

## 黄芪属植物 DNA 条形码与聚类分析的研究

常晶茹, 姚萱航, 张雪薇, 周 仪, 刘翠晶, 刘 霞\*

吉林农业大学中药材学院, 省部共建生态恢复与生态系统管理国家重点实验室, 吉林 长春 130118

**摘要:**目的 通过分析吉林产 10 种黄芪属植物的 ITS2、matk、rbcL、psbA 条形码序列, 为黄芪属植物的物种分类鉴定及其亲缘关系提供理论依据。方法 共收集 30 份样品, 以 ITS2、matk、rbcL 和 psbA 作为条形码序列, 对黄芪属 10 种植物提取基因组 DNA、PCR 扩增并进行双向测序。所得序列结果经校正处理后, 并对其进行聚类分析。结果 ITS2、matk、rbcL 和 psbA 4 种片段, 单独的每一种片段并不能将 10 种植物全部鉴别出来, 只能鉴别出部分植物, 即蒙古黄芪 *A. membranaceus* var. *mongholicus*、扁茎黄芪 *A. complanatus*、糙叶黄芪 *A. scaberrimus*、华黄芪 *A. chinensis*、草木樨黄芪 *A. melilotoides*、细叶黄芪 *A. angustissimus*、兴安黄芪 *A. dahuricus*、新巴黄芪 *A. hsinbaticus*; 由聚类分析结果可知, 以锦鸡儿 *Caragana sinica* 为外类群, 10 种植物中, 华黄芪为单独 1 支, 细叶黄芪与扁茎黄芪聚为 1 支, 糙叶黄芪、斜茎黄芪与新巴黄芪聚为 1 支, 膜荚黄芪 *A. membranaceus*、蒙古黄芪与草木樨黄芪聚为 1 支, 并且这 3 者与兴安黄芪关系较近。结论 ITS2+rbcL+psbA 组合可以将 8 种黄芪属植物鉴别出来。聚类分析结果显示 10 种黄芪属植物被划分为 5 支, 该聚类分析结果与《中国植物志》中 10 种黄芪属植物的传统分类相一致。

**关键词:** 黄芪属; DNA 条形码; 聚类分析; 亲缘关系; 膜荚黄芪; 蒙古黄芪; 扁茎黄芪; 斜茎黄芪; 糙叶黄芪; 华黄芪; 草木樨黄芪; 细叶黄芪; 兴安黄芪; 新巴黄芪

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)22-7201-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.22.024

## DNA barcoding sequences and cluster analysis of 10 species of *Astragalus*

CHANG Jing-ru, YAO Xuan-hang, ZHANG Xue-wei, ZHOU Yi, LIU Cui-jing, LIU Xia

State Key Laboratory of Ecological Restoration and Ecosystem Management, College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Abstract: Objective** To provide theoretical basis for species classification and phylogenetic relationship of *Astragalus* by analyzing ITS2, matk, rbcL, psbA barcodes of 10 species of *Astragalus* grown in Jilin Province. **Methods** Based on 30 samples of 10 species of *Astragalus*, genomic DNA was extracted and amplified by PCR and bi-directionally sequenced with ITS2, matk, rbcL and psbA as barcode sequences. The sequence results were corrected and cluster analysis was carried out. **Results** Each of four fragments of ITS2, matk, rbcL and psbA could not identify all 10 plants, but only some plants, eg. *A. membranaceus* var. *mongholicus*, *A. complanatus*, *A. scaberrimus*, *A. chinensis*, *A. melilotoides*, *A. angustissimus*, *A. dahuricus* and *A. hsinbaticus*. From the results of cluster analysis, with *Caragana sinica* as the outer group, *A. chinensis* was a single branch in 10 species, *A. angustissimus* and *A. complanatus* were one branch, *A. scaberrimus*, *A. laxmannii* and *A. hsinbaticus* were one branch, *A. membranaceus*, *A. membranaceus* var. *mongholicus* and *A. melilotoides* were one branch, and they were closely related to *A. dahuricus*. The result of cluster analysis was consistent with the traditional classification of 10 species of *Astragalus* L. in *Flora of China*. **Conclusion** The combination of ITS2+rbcL+psbA could identify eight species of *Astragalus*. Ten species of *Astragalus* grown in Jilin Province are divided into five branches by cluster analysis, which is consistent with the traditional classification of 10 species of *Astragalus* in *Flora of China*.

**Key words:** *Astragalus* L.; DNA barcoding; cluster analysis; genetic relationship; *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge; *A. membranaceus* Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao; *A. complanatus* Bunge; *A. laxmannii* Jacquin; *A. scaberrimus* Bunge; *A. chinensis* L. F.; *A. melilotoides* Pall.; *A. angustissimus* Bunge; *A. dahuricus* (Pall.) DC.; *A. hsinbaticus* P.Y. Fu et Y. A. Chen

收稿日期: 2022-03-06

基金项目: 吉林省科技厅科技支撑计划-重点项目 (20200404003YY)

作者简介: 常晶茹 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为野生动植物保护与利用。Tel: 15143556401 E-mail: 1220982884@qq.com

\*通信作者: 刘 霞 (1965—), 女, 博士, 副教授, 主要从事中药资源与栽培研究。E-mail: liuxia506@jlau.edu.cn

黄芪属 *Astragalus* L. 是豆科植物中的一个属, 约 2000 种, 我国黄芪属共有 8 个亚属, 278 种, 2 亚种, 35 变种和 2 变型。吉林省黄芪属植物共有 10 种, 约占世界种类的 0.4%, 约占中国种类的 3.1%。关于黄芪属的分类问题一直存在争议, 亚属及种的分歧也较大<sup>[1]</sup>。关于物种的分类与鉴定、中药材正品与伪品的鉴别有许多传统的经典方法, 如形态学、解剖学、细胞学、化学分类学、数量分类学等<sup>[2-9]</sup>。每种方法各有一定的优势, 但也存在着一定的局限性, 中药黄芪资源比较丰富, 各地栽培种源混杂<sup>[10]</sup>, 药材市场还充斥着许多假冒伪劣品<sup>[11-13]</sup>, 致使其药材产量与质量不稳, 不能确保黄芪临床应用的可靠性与有效性, 因此对黄芪资源进行准确的物种鉴定与真伪品的鉴别具有重要意义。近年来, DNA 条形码技术应运而生, 正好为解决这一难题提供了一种更好的鉴定方法。DNA 条形码是指生物体内能够代表该种的、标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的片段<sup>[14-16]</sup>。DNA 条形码技术是利用生物体 DNA 中一段保守片段对物种进行快速准确鉴定的新技术<sup>[17-19]</sup>。对于种子植物的研究, 中国科学院研究团队建议将 ITS 作为种子植物核心 DNA 条形码, 同时也有学者建议将 psbA-trnH 作为辅助序列<sup>[20-23]</sup>。本研究对分布于吉林省的 10 种黄芪属植物的 DNA 条形码进行了聚类分析, 探索了 10 种黄芪属植物的亲缘关系, 本研究对于黄芪属植物的物种分类鉴定及亲缘关系的研究具有重要意义。

## 1 材料

本研究采用吉林产 10 种黄芪属植物为材料, 由吉林农业大学刘霞副教授进行了物种的鉴定分别为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge、蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao、扁茎黄芪 *A. complanatus* Bunge、斜茎黄芪 *A. laxmannii* Jacquin、糙叶黄芪 *A. scaberrimus* Bunge、华黄芪 *A. chinensis* L. F.、草木樨黄芪 *A. melilotoides* Pall.、细叶黄芪 *A. angustissimus* Bunge、兴安黄芪 *A. dahuricus* (Pall.) DC.、新巴黄芪 *A. hsinbaticus* P. Y. Fu et Y. A. Chen, 其中细叶黄芪、糙叶黄芪、斜茎黄芪、华黄芪、兴安黄芪、扁茎黄芪、新巴黄芪、草木樨黄芪于 2019 年 9 月采自吉林省乾安县, 蒙古黄芪、膜荚黄芪于 2019 年 9 月采自吉林农业大学药用植物园。锦鸡儿信息出自 GenBank 数据库。

## 2 方法

### 2.1 ITS2、matk、rbcL 和 psbA 条形码片段的比较研究

**2.1.1 DNA 的提取与检测** 使用冷冻保存的叶片, 依据新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒操作进行提取。对 DNA 纯度应用琼脂糖凝胶电泳法进行检测, 浓度以紫外分光光度法进行测定, 每种选取 3 株进行重复。

**2.1.2 PCR 扩增** 选择对应的扩增引物对样品 DNA 进行 PCR 扩增, 引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

条形码序列	引物名称	碱基序列 (5'-3')
ITS2	2F	ATGCGATACTGGTGTGAAT
	3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
rbcL	F	ATGTCACCACAAACAGAAAC
	R	TCGCATGTACTGCAGTAGC
psbA	fwd	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
	rev	CGCGCATGGTGGATTACAATCC
matk	KIM-3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
	KIM-1R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTG-GTTC

PCR 扩增在 PCR 扩增仪内完成, 其反应体系为 2×Taq PCR MasterMix 9 μL, 正反方向引物各 0.6 μL (10 μmol/L), DNA 模板 1 μL, 去离子水补足至 20 μL; 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 循环后 72 °C 延伸 10 min。

**2.1.3 PCR 产物回收及序列测定** 使用 1% 琼脂糖对 PCR 扩增产物非目的片段进行电泳检测, 将目的片段通过多功能 DNA 纯化回收试剂盒纯化后再进行测序处理。测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

## 2.2 聚类分析

测序结果经 chromas 软件进行结果校正, 在 GenBank 核苷酸数据库中 Blast 检索, 将候选序列进行比对处理, 经过 Clustal 软件自动处理后, 再经 GenDoc 软件人工校正, 采用 Mega 5.1 软件对 10 种黄芪属植物进行聚类分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 ITS2、matk、rbcL 和 psbA 条形码片段比较分析

10 种黄芪属植物的 ITS2、matk、rbcL、psbA 序列片段测定结果分别见图 1~4。由图 1 可知, 细

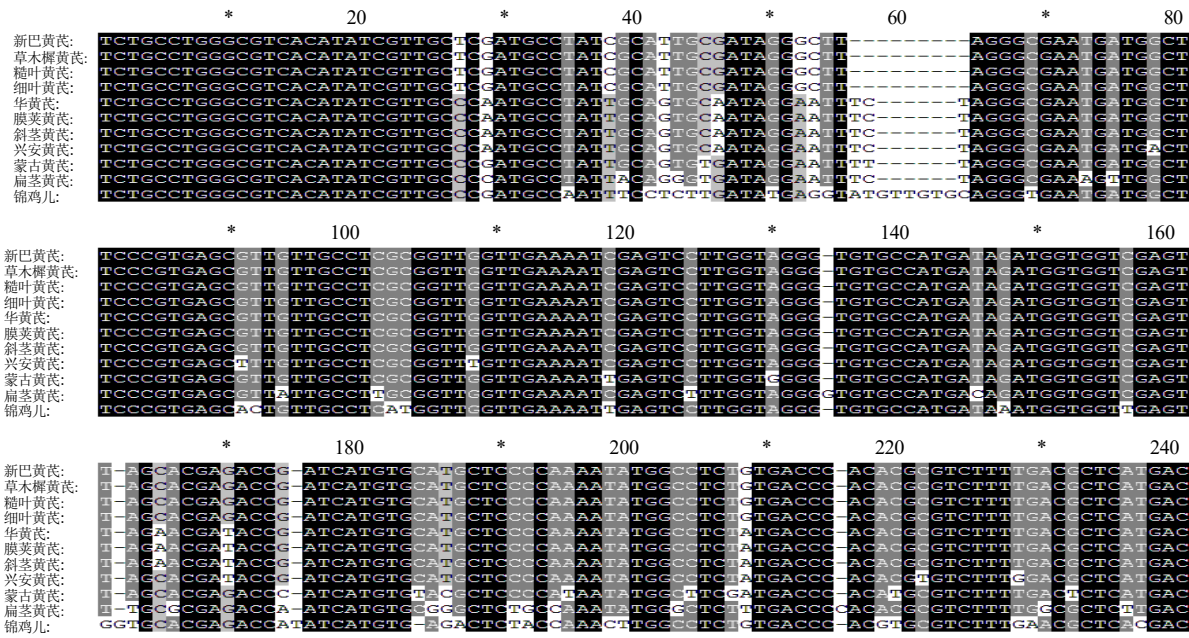


图 1 10 种黄芪属植物 ITS2 序列矩阵

Fig. 1 ITS2 sequence matrix of 10 species of *Astragalus*

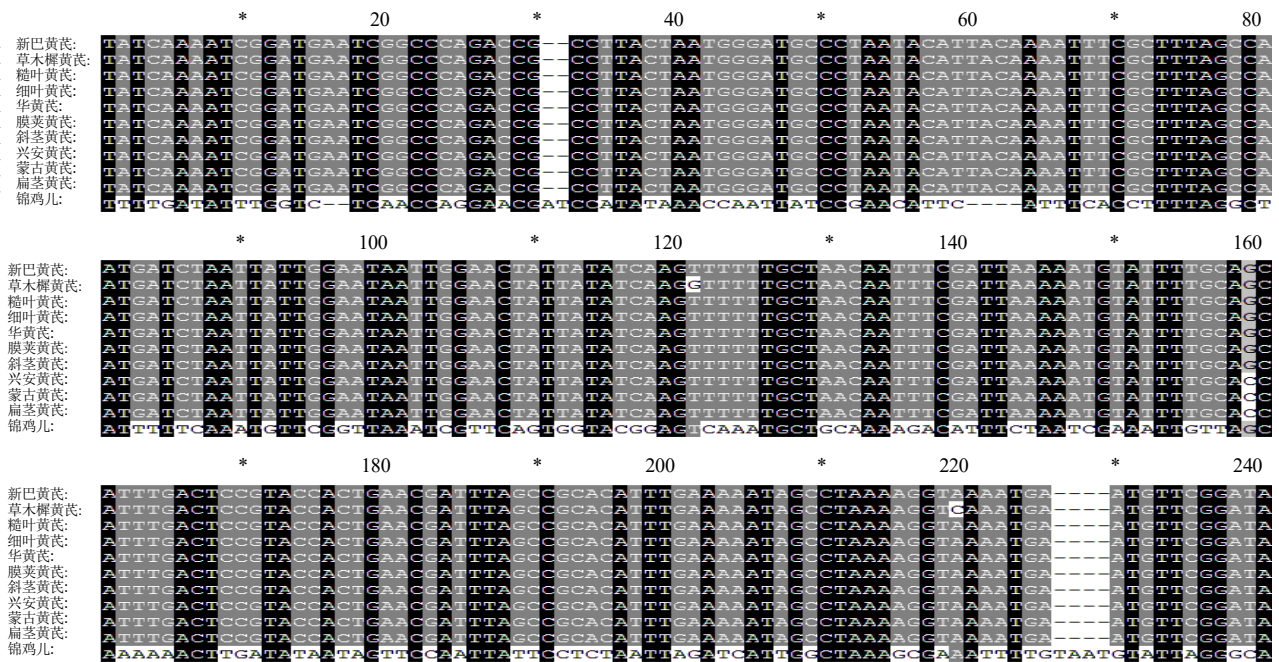


图 2 10 种黄芪属植物 matk 序列矩阵

Fig. 2 matk Sequence matrix of 10 species of *Astragalus*

叶黄芪、糙叶黄芪、新巴黄芪和草木樨黄芪的 ITS2 序列长为 227 bp，而其余黄芪属植物的 ITS2 序列长为 230 bp；10 种黄芪属植物 ITS2 序列中 GC 含量为 51%~52%。其中细叶黄芪、糙叶黄芪、新巴黄芪、草木樨黄芪 4 种植物的 ITS2 序列一致；华黄芪、斜茎黄芪、膜荚黄芪 3 种植物的

ITS2 序列一致；而兴安黄芪有 5 个位点的碱基发生变化，分别为 78、91、108、221、228 位点；蒙古黄芪有 6 个位点的碱基发生变化，分别为 118、130、195、204、207、232 位点；扁茎黄芪有 9 个位点的碱基发生变化，分别为 73、75、94、101、124、134、145、163、166 位点。由图 2 可知，10

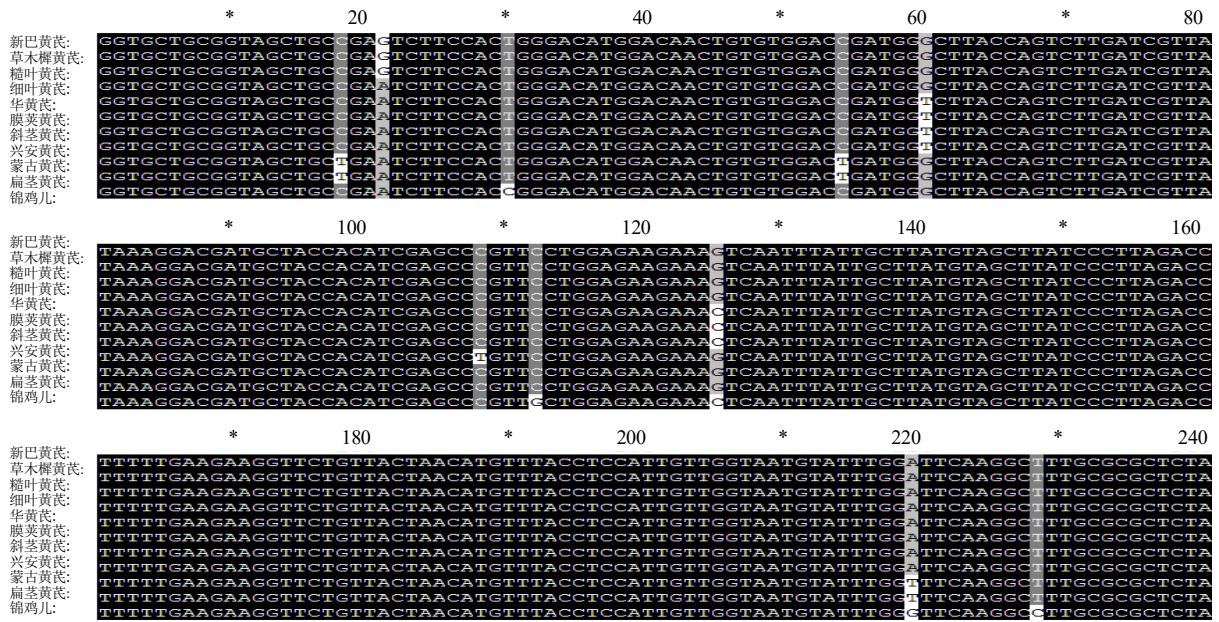


图 3 10 种黄芪属植物 rbcL 序列矩阵

Fig. 3 rbcL Sequence matrix of 10 species of Astragalus

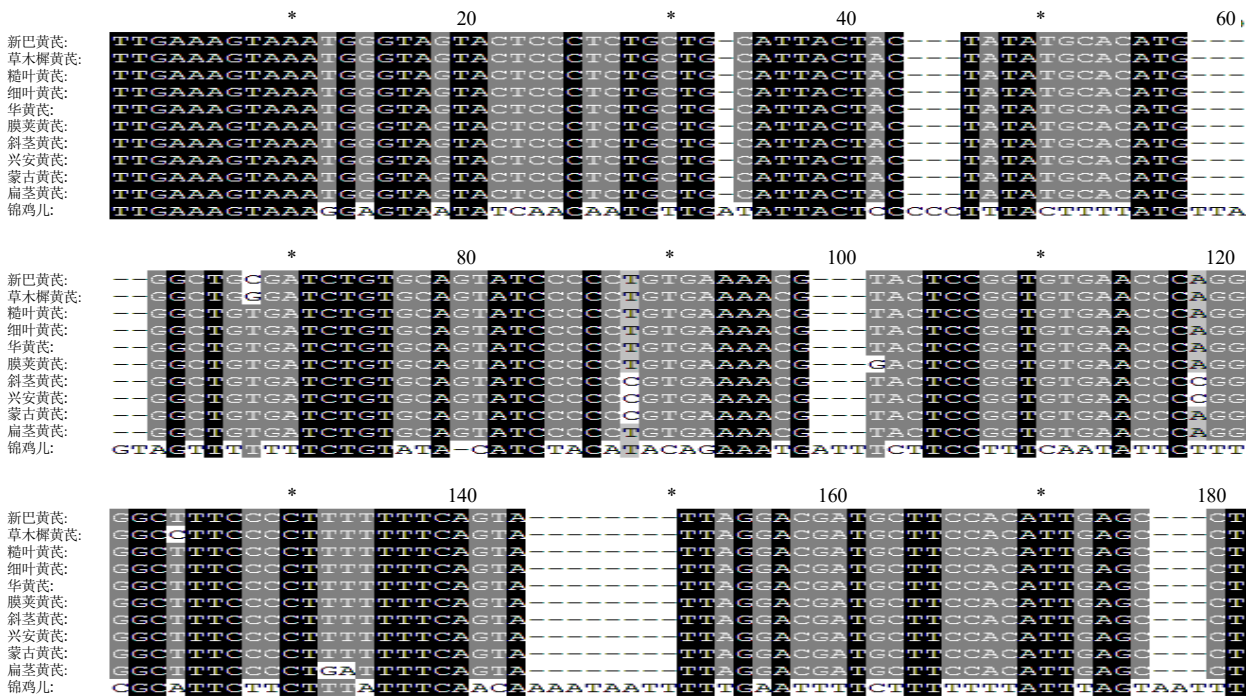


图 4 10 种黄芪属植物 psbA 序列矩阵

Fig. 4 psbA Sequence matrix of 10 species of Astragalus

种黄芪属植物的 matk 序列长均为 234 bp，其 matk 序列的 GC 含量为 32%~33%。其中蒙古黄芪在 121、219 位点的碱基发生变化；华黄芪、斜茎黄芪和膜荚黄芪 3 种植物的 matk 序列一致；扁茎黄芪、糙叶黄芪、草木樨黄芪、细叶黄芪、兴安黄

芪、新巴黄芪的 matk 序列均一致。

由图 3 可知，10 种黄芪属植物的 rbcL 序列长为 240 bp，其 rbcL 序列的 GC 含量为 45%~46%。其中细叶黄芪、新巴黄芪和草木樨黄芪 3 种植物的 rbcL 序列一致；华黄芪、斜茎黄芪和膜荚



黄芪 3 种植物的 *rbcL* 序列一致；糙叶黄芪和扁茎黄芪的 *rbcL* 序列一致。而兴安黄芪在 108 位点发生了碱基变化；蒙古黄芪在 21 位点发生了碱基变化。

由图 4 可知，10 种黄芪属植物的 *psbA* 序列长为 157 bp，其 *psbA* 序列的 GC 含量为 48%~49%。其中斜茎黄芪与膜荚黄芪的 *psbA* 序列一致；扁茎黄芪、蒙古黄芪、新巴黄芪、草木樨黄芪的 *psbA* 序列一致；而糙叶黄芪在 101 位点的碱基发生了变化；华黄芪在 68、124 位点的碱基发生了变化；兴安黄芪在 133、134 位点的碱基发生了变化；细叶黄芪在 68 位点的碱基发生变化。

由上可知，在 10 种黄芪属植物的 ITS2、*matk*、*rbcL* 和 *psbA* 4 种片段中，单独的每种片段并不能将 10 种植物全部鉴别出来，只能鉴别出部分植物，ITS2 序列可将兴安黄芪、蒙古黄芪、扁茎黄芪与其余黄芪属植物进行鉴别；*matk* 序列可将蒙古黄芪与其余黄芪属植物进行鉴别；*rbcL* 序列可将兴安黄芪、蒙古黄芪与其余黄芪属植物进行鉴别；*psbA* 序列可将糙叶黄芪、华黄芪、兴安黄芪、细叶黄芪与其余黄芪属植物进行鉴别，而 ITS2+*rbcL*+*psbA* 组合可以将 8 种黄芪属植物鉴别出来，即蒙古黄芪、扁茎黄芪、糙叶黄芪、华黄芪、草木樨黄芪、细叶黄芪、兴安黄芪、新巴黄芪。

### 3.2 聚类分析

10 种黄芪属植物基于 4 种 DNA 条形码序列的聚类分析结果见图 5。本研究获得了 40 条黄芪属植物的条形码片段，在 GenBank 数据库中检索到 19 条黄芪属植物的条形码片段（表 2）。10 种黄芪

属植物基于 4 种 DNA 条形码的聚类分析结果表明，以锦鸡儿为外类群，10 种植物中，华黄芪为单独 1 支，细叶黄芪与扁茎黄芪聚为 1 支，糙叶黄芪、斜茎黄芪与新巴黄芪聚为一支，膜荚黄芪、蒙古黄芪与草木樨黄芪聚为 1 支，并且这 3 者与兴安黄芪关系较近，该聚类分析结果与《中国植物志》中 10 种黄芪属植物的传统分类相一致。据《中国植物志》记载，糙叶黄芪、斜茎黄芪、新巴黄芪属于裂萼亚属；蒙古黄芪、膜荚黄芪、草木樨黄芪属于黄芪亚属；细叶黄芪、扁茎黄芪属于簇毛亚属；兴安黄芪属于一年生亚属；华黄芪属于华黄芪亚属。本研究的聚类分析结果与《中国植物志》中 10 种黄芪属植物的分类结果完全一致。

### 4 讨论

对分布于吉林省的 10 种黄芪属植物的 ITS2、

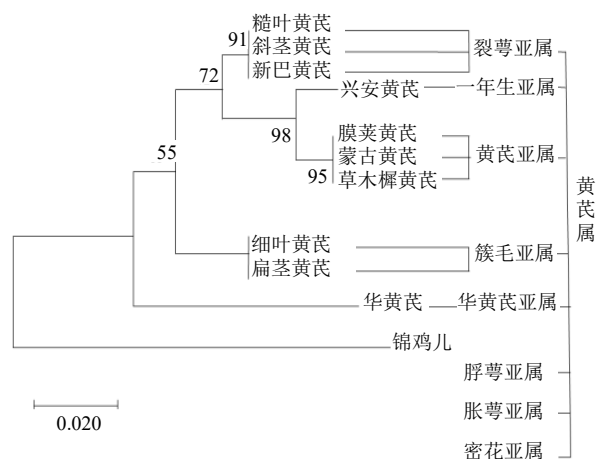


图 5 10 种黄芪属植物的聚类分析与传统分类  
Fig. 5 Cluster analysis and traditional classification of 10 species of *Astragalus*

表 2 GenBank 数据库中黄芪属植物及锦鸡儿 ITS2、*matk*、*rbcL*、*psbA* 序列信息

Table 2 Sequence information of ITS2, *matk*, *rbcL* and *psbA* of *Astragalus* and *Caragana sinica* in GenBank

植物	GenBank 登录号			
	ITS2	<i>matk</i>	<i>rbcL</i>	<i>psbA</i>
细叶黄芪	MZ425934	MZ425938	MZ425944	MZ425950
华黄芪	MZ425935	MZ425939	MZ425945	MZ425951
兴安黄芪	MZ425936	MZ425940	MZ425946	MZ425952
糙叶黄芪	MN871844.1	HM142265.1	MZ425947	KY688945.1
扁茎黄芪	KT163388.1	AY920441.1	MN2224282.1	MN224234.1
斜茎黄芪	MN871858.1	MH659288.1	EF685984.1	GU396751.1
膜荚黄芪	KC262198.1	MZ425941	MN224289	MN224244
蒙古黄芪	KC262199.1	MZ425942	MN224287	MN224242
新巴黄芪	MZ425937	MZ425943	MZ425948	MZ425953
草木樨黄芪	HM142302.1	HM142264.1	MZ425949	MZ425954
锦鸡儿	MN224262.1	HM049541.1	MN224300.1	MK792222.1

matk、rbcL 和 psbA 4 种片段进行了比较分析,并在此基础上对 10 种植物进行了聚类分析,探讨了 10 种植物的亲缘关系。结果显示在 ITS2、matk、rbcL 和 psbA 4 种片段中,单独的每一种片段并不能将 10 种植物全部鉴别出来,只能鉴别出部分植物,ITS2 序列可将兴安黄芪、蒙古黄芪、扁茎黄芪与其他黄芪属植物进行鉴别;matk 序列可将蒙古黄芪与其余黄芪属植物进行鉴别;rbcL 序列可将兴安黄芪、蒙古黄芪与其余黄芪属植物进行鉴别;psbA 序列可将糙叶黄芪、华黄芪、兴安黄芪、细叶黄芪与其余黄芪属植物进行鉴别,而 ITS2+rbcL+psbA 组合可以将 8 种黄芪属植物鉴别出来,即蒙古黄芪、扁茎黄芪、糙叶黄芪、华黄芪、草木樨黄芪、细叶黄芪、兴安黄芪、新巴黄芪;10 种黄芪属植物基于 4 种 DNA 条形码序列的聚类分析结果可知,以锦鸡儿为外类群,10 种植物中,华黄芪为单独 1 支,细叶黄芪与扁茎黄芪聚为 1 支,糙叶黄芪、斜茎黄芪与新巴黄芪聚为 1 支,膜荚黄芪、蒙古黄芪与草木樨黄芪聚为 1 支,并且这 3 者与兴安黄芪关系较近,此聚类方式与《中国植物志》中 10 种黄芪属植物的分类相吻合。据《中国植物志》记载,糙叶黄芪、斜茎黄芪、新巴黄芪属于裂萼亚属;蒙古黄芪、膜荚黄芪、草木樨黄芪属于黄芪亚属;细叶黄芪、扁茎黄芪属于簇毛亚属;兴安黄芪属于一年生亚属;华黄芪属于华黄芪亚属。本研究的聚类分析结果与《中国植物志》中 10 种黄芪属植物的分类方式完全一致。

**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. 周太炎等编著. 中国植物志 (第 42(1)卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 78-82.
- [2] 燕玲, 宛涛, 张众, 等. 膜荚黄芪与蒙古黄芪植物学特征分析 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2001, 22(4): 71-77.
- [3] 张明理, 席以珍, 康云, 等. 国产黄耆属簇毛黄耆亚属花粉形态及其系统学意义 [J]. 云南植物研究, 2003, 25(1): 46-54.
- [4] 黎斌, 常朝阳, 李思锋, 等. 中国西北地区 11 种黄耆属植物的细胞学研究 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 467-475.
- [5] 张庆芝, 吴晓俊, 刘涤, 等. 黄芪及其民间习用品 DNA 指纹图谱和有效成分含量的比较 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(6): 457-459.
- [6] Liston A. Variation in the chloroplast genes rpoC1 and rpoC2 of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from restriction site mapping of a PCR-amplified fragment [J]. *Am J Bot*, 1992, 79: 953-961.
- [7] 丁士友, 顾红雅, 瞿礼嘉, 等. PCR 产物的 RFLP 分析在黄芪亚族(豆科)系统学研究中的应用初探 [J]. 植物学报, 1995, 37(2): 97-102.
- [8] Cheng K T, Tsay H S, Chen C F, et al. Determination of the components in a Chinese prescription, Yu-Ping-Feng San, by RAPD analysis [J]. *Planta Med*, 1998, 64(6): 563-565.
- [9] Na H J, Um J Y, Kim S C, et al. Molecular discrimination of medicinal *Astragali Radix* by RAPD analysis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2004, 26(2): 265-272.
- [10] 赵明, 段金彪, 黄文哲, 等. 中国黄芪属(*Astragalus* Linn.)药用植物资源现状及分析 [J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(6): 5-9.
- [11] 娄千, 辛天怡, 宋经元. DNA 条形码技术在中药全产业链的应用进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(8): 1784-1791.
- [12] 蔡金龙, 谢世清, 张广辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(3): 452-464.
- [13] Chen S L, Pang X H, Song J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1237-1244.
- [14] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [15] Prasad P K, Tandon V, Biswal D K, et al. Phylogenetic reconstruction using secondary structures and sequence motifs of ITS2 rDNA of *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Braun, 1899 (*Digenea*: Paragonimidae) and related species [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(Suppl 3): S25.
- [16] Chen S L, Pang X H, Song J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1237-1244.
- [17] 郑辉, 邓楷煜, 陈安琪, 等. 基于 DNA 条形码的川贝母及其近缘种的分子鉴定与亲缘关系研究 [J]. 药学报, 2019, 54(12): 2326-2334.
- [18] 蔡一鸣, 代江鹏, 郑雨欣, 等. 钩藤属植物分子鉴定的 DNA 条形码筛选 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1828-1837.
- [19] Zhang J M, Wang J X, Xia T, et al. DNA barcoding: Species delimitation in tree peonies [J]. *Sci China C Life Sci*, 2009, 52(6): 568-578.
- [20] 韦雅露, 张雁春, 李秋娥, 等. 含岩白菜素药用植物 DNA 条形码的鉴定研究 [J]. 华西药理学杂志, 2021, 36(1): 44-50.
- [21] 李笑, 谭朝阳, 徐德宏, 等. 益母草植物 DNA 条形码的鉴定研究 [J]. 中国药师, 2020, 23(3): 442-447.
- [22] 赵莉莉. 花椒属植物 DNA 条形码研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [23] 许子欣, 冉志芳, 杨小彤, 等. 基于 psbA-trnH 和 rDNA ITS 序列的不同地理居群巴戟天聚类分析 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(12): 2364-2370.

[责任编辑 时圣明]