盒操作说明书。提取后对样品DNA进行核酸纯度及浓度的检测,并经1.3%琼脂糖凝胶电泳检测,于-20℃冰箱中贮藏备用。

表 1 假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 样品信息

Table 1 Samples information of *B. riparia* (small flower species) and *B. megacephala* (big flower species)

编号	名称	批号	采集地点	经纬度	海拔/m
1	假东风草 (小花种)	201903008	百色市永乐镇荔枝园村	E106°37.3184' N23°36.0916'	169
2		201903007	百色市田林县六寨	E106°37.9566' N23°57.7985'	638
3		201903009	百色市永乐镇南乐村	E106°36.9917' N23°58.5408'	186
4		201903001	百色市田林县弄平村	E106°14.6453' N24°17.8224'	579
5		201903003	百色市田林县乐里镇田平村	E106°14.3431' N24°15.5812'	567
6		201903004	百色市田林县乐里镇田平村	E106°14.5555' N24°15.8766'	473
7		201903002	百色市田林县乐里镇田平村	E106°15.8244' N24°15.6289'	312
8		201901001	百色市田林县乐里镇平雄屯	E106°15' N24°15'	529
9		201901002	百色市永乐乡南乐村	E106°37' N23°58'	401
10		201901003	百色市田林县弄平屯	E106°14' N24°17'	580
11	东风草 (大花种)	201903010	南宁市宾阳县凌村	E108°39.0324' N22°58.1439'	136
12		201903011	南宁市宾阳县新桥镇民花村	E108°43.7333' N23°12.8704'	141
13		201903012	南宁市宾阳县思陇镇秀英村	E108°41.6521' N23°11.1371'	153
14		201903013	南宁市宾阳县思陇镇保证村	E108°41.8811' N23°12.4299'	170
15		201903014	南宁市上林县东敢水库	E108°29.6527' N23°32.6951'	181
16		201903015	南宁市上林县雲候莊	E108°28.4915' N23°33.4273'	230
17		201903016	南宁市马山县高速路出口	E108°7.5240' N23°42.9392'	192
18		201903017	南宁市武鸣县府城镇那化村	E108°16.6053' N23°27.7357'	189
19		201903018	南宁市武鸣县马头	E108°26.8187' N23°19.9822'	181
20		201903019	南宁市邕武路腾翔加油站	E108°19.8312' N23°01.7507'	159
21		201911003	南宁市宾阳县屯侯新村	E108°42.6905' N23°12.2328'	151
22		201911010	南宁市武鸣区邕武路	E108°19.8655' N23°01.7300'	166
23		201911009	南宁市武鸣区马头片区	E108°26.8133' N23°19.9852'	178
24		201911006	南宁市上林县东敢水库	E108°29.9406' N23°33.4694'	170
25		201911001	南宁市兴宁区 322 国道	E108°38.5874' N22°58.3594'	146
26		201911004	南宁市宾阳县新桥镇	E108°44.1021' N23°13.0069'	143
27		201911005	南宁市宾阳县六福新村	E108°41.6664' N23°11.1546'	160
28		201911007	南宁市上林县东敢村云雷桥	E108°28.4880' N23°33.4324'	239
29		201911008	南宁市马山县古零村乐平村	E108°19.4075' N23°35.0237'	265
30		201911002	南宁市兴宁区 322 国道	E108°40.4934' N23°01.6592'	168

2.2 SCoT-PCR 扩增

PCR 扩增反应体系为 2×Es Taq Master Mix 10 μL, 10 μmol/L 引物 2 μL, 模板 DNA 2 μL (约 20 ng/μL), ddH₂O 补足至 20 μL。扩增程序: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 退火 1 min (不同 SCoT 引物的 T_m 值不同), 72 °C 延伸 1.5 min, 彻底延伸 10 min, 共 35 个循环。取扩增产物 10 μL, 用 GelRed 核酸染料染色, 点样于 1.5% 琼脂糖凝胶上, 在 1×TAE 缓冲液中电泳 80 min (120 V, 400 mA) 后摄取扩增图谱。

2.3 数据处理

选取条带清晰且多态性好的图谱进行统计, 在同一迁移位置上, 有条带记为“1”, 无条带记为“0”, 在 Excel 表中建立 1, 0 矩阵, 参考文献方法^[10-13]构建假东风草和东风草的 DNA 指纹图谱。利用软件 DCFA1.1 将数据导入 POPGENE 32 中计算多态性条带百分比 (PPB)。利用 NTSYS-pc 2.10e 软件进行品种间的 Dice 遗传相似性系数分析, 并利用非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA) 进行聚类分析^[14-17], 构建假东风草和东风草聚类树状图。利用 SPSS20.0 软件对假东风草和东风草进行主成分

分析^[18-19], 构建假东风草和东风草的主成分分析图。利用多态性最好的 SCoT 引物构建指纹图谱。利用 NTSYS-pc 2.1 分子进化软件计算假东风草和东风草的遗传距离, 利用在线经纬度距离计算器 (<http://www.ab126.com/Geography/1883.html>) 计算假东风草和东风草的地理距离。利用 R 语言进行 Mantel test 分析^[20-21], 对假东风草和东风草的遗传距离和地理距离进行 spearman 相关性分析。

3 结果与分析

3.1 DNA 纯度及浓度检测结果

经检测, 所有样品提取的 DNA 的 A_{260nm}/A_{280nm} 在 1.8~2.0, A_{260nm}/A_{230nm} 在 1.8~2.3, 说明所有样品 DNA 纯度达到检测要求。提取的 DNA 质量浓度在 23.7~256.9 ng/μL, 用去离子水稀释至 10 ng/μL 进行后续实验。

3.2 SCoT 标记扩增结果及多态性分析

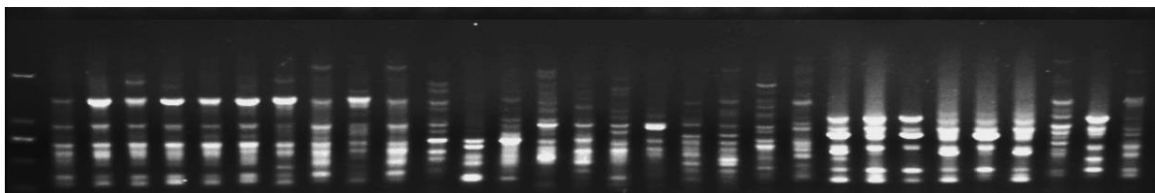
从 23 条 SCoT 引物中共筛选出 11 条 (表 2) 适合于 30 个样本的 SCoT-PCR 扩增, 其电泳图见图 1。用 11 条 SCoT 引物扩增 30 个样本, 共获得 213 条谱带, 平均每个引物扩增出 19.4 条谱带, 其中多态性谱带 209 条, 比率为 97.5%, 表明假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 的遗传多样性比较丰富。

表 2 SCoT 引物序列

Table 2 Primer information of SCoT

引物	引物序列 (5'-3')	退火温度/°C	总带数	多态性带数	PPB/%
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG	53.5	17	17	100.00
SCoT4	CAACAATGGCTACCACCT	52.0	26	26	100.00
SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA	52.0	24	24	100.00
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT	52.0	19	18	94.74
SCoT10	CAACAATGGCTACCAGCC	53.3	21	21	100.00
SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA	54.0	22	21	95.45
SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC	59.5	9	8	88.89
SCoT19	ACCATGGCTACCACCGGC	59.5	30	30	100.00
SCoT24	CACCATGGCTACCACCAT	52.8	9	9	100.00
SCoT60	ACAATGGCTACCACCA	53.4	16	15	93.75
SCoT61	CAACAATGGCTACCACCG	53.4	20	20	100.00
平均值			19.4	19.0	98.12
总数			213	209	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



1~10-假东风草 (小花种) 11~30-东风草 (大花种)

1—10-*B. riparia* (small flower species) 11—30-*B. megacephala* (big flower species)

图 1 假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) SCoT19 DNA 电泳图

Fig. 1 SCoT19 DNA electrophoresis of *B. riparia* (small flower species) and *B. megacephala* (big flower species)

3.3 SCoT 标记 UPGMA 聚类分析

按照电泳图谱中同一位置上条带的有无进行统计,有记录为“1”,无记为“0”,形成 Excel 数据矩阵。利用 NTSYS-pc 2.1 分子进化软件对假东风草(小花种)和东风草(大花种)的遗传相似度进行数据处理,当遗传相似性系数为 0.418 时,假东风草(1~10)单独成一支,且遗传相似度为 0.64,表明假东风草(小花种)遗传基础较窄,基因多样性较低;东风草(20~30)聚为一支,遗传相似度为 0.49,东风草(11~19)聚为一支,遗传相似度为 0.41,表明东风草(大花种)基因多样性较高,种内变异较大,遗传基础较宽泛。当遗传相似性系数为 0.479 时,可以看出假东风草(1~10)与东风草(20~30)聚为一支,说明假东风草(1~10)与东风草(20~30)遗传基础具有一定的相似性,说明部分学者认为的东风草作为假东风草的一个变种具有一定依据,但实际从分子水平来看假东风草(1~10)和东风草(20~30)遗传相似系数仅为 0.479,亲缘关系较远,说明传统的经验鉴别具有一定的局限性。假东风草和东风草的遗传相似度图见图 2。

3.4 SCoT 标记主成分分析

将数据矩阵导入 SPSS 20.0 软件上对不同样本进行主成分分析,以特征值 ≥ 1 为原则提取 2 个主成分,且累积贡献率达到 87.59%,基本可以客观反映假东风草和东风草的样本信息。以主成分 2 为纵

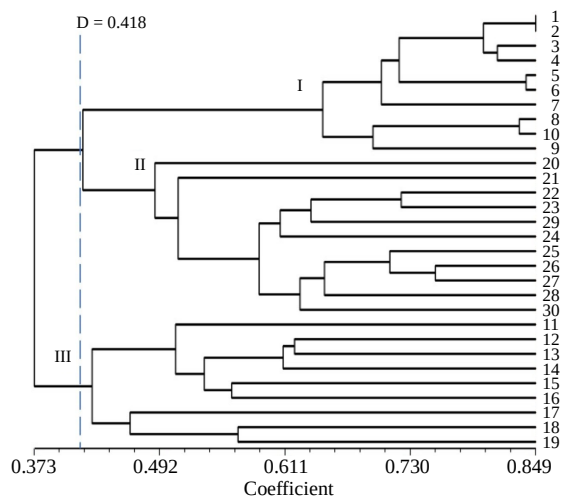


图 2 假东风草(小花种)和东风草(大花种)UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA clustering graph of *B. riparia* (small flower species) and *B. megacephala* (big flower species)

坐标,主成分 1 为横坐标所形成的假东风草和东风草的位置分布如图 3 所示。主成分分析结果表明可以区分假东风草和东风草,30 个假东风草和东风草样本被分为 2 类。1~10 号样本为一类,均为假东风草;11~30 号样本为一类,均为东风草;在第 2 大类东风草中又可以分为 2 小类,11~19 号样本为一小类,20~30 号样本为一小类,主成分分析结果与聚类分析结果相吻合,主成分分析结果更直观地表明了假东风草和东风草之间的亲缘关系,是对聚类结果的直观解释和佐证。

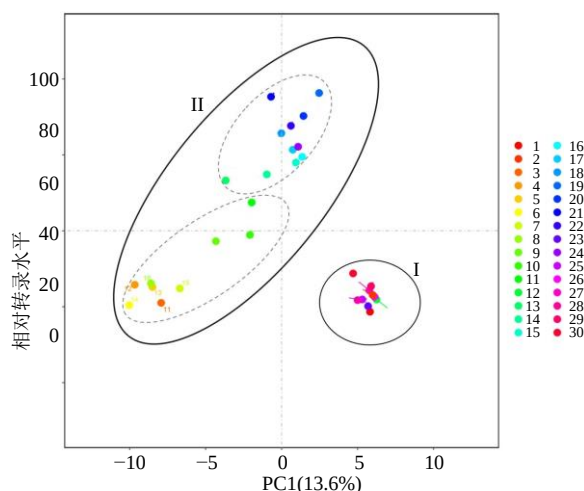


图 3 假东风草(小花种)和东风草(大花种)主成分分析图

Fig. 3 PCA clustering graph of *B. riparia* (small flower species) and *B. megacephala* (large flower species)

3.5 假东风草和东风草 DNA 指纹图谱构建

从筛选的 11 条 SCoT 引物中选择多态性最好的引物 SCoT3 构建 30 份假东风草和东风草 DNA 指纹图谱,见图 4。由图可知该引物可鉴别所有假东风草和东风草的 DNA 样品,因此,可利用 SCoT3 引物对待测的假东风草和东风草进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测,比对供试品的多态性与构建的 DNA 指纹图谱,从而区分鉴定假东风草和东风草。

3.6 种间遗传距离与地理距离相关性分析

利用 NTSYS-pc 2.1 分子进化软件对假东风草和东风草的遗传距离进行数据处理,利用在线经纬度距离计算器(<http://www.ab126.com/Geography/1883.html>)计算假东风草和东风草的地理距离,假东风草和东风草遗传距离、地理距离见表 3。遗传距离和地理距离的范围分别为 0.146 0~1.350 8

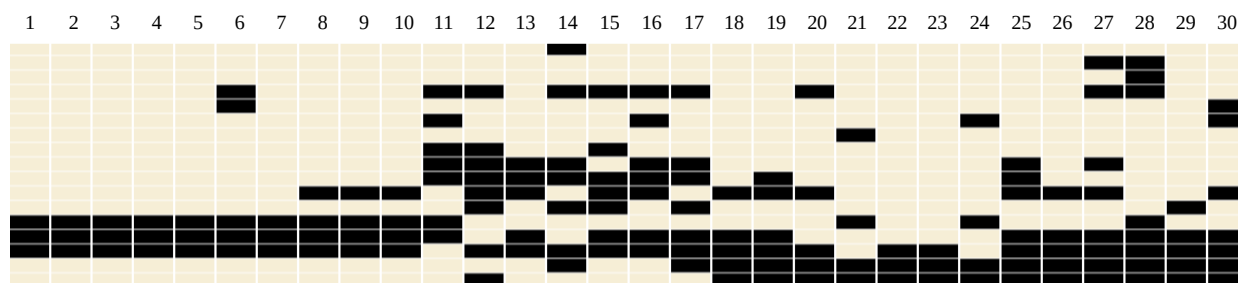


图4 假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) DNA 指纹图谱

Fig. 4 DNA fingerprint map of *B. riparia* (small flower species) and *B. megacephala* (big flower species)

表3 遗传距离和地理距离

Table 3 Genetic distance and geographic distance

编号	遗传距离/km														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.0000	40.2159	41.5796	86.2884	80.5721	83.1488	81.7646	73.2264	54.9242	50.8953	218.6529	257.0266	254.1310	254.0700	229.2726
2	0.1572	0.0000	2.1345	54.1073	51.7489	49.6145	49.9013	49.4070	2.0560	54.1359	233.4755	229.1130	227.0492	226.4938	194.9585
3	0.2571	0.1675	0.0000	51.9763	49.6145	49.6891	47.7674	47.8068	0.0815	52.0049	206.5228	231.1296	229.0786	228.5162	196.6860
4	0.2895	0.1758	0.2068	0.0000	4.1819	3.6068	4.5238	4.4993	52.0561	0.0286	285.9789	279.8765	278.1306	277.4066	243.3537
5	0.3977	0.3130	0.2868	0.1911	0.0000	0.6541	2.5027	2.4532	49.6930	4.1996	284.3326	278.6167	276.8073	276.1166	242.4744
6	0.4497	0.3932	0.3129	0.2979	0.1711	0.0000	2.1910	2.1418	49.7679	3.6263	284.2941	278.5138	276.7147	276.0186	242.3105
7	0.3909	0.3343	0.3653	0.3236	0.3236	0.3747	0.0000	0.0497	47.8466	4.5509	282.2094	276.3725	274.5812	237.8809	240.1347
8	0.5426	0.4896	0.4897	0.4182	0.3892	0.4412	0.3282	0.0000	49.8860	4.5263	282.2540	276.4191	274.6275	273.9273	240.1828
9	0.4456	0.3944	0.3936	0.3837	0.3837	0.4013	0.3732	0.4072	0.0000	52.0850	235.4894	231.0622	229.0103	228.4484	196.8076
10	0.5188	0.4623	0.4932	0.4814	0.3944	0.4745	0.3882	0.1818	0.3033	0.0000	248.6099	253.8609	250.4876	250.7496	31.0957
11	0.8236	0.9511	0.9820	1.0356	1.1410	1.0205	0.9616	1.1515	0.9293	0.9617	0.0000	284.2500	244.739	247.399	65.9490
12	1.1659	1.2886	1.3195	1.0955	1.2133	1.2328	1.1168	1.2686	1.2023	1.1394	0.8213	0.0000	107.9685	110.3496	149.7748
13	1.0891	1.1295	1.1605	0.9646	1.0647	0.9538	1.0860	1.0805	1.1078	1.0229	0.6010	0.4775	0.0000	2.4258	44.8354
14	0.9786	1.0393	0.9793	0.9376	1.0773	1.0177	0.8755	0.9701	0.9710	0.9642	0.6122	0.4926	0.4924	0.0000	42.9038
15	0.9748	1.0009	0.9365	0.8504	0.8504	0.8880	0.9161	1.0107	0.8394	0.9163	0.7546	0.5596	0.6699	0.5167	0.0000
16	0.9369	1.0464	1.0285	0.9869	1.1982	1.1671	1.0569	1.0562	1.1300	0.9617	0.6232	0.6921	0.7461	0.5869	0.5777
17	1.2793	1.3326	1.2766	1.2349	1.1548	1.1609	1.1761	1.3508	1.1438	0.2300	0.9781	0.7860	0.6814	0.7453	0.6582
18	0.9864	1.0446	1.0755	1.0338	1.1674	0.9962	1.1886	0.9266	1.0228	0.9111	1.1188	1.0192	0.8514	0.9598	0.7856
19	0.8600	0.9066	0.8950	0.8959	0.9869	0.8157	0.8746	0.8151	0.7623	0.7466	0.9760	0.8564	0.8446	0.8101	0.6333
20	1.2182	1.1652	1.1355	1.0666	1.1544	1.0627	1.1151	1.1525	0.9716	1.0805	0.9942	0.7884	0.8886	0.6749	0.8654
21	1.0113	1.0983	1.0238	0.9334	0.8868	0.8800	0.9081	0.9157	0.7888	0.8690	1.0896	0.9996	0.9803	0.7883	0.9996
22	0.7350	0.6928	0.6874	0.7590	0.7590	0.7622	0.9081	0.8149	0.6711	0.7598	0.9225	0.9571	0.9803	0.9265	0.8770
23	0.8671	0.8368	0.7843	0.7034	0.7426	0.6744	0.8047	0.7452	0.7316	0.7434	1.0732	1.0277	0.9231	0.9870	0.8999
24	0.9990	0.9366	0.8675	0.8258	0.9800	0.9548	0.9472	0.9905	0.9149	0.9751	1.1827	1.1372	1.1064	1.1190	0.9831
25	0.7885	0.7840	0.8542	0.8125	0.8533	0.8157	0.7568	0.7461	0.7623	0.7466	0.9019	1.0106	0.8446	0.7793	0.8928
26	0.8163	0.7767	0.8469	0.8052	0.8886	0.7720	0.8673	0.8078	0.7172	0.8060	1.2311	1.2369	1.0265	1.0904	1.0458
27	0.9049	0.8304	0.8614	0.8197	0.7427	0.8229	0.9244	0.7872	0.7317	0.8205	1.0224	1.1048	1.0410	0.7200	0.9377
28	0.8849	0.9254	0.9563	0.9146	0.9146	0.9147	0.8851	0.8764	0.9036	0.8746	0.9281	0.9918	1.0543	0.9031	0.9541
29	0.8904	0.8568	0.9303	0.9330	0.8460	0.8854	0.9099	0.8441	0.8776	0.7721	0.9687	1.0458	1.0691	1.0496	0.9232
30	0.7860	0.8265	0.9000	0.8583	0.9027	0.9829	0.7962	0.7775	0.6506	0.7090	0.9776	1.1065	0.9962	0.9801	0.9321

编号	遗传距离/km														
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	227.2583	191.9195	207.6820	226.5294	222.2244	255.4910	226.5196	226.5196	229.7150	247.4128	257.6004	254.1488	227.2520	211.7740	256.1359
2	192.7174	154.2009	176.2936	197.5135	201.7720	227.9074	201.8419	197.5029	195.0876	204.1452	229.6031	227.0591	192.7093	177.0404	232.6429
3	194.6229	156.0509	178.2742	199.5245	203.8777	229.9293	203.9476	199.5139	196.9898	234.7046	231.6183	229.0884	194.6149	178.9507	234.7149
4	241.0325	201.5975	252.4304	248.2380	210.7232	278.8032	254.8899	248.2273	274.3129	285.1234	280.3308	278.1377	241.0237	225.5624	284.7778
5	240.1634	200.8201	225.2345	246.9702	253.0149	277.5174	253.0848	246.9596	242.4592	283.4765	279.0780	276.8150	240.1547	224.6486	283.2249
6	239.9979	200.6396	225.1163	246.8682	253.0049	277.4185	253.0748	246.8575	242.2913	283.4380	278.9740	276.7223	238.9892	224.4897	283.1705
7	237.8215	198.4578	222.9647	244.7276	250.9519	275.2804	251.0218	244.7169	240.1140	281.3535	276.5887	274.5887	237.8127	222.3161	281.0701
8	237.8696	198.5062	223.0117	244.7741	250.9954	275.3268	251.0653	206.9864	240.1621	280.1398	276.8785	274.6350	237.8608	222.3640	281.1152
9	194.5622	155.9931	178.2091	199.4574	203.8036	229.8615	203.8734	199.4468	196.9293	234.6322	231.5510	229.0201	194.5541	178.8896	234.6437
10	229.2930	197.2791	208.1528	224.8498	215.2439	252.1436	215.3073	224.8407	231.7451	247.7986	254.4768	250.5100	229.2882	214.3863	214.5542
11	67.7613	98.7573	66.7874	45.4788	33.4085	26.8266	33.3436	45.4880	67.2267	0.8573	28.8494	24.5102	67.7720	73.3900	6.9705
12	151.4408	177.8673	146.1771	127.6029	99.3206	109.9536	99.2616	127.6104	151.1129	84.7039	113.3746	108.0001	151.4511	157.7060	90.5264
13	46.9546	82.6505	52.5300	30.0888	41.0341	2.6912	40.9976	30.0995	45.9022	24.2335	5.4207	0.0405	46.9658	58.1964	17.6637
14	45.0586	81.2374	51.4875	29.1949	42.4464	1.4253	42.4127	29.2056	43.9349	26.6559	3.9282	2.3900	45.0698	56.1964	17.6637
15	2.3928	42.0671	23.9872	24.0317	59.6948	43.9019	64.5512	24.0281	15.1510	65.3816	43.9642	44.8177	2.4030	17.9186	60.3644
16	0.0000	39.6969	22.7724	25.0620	60.4864	46.0798	60.5094	25.0575	2.4613	67.1789	46.1994	46.9377	0.0112	15.7008	62.2761
17	0.7870	0.0000	32.0995	53.6760	79.0984	82.4827	79.1508	53.6660	41.8815	98.0120	83.2726	82.6444	39.6874	24.9263	94.7953
18	0.7903	0.7018	0.0000	22.5291	48.4363	52.8398	48.4810	22.5184	25.0128	66.0279	54.1322	52.5307	22.7715	14.3116	63.1241
19	0.7376	0.7870	0.5434	0.0000	35.7991	30.5807	35.8159	0.0107	25.5353	44.7799	127.5009	30.0916	25.0707	30.5703	41.1562
20	0.9517	0.8224	1.0144	0.7285	0.0000	43.5073	0.0699	35.8013	61.2083	32.5859	46.2975	41.0699	60.4941	61.6258	35.2174
21	0.9617	1.0364	1.0112	0.6841	0.6750	0.0000	43.4722	30.5914	40.9068	26.6275	2.7979	2.6508	46.0909	57.8601	19.9367
22	0.9617	0.9787	0.9599	0.6253	0.6105	0.6306	0.0000	35.8181	61.2288	32.5212	46.2626	41.0333	60.5172	61.6649	35.1588
23	1.0287	1.0194	0.8482	0.5533	0.6926	0.4732	0.3265	0.0000	25.5178	44.7890	32.1272	30.1023	25.0662	30.5614	41.1623
24	1.0773	0.9283	0.8524	0.8542	0.7498	0.7615	0.5231	0.4478	0.0000	66.6672	44.8975	45.8835	2.4670	18.1100	61.5866
25	0.9019	0.8780	0.9646	0.5965	0.5188	0.6253	0.4670	0.4030	0.5177	0.0000	28.7079	24.2704	67.1896	75.3352	6.9213
26	1.0913	0.9708	0.8664	0.7303	0.6567	0.6180	0.4597	0.3957	0.3281	0.2950	0.0000	5.3813	46.2105	58.5177	17.6886
27	0.9832	0.9340	0.7582	0.8073	0.7969	0.7866	0.5769	0.6161	0.5249	0.3912	0.2828	0.0000	46.9488	58.1875	17.6886
28	0.8942	0.8483	0.8516	0.7690	0.8237	0.7156	0.6043	0.7290	0.6379	0.4668	0.4380	0.3906	0.0000	15.6932	62.2869
29	1.0079	0.9708	0.8238	0.7303	0.8643	0.8060	0.4597	0.4434	0.5104	0.4656	0.4583	0.4963	0.5745	0.0000	71.4451
30	1.0184	0.9945	0.8360	0.6130	0.8340	0.6773	0.5877	0.6003	0.7774	0.4588	0.4280	0.4660	0.5201	0.4759	0.0000

和 0.010 7~285.978 9 km, 其中遗传距离最大值出现在 8 号假东风草和 17 号东风草之间, 最小值出现在 4 号假东风草和 28 号东风草之间; 地理距离最大值出现在 4 号假东风草和 11 号东风草之间, 最小值出现在 19 号东风草和 23 号东风草之间。利用 R 语言对假东风草和东风草的遗传距离和地理距离进行 Mantel test 分析, permutations 设置为 99 次, 结果显示遗传距离与地理距离呈显著相关性 ($r=0.392\ 9$, $P=0.01$)。

4 讨论

SCoT 分子标记是一种新开发的基于植物基因中的翻译起始位点 (ATG) 侧翼保守序列的单引物分子标记, 目前已广泛应用于植物遗传多样性及亲缘关系研究^[16-17, 20-23]。程印虎等^[10]利用 SCoT 分子标记对陕西产重楼属植物资源的遗传多样性分析发现, 在相似系数为 0.80 时, 6 个类群重楼可以分为 2 个类群, 6 个类群重楼属植物在物种水平上具有较高的遗传多样性。陈大霞等^[8]基于 ISSR、SCoT、SRAP 标记对川续断属药用植物亲缘关系研究发现, 分子标记揭示的结果与形态标记分类也有一定差异, 峨眉续断与其原变种川续断在生境、繁殖方式及叶片形态上均有较大差异, 二者之间的亲缘关系值得进一步研究。本研究通过 SCoT 对假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 的遗传多样性分析发现, 在遗传相似度为 0.418 时, 假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 被分为 2 类, 但部分东风草 (大花种) 和假东风草 (小花种) 遗传距离较近, 植物形态有差异, 二者之间的亲缘关系需要进一步探索和研究。

滇桂艾纳香是壮族常用的特色药材, 目前广西省及湖南省中药材标准只收录了假东风草 (小花种) 作为其来源。随着滇桂艾纳香药材资源的开发, 假东风草 (小花) 野外资源形式不宜乐观, 且因东风草 (大花种) 在外观形态和药用价值与其具有一定的相似性, 因此常出现将二者混淆的情况。本研究对实地收集的 30 份假东风草和东风草资源进行 SCoT-PCR 扩增, 首次从分子水平建立了鉴别该 2 个易混淆品种的方法。本研究筛选的 11 条 SCoT 引物在假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 中具有较高的多态性, 平均多态性比率为 98.12%, 高于该方法研究地黄种质资源^[21]和射干、川射干药材分子鉴别^[24]的多态性百分比。

根据 UPGMA 聚类分析结果, Dice 遗传相似性

系数在 0.421 处可将 30 个样本分为 3 大类, 其中第 I 类为假东风草, 第 II 类与第 III 类均为东风草, 可以将 2 个品种区分开; 根据主成分分析结果显示可以将 30 个样本区分为 2 大类, 其中东风草又可细分为 2 类, 主成分分析结果与聚类结果一致。东风草存在有 2 个分支, 推测可能是由于在分化、进化过程中, 东风草逐渐有分化出一个亚种的趋势。建议后续收集数量更多、分布范围更广的假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 的种质资源, 对其分化和进化过程进行更进一步研究, 以期对假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 的植物学分类做出分子水平的解释和参考。

根据本研究中 SCoT3 引物构建的 DNA 指纹图谱, 可以区分 30 份假东风草 (小花种)、东风草 (大花种), 因此 SCoT 分子标记可以在区分假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 有效应用, 可以达到快速、准确的区分假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 的目的。假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 为 2 个同属独立的品种。此外, 目前地方标准仅收录了假东风草作为滇桂艾纳香药材的植物来源, 但实际壮医临床使用有假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 2 个基原。建议进一步开展假东风草 (小花种) 和东风草 (大花种) 药效一致性评价等相关研究, 探讨制药企业是否能够将东风草 (大花种) 纳入滇桂艾纳香新的基原植物, 扩大药源, 保证人民的用药安全, 同时缓解假东风草 (小花种) 的药用资源不足的问题。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 75 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 236.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 (第 2 册) [S]. 1996: 274-278.
- [3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区中药饮片炮制规范 (2007 年版) [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2007: 125.
- [4] 广西壮族自治区革命委员会卫生局. 广西本草选编 [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1974: 925.
- [5] 邹节明. 广西特色中草药资源选编 [M]. 北京: 科学出版社, 2011: 23.
- [6] 邓家刚. 桂本草 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2013: 236.
- [7] 林雀跃, 张荣林, 甘勇强, 等. 壮药材滇桂艾纳香及其易混品种东风草和高艾纳香比较研究 [J]. 中国药事,

- 2020, 34(2): 169-183.
- [8] 陈大霞, 张雪, 王钰, 等. 基于 ISSR、SCoT、SRAP 标记的川续断属药用植物亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2018, 49(04): 903-909.
- [9] Jalilian H, Zarei A, Erfani-Moghadam J. Phylogeny relationship among commercial and wild pear species based on morphological characteristics and SCoT molecular markers [J]. *Sci Hortic*, 2018, 235: 323-333.
- [10] 程虎印, 王艳, 颜永刚, 等. 陕西产重楼属种质资源的 SCoT 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3917-3922.
- [11] 崔学强, 唐璇, 黄昌艳, 等. 基于 iPBS 标记的石斛兰种质资源遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建 [J]. 热带作物学报: 2020, 42(2): 317-324.
- [12] 王蕾, 王福全, 尹惠萍, 等. 基于 SSR 标记的黄瓜栽培品种遗传多样性分析及指纹图谱构建 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(8): 2668-2677.
- [13] 姚玉仙, 张明泽, 刘丽萍, 等. 都匀茶树种质资源遗传多样性 SSR 分析及指纹图谱构建 [J]. 分子植物育种: 2021, 19(1): 3653-3660.
- [14] 李翠翠, 胡赛文, 夏至. 基于 ISSR 的地黄栽培品种与野生群体遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 6054-6061.
- [15] 郑涛, 蔡坤秀, 杨俊杰, 等. 基于 SCoT 标记血叶兰资源的亲缘关系分析 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4011-4018.
- [16] 刘新, 斯金平, 段承俐, 等. 多花黄精遗传多样性和遗传变异规律研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2835-2841.
- [17] 谢宜杰, 刘晓莹, 罗可可, 等. 醇型和酮型广藿香 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5293-5301.
- [18] 杨和川, 谭一罗, 苏文英, 等. 基于 RAPD 的杏鲍菇菌株遗传多样性分析 [J]. 江西农业学报, 2020, 32(2): 29-32.
- [19] Collard B C Y, MacKill D J. Start Codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2008, 27(1): 86-93.
- [20] 余意, 王凌, 孙嘉惠, 等. 基于微卫星群体遗传学的栽培枸杞遗传多样性和遗传结构评价 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(4): 838-845.
- [21] 石海霞, 肖承鸿, 周涛, 等. 地黄种质资源的 SCoT 分子标记遗传多样性分析 [J]. 中药材, 2018, 41(7): 1577-1580.
- [22] 熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 等. 目标起始密码子多态性(SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638.
- [23] 龙治坚, 范理璋, 徐刚, 等. SCoT 分子标记在植物研究中的应用进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(2): 336-343.
- [24] 郑茜, 杨倩, 陈永钧, 等. 基于 ISSR 及 SCoT 分子标记对射干、川射干药材的分子鉴别 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(13): 1063-1069.

[责任编辑 时圣明]