

基于通用 DNA 条形码序列的黄精属药用植物分子鉴定

张明英^{1,3}, 李依民¹, 程文萍¹, 高 静¹, 颜永刚¹, 杨 琳¹, 胡锦航^{2*}, 张 岗^{1,3*}

1. 陕西中医药大学药学院 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046

2. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712083

3. 陕西中医药大学 陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 西安 712046

摘要: 目的 分析 4 个通用植物 DNA 条形码序列 (*trnH-psbA*、*matK*、*rbcL* 和 ITS2) 及其组合对黄精属药用植物的物种鉴定分辨率, 挖掘适用于黄精属种间鉴定的高分辨率分子标记。方法 以《中国药典》2020 年版中收录的黄精属药用植物黄精 *Polygonatum sibiricum*、滇黄精 *P. kingianum*、多花黄精 *P. cyrtonema*、玉竹 *P. odorati* 及其地方常见同属替代品、混伪品共 12 种 79 个野生个体为对象, 将 4 个通用 DNA 条形码序列独立、联合分析, 评估其种间、种内变异情况, 并分别基于建树法 (tree-based method) 和 PWG 距离法 (PWG-distance method) 评估不同条形码及其组合的物种鉴定分辨率。结果 ITS2 序列扩增成功率低, *trnH-psbA*、*matK*、*rbcL* 序列的引物在黄精属植物中通用性较好; 3 组叶绿体序列的种间变异依次为 *matK* > *trnH-psbA* > *rbcL*, 种内变异差异不显著, 种间、种内遗传距离无明显的 Barcoding gap; 各条形码独立及联合分析的物种鉴定分辨率普遍偏低, 其中, 组合条形码 *trnH-psbA* + *matK* + *rbcL* 在建树法分析中的分辨率最高, 为 25%, *trnH-psbA* + *rbcL* 在距离法分析中的分辨率最高, 为 50%。结论 4 个通用 DNA 条形码序列及其组合都并非黄精属药用植物不同种间有效区分鉴定的理想分子标记, 但多序列联合分析能在一定程度上提高物种鉴定成功率。

关键词: 黄精属; DNA 条形码; 药用植物; 物种鉴定; 黄精; 滇黄精; 多花黄精; 玉竹

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)01-0235-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.025

Molecular authentication of medicinal *Polygonatum* Species utilizing the universal DNA barcode sequences

ZHANG Ming-ying^{1, 3}, LI Yi-min¹, CHENG Wen-ping¹, GAO Jing¹, YAN Yong-gang¹, YANG Lin¹, HU Jin-hang², ZHANG Gang^{1, 3}

1. Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

3. Key Laboratory for Research of "Qin Medicine" of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

Abstract: Objective To investigate the species discrimination power of the four universal plant DNA barcodes (*trnH-psbA*, *matK*, *rbcL* and ITS2) and corresponding multi-barcode combinations in *Polygonatum*, and to explore high-resolution molecular markers suitable for *Polygonatum*. **Methods** Seventy-nine wild individuals from 12 species, representing all the four medicinal species of *Polygonatum* (*P. sibiricum*, *P. kingianum*, *P. cyrtonema*, *P. odoratum*) included in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition) and their local commonly used substitutions and inauthentic adulterants, were sampled. The interspecific and intraspecific genetic variation were estimated, tree-based and PWG-distance methods were applied to evaluate the species discrimination efficiency of each barcode sequence and their combinations. **Results** The primers of *trnH-psbA*, *matK* and *rbcL* all showed good universality

收稿日期: 2022-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82003898); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2022JM-458); 陕西中医药大学校级科研课题 (2020GP34); 陕西中医药大学博士科研启动经费 (104080001); 陕西中医药大学“秦药”品质评价及资源开发学科创新团队项目 (2019-QN01)

作者简介: 张明英 (1988—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为分子药理学。E-mail: zhangmy@sntcm.edu.cn

*通信作者: 张 岗, 教授, 研究方向为药用植物生物技术与分子生物学。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

胡锦航, 讲师, 博士, 研究方向为抗肿瘤药物药理。E-mail: hujinhanghi@126.com

while most of the individuals failed to obtain ITS2 sequence in PCR amplification. The interspecific genetic variation of the three chloroplast sequences was *matK*>*trnH-psbA*>*rbcL*, while their intraspecific genetic difference was not significant, and no obvious Barcoding gap was detected. All these barcode sequences including their combinations only get limited species resolution. Among which, the combination of *trnH-psbA*+*matK*+*rbcL* possessed the best species-resolving power of 25% in tree-based method, *trnH-psbA*+*rbcL* showed the highest resolution degree of 50% in PWG-distance method. **Conclusion** None of the four barcode sequences nor their combinations were ideal molecular markers to address the problems of medicinal *Polygonatum* species authentication. Nonetheless, as the number of sequence increases, the degree of species resolution improves.

Key words: *Polygonatum* Mill.; DNA barcode; medicinal plant; species discrimination; *Polygonatum sibiricum* Red; *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.; *Polygonatum cyrtonema* Hua; *Polygonatum odoratum* L.

黄精属 *Polygonatum* Mill. 隶属于天门冬科 (Asparagaceae) 是一个具有重要药用和经济价值的草本植物类群。中国分布有黄精属植物 39 种^[1], 其中 31 种可入药使用^[2], 是中药材的重要来源。《中国药典》2020 年版收载的大宗中药材黄精 *Polygonati Rhizoma* 和玉竹 *Polygonati Odorati Rhizoma* 均来源于黄精属药用植物。其中, 黄精来源于滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *P. sibiricum* Red. 或多花黄精 *P. cyrtonema* Hua 的干燥根茎, 具补气养阴、健脾、润肺、益肾之功效; 玉竹则来源于玉竹 *P. odoratum* (Mill.) Druce 的干燥根茎, 可养阴润燥、生津止渴, 在《神农本草经》中曾被列为上品, 中医临床应用广泛。此外, 黄精属植物含多糖、甾体皂苷、黄酮、生物碱等多种活性成分, 具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤、降血糖、调血脂、调节免疫等药理作用^[2-5], 在药物开发研究中占据重要地位。

黄精属也是一个物种分类鉴定研究中的“困难”类群。自 1754 年 Miller 建立黄精属以来, 其属下物种划分鉴定与种间系统发育关系问题长期受到关注。由于该属植物具有较高的形态多样性, 自然野生状态下, 不同种间、同种不同居群个体间的形态特征常存在过渡类型, 且种间地理分布交叉重叠, 导致依据形态性状不易对不同物种进行准确区分鉴定^[6-10]。目前, 黄精属种间分类鉴定问题仍有待澄清。此外, 由于多以根状茎入药, 生药性状相似, 若经加工后, 更是难以对其物种来源进行准确鉴别^[7,11]。在我国不同地区, 卷叶黄精 *P. cirrhifolium* (Wall.) Royle、湖北黄精 *P. zanlanscianense* Pamp.、长梗黄精 *P. filipes* Merr. ex C. Jeffrey et McEwan、轮叶黄精 *P. verticillatum* (L.) All.、新疆黄精 *P. roseum* (Ledeb.) Kunth 等多种非正品基原代用、混用、误用, 甚至伪品入药现象普遍存在^[2, 7, 11], 给该属植物来源中药材的用药安全和临

床疗效带来隐患。

DNA 条形码技术从分子遗传学角度为药用植物及中药材的客观准确鉴定提供了一条有效途径^[12]。国际生命条形码联盟植物工作组 (CBOL Plant Working Group) 通过对 7 个叶绿体片段 (*rbcL*、*matK*、*rpoC1*、*rpoB*、*trnH-psbA*、*atpF-atpH* 和 *psbK-psbI*) 通用性 (包括扩增成功率、测序成功率、序列质量) 和物种鉴定分辨率的综合分析评估, 推荐 *rbcL*+*matK* 组合可作为陆地植物鉴定的核心 DNA 条形码^[13], 并建议将 ITS (包括 ITS2) 和 *trnH-psbA* 作为辅助条形码。中国植物条形码研究团队 (China Plant BOL Group) 基于对种子植物 75 科 141 属 1757 种共 6 286 个代表个体的分析结果提出将 ITS (或 ITS2) 纳入种子植物鉴定的核心条形码^[14]。陈士林及其团队在药用植物及中药材研究中建立了以 ITS2 序列为主、*trnH-psbA* 序列为辅的 DNA 条形码分子鉴定体系^[15]。这些条形码已被广泛用于药用植物类群如柴胡属 *Bupleurum* L.^[16]、五味子科 (Schisandraceae)^[17]、乌头属 *Aconitum* L.^[18]、商陆属 *Phytolacca* L.^[19] 等及其来源的中药材、饮片等的分子鉴定研究^[20-22]。

目前, 黄精属 DNA 条形码种间分子鉴定研究相对较少, 杨培等^[7]利用上述条码对黄精属 8 种 44 份样品的分子鉴定研究发现, ITS 和 ITS2 序列扩增成功率低, *trnH-psbA*、*matK* 及 *rbcL* 序列的种间、种内变异均较小, 物种分辨率不足。Jiao 等^[23]利用 ITS2 和 *trnH-psbA* 对 39 份不同地区来源中药材黄精及其混伪品的鉴定分析表明, ITS2 序列未能被成功扩增, *trnH-psbA* 序列虽能够将中药材黄精的基原物种与同属其他物种区分开来, 但由于较低的遗传变异, 对黄精属种间鉴别的分辨率依然有限。

本实验在前人研究基础上, 以《中国药典》2020 年版中收录的中药材黄精、玉竹基原植物及其在不同地区常见同属替代品、伪品来源植物为研究对象,

从物种和种内个体水平增加取样量, 利用上述 4 个 DNA 条形码序列 (*trnH-psbA*、*matK*、*rbcL* 和 *ITS2*) 分别进行独立和联合分析, 基于建树法 (tree-based method) 和 PWG 距离法 (plant working group distance, PWG-distance method) 开展分子鉴定研究, 旨在评估各条码及其不同组合的物种鉴定分辨率, 筛选适用于黄精属药用植物种间有效鉴定的分子标记, 为该属植物来源中药材的准确鉴定、用药安全和药用植物资源保护及开发利用提供理论依据。

1 材料

以《中国药典》2020 版中收录的黄精属药用

植物黄精、滇黄精、多花黄精和玉竹, 及文献资料中记载的其同属常见替代品、伪品共 12 个物种为研究对象, 采集野外自然生长状态下的健康叶片, 每种至少采集 3 个来自不同分布地点或居群的代表个体, 硅胶快速脱水干燥保存, 用于 DNA 提取, 同时采集凭证标本。本研究共采集到 57 个代表个体, 标本经陕西中医药大学标本馆王继涛高级实验师鉴定, 保存于陕西中医药大学中药标本馆。另有 22 个代表个体的序列数据由中国西南野生生物种质资源库提供, 即总共 79 个代表个体 (表 1)。

表 1 材料信息

Table 1 Voucher information of studied samples

物种	样品数量	采集号	采集地点	物种	样品数量	采集号	采集地点
卷叶黄精 <i>P. cirrhifolium</i>	4	cp_07	陕西省咸阳市	玉竹	16	BS77	陕西省宝鸡市太白县
		cp23	陕西省宝鸡市太白县	<i>P. odoratum</i>		cp09	陕西省宝鸡市眉县
		cp24	陕西省宝鸡市太白县			2020_13	河南省洛阳市洛宁县
		cp25	陕西省宝鸡市太白县			2020_14	河南省洛阳市洛宁县
多花黄精 <i>P. cyrtoneura</i>	4	BS64	云南省昆明市			2020_15	陕西省咸阳市三原县
		BS65	云南省昆明市			2020_16	陕西省咸阳市三原县
		BS66	云南省昆明市			2020_17	陕西省咸阳市三原县
		BS67	云南省昆明市	新疆黄精	5	GBOWS14	不详
长梗黄精 <i>P. filipes</i>	3	GBOWS01	不详	<i>P. roseum</i>		GBOWS15	不详
		GBOWS02	不详			GBOWS16	不详
		GBOWS03	不详			GBOWS17	不详
细根茎黄精 <i>P. gracile</i>	3	BS98	陕西省宝鸡市太白县			GBOWS18	不详
		cp28	陕西省宝鸡市太白县	黄精	8	BS50	陕西省渭南市富平县
		cp29	陕西省宝鸡市太白县	<i>P. sibiricum</i>		BS55	陕西省宝鸡市眉县
小玉竹 <i>P. humile</i>	5	GBOWS04	不详			2020_18	河南省洛阳市洛宁县
		GBOWS05	不详			2020_19	河南省洛阳市洛宁县
		GBOWS06	不详			2020_20	河南省洛阳市洛宁县
		GBOWS07	不详			2020_21	河南省洛阳市洛宁县
		GBOWS08	不详			cp_04	陕西省咸阳市永寿县
二苞黄精 <i>P. involucreatum</i>	5	GBOWS09	不详			GBOWS19	不详
		GBOWS10	不详	轮叶黄精	20	GBOWS20	不详
		GBOWS11	不详	<i>P. verticillatum</i>		GBOWS21	不详
		GBOWS12	不详			GBOWS22	不详
		GBOWS13	不详	湖北黄精	16	2020_22	河南省洛阳市洛宁县
滇黄精 <i>P. kingianum</i>	7	BS59	云南省昆明市	<i>P. zanlanscianense</i>		2020_23	河南省洛阳市洛宁县
		BS60	云南省昆明市			2020_24	河南省洛阳市洛宁县
		BS61	云南省昆明市			2020_25	河南省洛阳市洛宁县
		BS62	云南省昆明市			2020_26	河南省洛阳市洛宁县
		BS63	云南省昆明市			2020_27	河南省洛阳市洛宁县
		DHJ2	四川省雅安市			2020_28	河南省洛阳市洛宁县
		DHJ3	四川省雅安市			2020_29	河南省洛阳市洛宁县
玉竹 <i>P. odoratum</i>	16	BS68	云南省昆明市			2020_30	河南省洛阳市洛宁县
		BS69	云南省昆明市			2020_49	陕西省商洛市柞水县
		BS70	云南省昆明市			2020_50	陕西省商洛市柞水县
		BS71	云南省昆明市			2020_51	陕西省商洛市柞水县
		BS72	云南省昆明市			2020_52	陕西省商洛市柞水县
		BS73	陕西省宝鸡市太白县			cp17	陕西省商洛市柞水县
		BS74	陕西省宝鸡市太白县			cp26	陕西省宝鸡市太白县
		BS75	陕西省宝鸡市太白县			cp27	陕西省宝鸡市太白县
		BS76	陕西省宝鸡市太白县				

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取、PCR 扩增和测序

采用改良的 CTAB 法提取基因组总 DNA, TE 缓冲液溶解, 得到的 DNA 溶液用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, 美国) 检测质量与浓度。PCR 扩增反应在 GeneAmp PCR System 9700 thermal cycle (Applied Biosystems, Foster City, CA, 美国) 上进行。引物信息见表 2。PCR 反应体系均为 50 μ L, 包括 2 $\times$ Taq Plus PCR MasterMix 25 μ L, 10 μ mol/L 的正、反向引物各 2 μ L, 模板 DNA 10 μ L, ddH₂O 补齐。根据文献报道结合前期预实验结果, 最终选用的 PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30~45 s, 54.5~57.0 $^{\circ}$ C 退火 30 s (各引物退火温度详见表 2), 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 重复 35 个循环,

72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 结束后 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L 扩增产物, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。成功扩增的 PCR 产物进行双向测序。PCR 引物合成和测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司西安分部完成。

2.2 序列拼接、比对及特征分析

测序原始结果利用 Sequencher 软件进行序列拼接, 并根据测序峰图对碱基进行校正, 去除引物区及两端低质量序列, 将得到的所有序列分别在 NCBI 数据库中进行 Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 验证序列的正确性。对拼接得到的 ITS 序列采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8 S 和 26 S 区, 获得 ITS2 间隔区序列^[29]。由于 ITS2 序列扩增成功率较低, 最终获得的序列数量低于实验个体总数的 50%, 因而未将其纳入后续分析。

表 2 PCR 扩增引物信息

Table 2 Primer pairs used for PCR amplification

引物	引物名称	引物序列 (5'-3')	变性时间/退火温度
ITS ^[24]	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	30 s, 54.5 $^{\circ}$ C
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>trnH-psbA</i> ^[25-26]	fwd	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	30 s, 56 $^{\circ}$ C
	rev	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	
<i>matK</i> ^[27]	3F_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	45 s, 57 $^{\circ}$ C
	1R_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
<i>rbcL</i> ^[28]	rbcLa_f	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	30 s, 55 $^{\circ}$ C
	rbcLa_r	GTAAATCAAGTCCACCRG	

最终得到的 3 组叶绿体序列 (*trnH-psbA*、*matK*、*rbcL*) 分别构建多序列矩阵, 利用 MAFFT 完成序列比对, 并在 Geneious 软件中进行必要的人工检查校正。将 3 组叶绿体序列分别独立和两两、3 个联合进行分析, 即 *trnH-psbA*、*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*+*matK*、*trnH-psbA*+*rbcL*、*matK*+*rbcL* 和 *trnH-psbA*+*matK*+*rbcL*, 共 7 组条形码序列。对于 3 组独立条形码序列, 利用 MEGA 软件统计变异位点 (variable sites) 和简约信息位点 (parsimony informative sites), 并计算种间、种内 K2P (kimura 2-parameter distance) 遗传距离, 利用 IBM SPSS Statistics 25 进行 Wilcoxon 符号秩检验, 分析各组序列的种间、种内遗传变异差异显著性。联合分析, 即将 3 组独立序列按不同组合分别进行串联合并, 若某个体有序列缺失情况 (如 2 条序列联合时, 某个体只有 1 条序列; 或 3 条序列联合时, 某个体只有 1 条或 2 条序列), 则将个体在分析中去除。

2.3 物种鉴定分析

利用 MEGA 软件分别计算上述 7 组条形码序列的种间、种内 K2P 距离, 利用 TaxonDNA 结合统计软件对种间、种内 K2P 距离分布频度进行统计并绘图, 评估种间和种内遗传距离间是否存在 “Barcoding gap”。

采用建树法和 PWG 距离法 2 种分析方法评估 7 组条形码的物种鉴定分辨率。对于建树法, 利用 MEGA 软件基于 K2P 距离和配对删除 (pair-deletion) 模型, 构建邻接系统发育树 (neighbor-joining tree, NJ tree), 系统发育树各分支节点的靴带支持率 (bootstrap values, BS) 通过进行 1000 次自展重复分析获得。当同一物种的所有个体在系统树上聚为一个单系, 且支持率高于 50%, 则视为该物种鉴定成功^[14, 30]。对于 PWG 距离法, 利用 MEGA 软件分别计算各物种的种间、种内遗传距离, 当某一物种与其他物种间的最小遗传距离大于该物种种内个体间的最大遗传距离时, 则表示该物种鉴定成功^[13]。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增、测序结果及序列特征

PCR 扩增、测序结果及各序列相关信息见表 3。3 组叶绿体条形码序列中, *trnH-psbA* 的扩增和测序成功率均达到 100%; *rbcL* 的扩增成功率为 100%, 有 2 个个体测序失败, 即测序成功率为 97.5%; *matK* 的扩增成功率为 88.6%, 扩增成功的个体全部成功测序。ITS2 仅 41 个样品扩增成功, 即扩增成功率为 51.9%, 其中 2 个个体测序失败, 最终仅得到 39 条序列。扩增失败的样品经调整扩增反应条件(退火温度、酶及引物、模板 DNA 量等)后电泳, 仍未检测到明亮、单一的扩增产物条带。

3 组叶绿体序列比对后的长度为 499~751 bp, 变异位点和信息位点含量分别为 1.5%~4.53% 和 1.2%~1.86%, 其中 *matK* 序列长度最长, 且变异和

信息位点含量均为最高。玉竹有 9 个个体(BS73~75、BS77、2020_13~17)的 *trnH-psbA* 序列在 60~67 bp 位置发生 8 bp 的倒位(GTTTTCAT→ATGAAAAC)。

3.2 Wilcoxon 符号秩检验

Wilcoxon 符号秩检验结果见表 4, 3 组叶绿体序列的种间变异由大到小依次为 *matK*>*trnH-psbA*>*rbcL*, 而种内差异不显著, 即 *matK*=*trnH-psbA*=*rbcL*。

3.3 Barcoding gap 检验

Barcoding gap 检验结果见图 1, 所有 7 组条形码序列的种间、种内遗传距离均存在一定程度重叠, 即没有明显的 Barcoding gap 存在。种内距离分布较为集中, 主要在 0~0.004, 种间遗传距离相对离散, 主要在 0.003~0.01, 序列联合分析的种间、种内遗传距离重叠程度小于独立分析。

表 3 PCR 扩增、测序结果及比对后各组序列特征

Table 3 Results of PCR amplification, sequencing and characteristics of each aligned sequence

序列	成功扩增样品数	成功测序样品数	比对后的序列	变异位点数	简约信息位点数	种内 K2P 距离	种间 K2P 距离
	(成功率/%)	(成功率/%)	长度/bp	(占比/%)	(占比/%)	(平均距离)	(平均距离)
ITS2	41 (51.9)	39 (95.1)	/	/	/	/	/
<i>trnH-psbA</i>	79 (100)	79 (100)	533	8 (1.50)	7 (1.31)	0~0.003 2 (0.000 7)	0~0.009 8 (0.005 0)
<i>matK</i>	70 (88.6)	70 (100)	751	34 (4.53)	14 (1.86)	0~0.008 9 (0.001 7)	0.000 2~0.013 9 (0.006 7)
<i>rbcL</i>	79 (100)	77 (97.5)	499	9 (1.80)	6 (1.20)	0~0.002 1 (0.000 4)	0~0.008 8 (0.002 4)

表 4 *TrnH-psbA*、*matK* 及 *rbcL* 序列的种间、种内变异 Wilcoxon 符号秩检验

Table 4 Wilcoxon signed-rank tests of interspecific and intraspecific divergences among *trnH-psbA*, *matK* and *rbcL*

变异类型	正秩 W ⁺	负秩 W ⁻	秩和		N 值	P 值	结果
			正秩 W ⁺	负秩 W ⁻			
种间	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i>	1619.00	272.00	66	≤0.001	<i>trnH-psbA</i> > <i>rbcL</i>
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	2042.00	169.00	66	≤0.001	<i>matK</i> > <i>rbcL</i>
	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	1709.00	502.00	66	≤0.001	<i>matK</i> > <i>trnH-psbA</i>
种内	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i>	15.00	6.00	12	0.345	<i>trnH-psbA</i> = <i>rbcL</i>
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	44.00	11.00	12	0.092	<i>matK</i> = <i>rbcL</i>
	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	32.00	13.00	12	0.260	<i>matK</i> = <i>trnH-psbA</i>

3.4 物种鉴定分辨率

2 种分析方法所得的各条形码的物种鉴定分辨率见表 5。建树法分析结果中, 独立及联合分析的分辨率为 8.33%~25.00%, 成功鉴定 1~3 个物种。其中, *trnH-psbA* 和 *matK* 序列分别以 74% 和 85% 的支持率支持黄精种内所有个体聚为单系, 与其他物种区分开来, *rbcL* 序列分析结果支持长梗黄精所有个体单独构成一个单系, 与其他物种相区

别, 支持率为 94%。联合分析中, 2 个条形码组合 *trnH-psbA*+*matK*、*trnH-psbA*+*rbcL* 及 *matK*+*rbcL* 成功鉴别的物种数均为 2 个, 依次分别为滇黄精(支持率为 51%)和黄精(97%)、长梗黄精(95%)和滇黄精(80%)及长梗黄精(57%)和黄精(88%), 鉴定成功率为 16.66%。而长梗黄精、滇黄精和黄精 3 个物种同时被 *trnH-psbA*+*matK*+*rbcL* 组合成功鉴定, 支持率依次为 94%、69% 和 96% (图 2)。

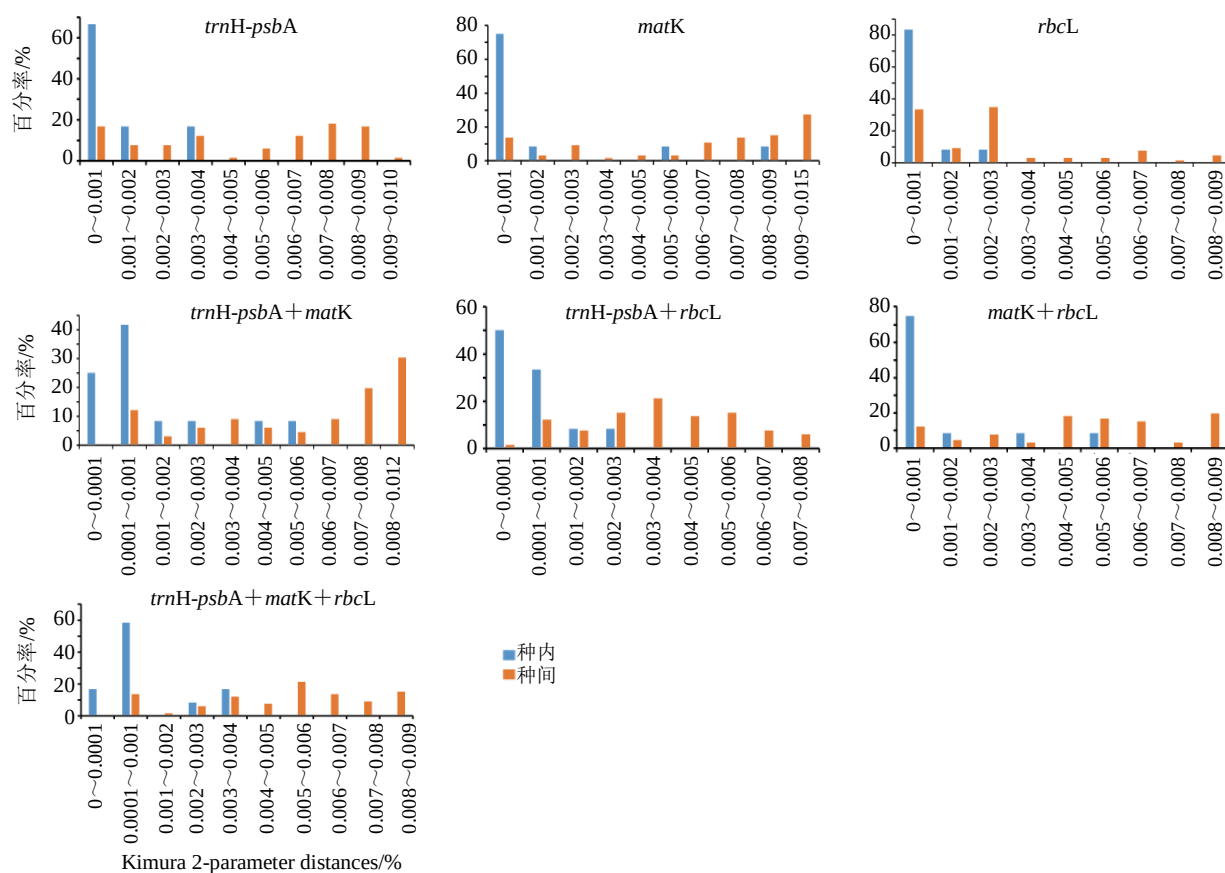


图 1 各条形码序列及其不同组合的种内、种间遗传距离分布图

Fig. 1 Percentage distribution of interspecific and intraspecific K2P distance of each barcode sequence and sequence combination. Values in X-axis mean K2P distance, and in Y-axis correspond to percentage of occurrence

表 5 基于建树法和 PWG 距离法分析的各条形码序列及其不同组合的物种鉴定分辨率

Table 5 Species resolution of each barcode sequence and sequence combination based on tree-based method and PWG-distance method

条形码序列	序列数量/ 物种数量	建树法		PWG 距离法	
		分辨率/%	被鉴定的物种 (靴带支持率/%)	分辨率/%	被鉴定的物种
<i>trnH-psbA</i>	79/12	8.33	黄精 (74)	8.33	滇黄精
<i>matK</i>	70/12	8.33	黄精 (85)	41.67	多花黄精、长梗黄精、滇黄精、 新疆黄精、黄精
<i>rbcL</i>	77/12	8.33	长梗黄精 (94)	16.66	长梗黄精、滇黄精
<i>trnH-psbA+matK</i>	70/12	16.66	滇黄精 (51)、黄精 (97)	41.67	多花黄精、长梗黄精、滇黄精、 新疆黄精、黄精
<i>trnH-psbA+rbcL</i>	77/12	16.66	长梗黄精 (95)、滇黄精 (80)	50.00	多花黄精、长梗黄精、二苞黄精、 滇黄精、新疆黄精、轮叶黄精
<i>matK+rbcL</i>	69/12	16.66	长梗黄精 (57)、黄精 (88)	41.67	多花黄精、长梗黄精、滇黄精、 新疆黄精、黄精
<i>trnH-psbA+matK+rbcL</i>	69/12	25.00	长梗黄精 (94)、滇黄精 (69)、 黄精 (96)	41.67	多花黄精、长梗黄精、滇黄精、 新疆黄精、黄精

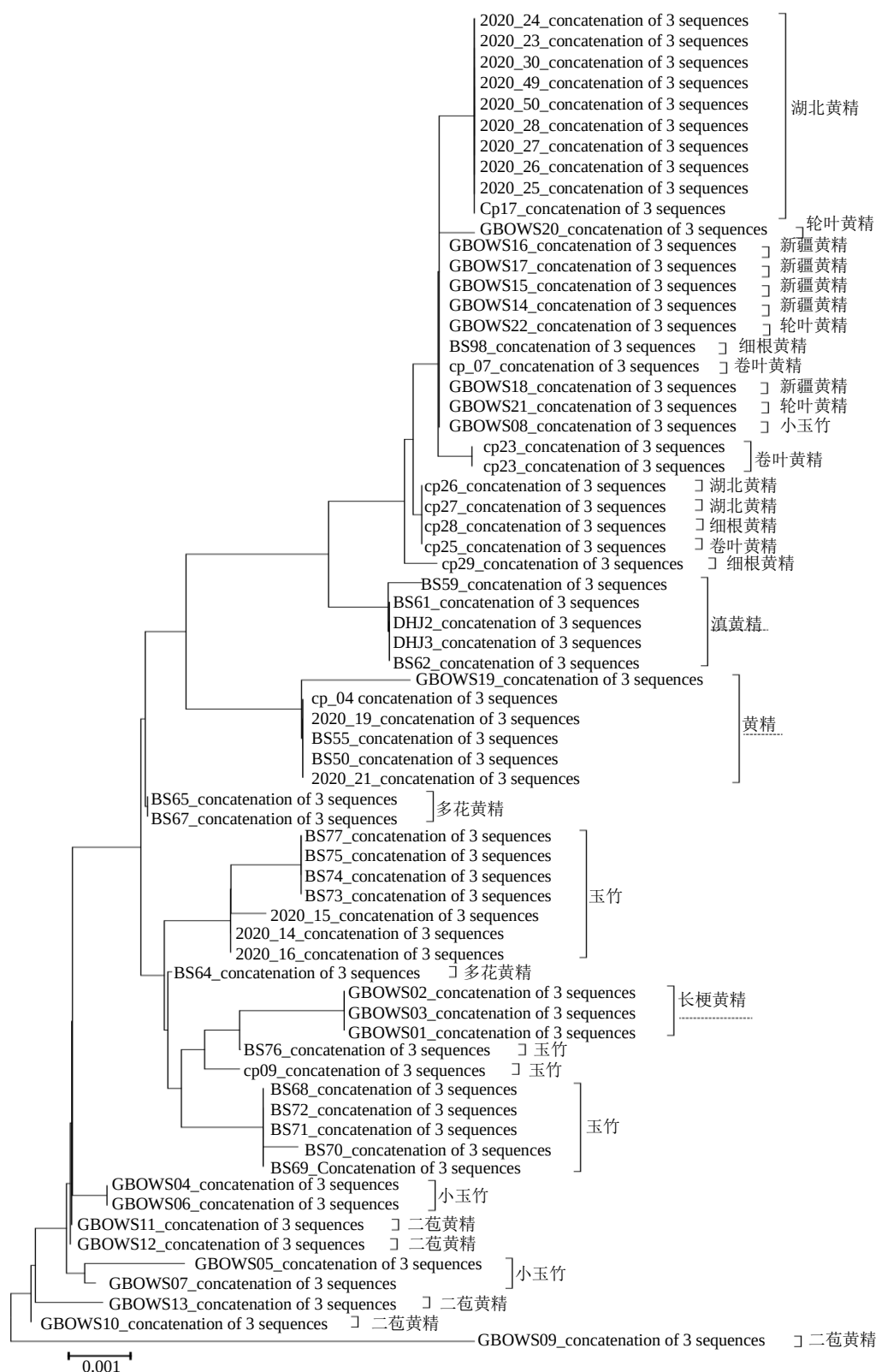


图 2 *TrnH-psbA*、*matK* 和 *rbcL* 序列联合分析构建的邻接系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree constructed by joint analysis of *trnH-psbA*, *matK* and *rbcL*

PWG 距离法分析的物种鉴定分辨率为 8.33%~50%，成功鉴定的物种数为 1~6 个。3 个条形码独立分析的物种鉴定成功率依次为 41.67% (*matK*)、16.66% (*rbcL*) 和 8.33% (*trnH-psbA*)。组合条形码中，*trnH-psbA+rbcL* 共包含 12 种 77 个个体，其中，多花黄精、长梗黄精、二苞黄精、滇黄精、新疆黄精和轮叶黄精 6 个物种的种内最大遗传距离均小于其与其他物种间的最小遗传距离而被成功鉴定，其余条形码组合成功鉴定的物种数量均为 5 个 (41.67%)。

4 讨论

通用性高、测序质量好、物种分辨率高是评价 DNA 条形码序列的重要指标^[13-14]。本研究结果中，3 个叶绿体条形码序列 *trnH-psbA*、*matK*、*rbcL* 的 PCR 扩增成功率分别为 100%、88.6% 和 100%，除 *rbcL* 有 2 个个体测序失败外，其余扩增成功的个体全部成功测序，说明这 3 条序列的引物在黄精属植物中通用性较好。

Chen 等^[15]对药用植物 (包括藻类、真菌及高等植物) 753 属 4800 种 6600 个代表个体的分析结果表明，ITS2 序列在物种水平的鉴定率高达 92.7%，因此推荐将 ITS2 作为药用植物分子鉴定的标准 DNA 条形码序列。然而，ITS/ITS2 在一些类群中仍然存在难以成功扩增和测序的问题^[31]，黄精属便是这样一个类群。本研究结果显示，ITS2 的 PCR 扩增成功率远低于其他 3 个叶绿体序列，仅为 51.9%，调整扩增反应条件后仍未得到改善，79 个个体最终只成功测序获得 39 条序列。Jiao 等^[23]对不同产地来源中药材黄精样品及其混伪品的分子鉴定研究也发现 ITS2 序列不能被特异性扩增成功，杨培等^[7]对黄精属药用植物的分子鉴定研究亦曾得出相似的结论。PCR 扩增结果主要受到引物通用性和实验材料个体序列变异的影响。研究表明，利用基因组浅层测序 (genome skimming) 方法可以有效避免这些问题而获取核基因组中的 ITS 序列^[30, 32]，这将是解决黄精属分子鉴定及相关研究中 ITS2 序列获取问题的一个新选择。

理想的 DNA 条形码序列种内遗传距离应明显小于种间，即具有明显的 Barcoding gap，而本研究所有 7 组条形码序列的种间、种内遗传距离均存在一定程度重叠，无明显的 Barcoding gap。此外，在建树法分析结果中，*trnH-psbA+matK+rbcL* 组合的物种鉴定成功率最高，为 25%，即所有 12 个物

种中仅 3 个物种被同时成功鉴定；*trnH-psbA+rbcL* 组合在距离法中的物种分辨率最高，为 50%，仅 6 个物种被同时成功鉴定。说明叶绿体序列 *trnH-psbA*、*matK*、*rbcL* 及其组合都并非黄精属药用植物不同种间有效区分鉴定的理想分子标记。尽管如此，从本研究两种分析结果可以明显看出，随着序列数量的增加，物种鉴定分辨率也相应提高。建树法分析结果中，3 个叶绿体序列独立分析的物种鉴定分辨率均为 8.33% (1/12)，两两组合 (*trnH-psbA+matK*、*trnH-psbA+rbcL*、*matK+rbcL*) 后分辨率提高为 16.66% (2/12)，*trnH-psbA+matK+rbcL* 三者联合分析的物种鉴定分辨率提高至 25% (3/12)。距离法分析结果中 *matK* 独立分析的物种分辨率最高，为 41.67%，*trnH-psbA* 和 *rbcL* 分别为 16.66% 和 8.33%，而序列组合 *trnH-psbA+rbcL* 的物种分辨率提高至 50%。说明多个条形码序列联合分析能够提供更多的物种演化信息位点，在一定程度上提高物种鉴定分辨率，这也与五味子科^[17]、地黄属 *Rehmannia* Libosch. ex Fisch. & C. A. Mey.^[33] 等药用植物类群的 DNA 条形码分子鉴定研究结果一致。

被子植物叶绿体基因组大小一般在 115~165 kb，编码约 110~130 个基因，由于其序列进化速率适中，极少发生重组、基因含量和顺序高度保守，而所包含的物种演化信息量远大于单一或多个普通的 DNA 条形码序列，作为“超级条形码 (ultra-barcode)”，近年来，在药用植物分子鉴定研究中广泛应用。如 Zhang 等^[34]利用叶绿体全基因组序列将通用 DNA 条形码 *matK+rbcL*、ITS + *trnH-psbA* 联合分析未能区分鉴定的菊科 Compositae 紫锥菊属 *Echinacea* Moench 9 个物种有效鉴别开来，为具有药用价值的紫锥菊 *E. purpurea* (L.) Moench、狭叶紫锥菊 *E. angustifolia* DC. 和白色紫锥菊 *E. pallida* (Nutt.) Nutt. 及其混伪品的准确鉴定提供了可靠依据。Zhu 等^[35]利用叶绿体全基因组序列将 ITS2 及 *matK+rbcL* 均不能有效区分鉴定的名贵中药材铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 与其同属 5 个近缘物种黄石斛 *D. tosaense* Makino、始兴石斛 *D. shixingense* Z. L. Chen, S. J. Zeng & J. Duan、曲茎石斛 *D. flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sun & L. G. Xu、滇桂石斛 *D. scoriarum* W. W. Sm. 和钩状石斛 *D. aduncum* Wall. ex Lindl. 以 ≥99% 的分辨率成功鉴定，为铁皮石斛的入药安全性和有效性

提供了重要保障。Yin 等^[36]的研究结果也表明利用叶绿体全基因组序列可以将蔷薇属 *Rosa* L. 药用植物金樱子 *R. laevigata* Michx.、玫瑰 *R. rugosa* Thunb.、犬蔷薇 *R. Canina* L. 以及月季花 *R. chinensis* Jacq. 与同属其他物种有效区分鉴别。此外, Flodena 等^[37]对黄精属 19 个代表物种的分子系统发育分析也进一步表明, 相比于单个或少数几个基因序列的分析结果, 利用叶绿体基因组中的全部蛋白编码基因序列联合分析所得的系统发育树分辨率明显提高。因此, 叶绿体全基因组序列将有可能是解决黄精属药用植物种间鉴定困难问题的一条有效途径, 有待后续进一步研究验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen X Q, Tamura M N. *Liliaceae in Flora of China: vol 24* [M]. Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2000: 225-235.
- [2] 艾铁民. 中国药用植物志 (第十一卷) [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2014: 277-306.
- [3] 张娇, 王元忠, 杨维泽, 等. 黄精属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 1989-2008.
- [4] 姜程曦, 张铁军, 陈常青, 等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 1-16.
- [5] Zhao X Y, Li J. Chemical constituents of the genus *Polygonatum* and their role in medicinal treatment [J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(4): 683-688.
- [6] Meng Y, Nie Z L, Deng T, et al. Phylogenetics and evolution of phyllotaxy in the Solomon's seal genus *Polygonatum* (Asparagaceae: Polygonateae) [J]. *Bot J Linn Soc*, 2014, 176(4): 435-451.
- [7] 杨培, 周红, 辛天怡, 等. 黄精属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 世界中医药, 2015, 10(8): 1173-1176.
- [8] Zhao L H, Zhou S D, He X J. A phylogenetic study of Chinese *Polygonatum* (Polygonateae, Asparagaceae) [J]. *Nord J Bot*, 2019, 37(2): njb.02019.
- [9] Zhao L H, Zhou S D, He X J, et al. A cytotoxic analysis of Chinese *Polygonatum* (Asparagaceae) species [J]. *Nord J Bot*, 2014, 32(4): 441-451.
- [10] Wang J J, Yang Y P, Sun H, et al. The biogeographic south-north divide of *Polygonatum* (Asparagaceae tribe polygonateae) within eastern Asia and its recent dispersals in the Northern Hemisphere [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166134.
- [11] 林琳, 林寿全. 黄精属药用植物聚类分析 [J]. 中药材, 1994, 17(6): 12-18, 54.
- [12] 陈士林, 庞晓慧, 罗焜, 等. 生物资源的 DNA 条形码技术 [J]. 生命科学, 2013, 25(5): 451-459.
- [13] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *PNAS*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [14] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [15] 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): e8613.
- [16] Chao Z, Zeng W P, Liao J, et al. DNA barcoding Chinese medicinal *Bupleurum* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(13): 1767-1773.
- [17] Zhang J, Chen M, Dong X Y, et al. Evaluation of four commonly used DNA barcoding Loci for Chinese medicinal plants of the family Schisandraceae [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125574.
- [18] 任瑶瑶, 蔡子君, 赵梅宇, 等. 基于 ITS2 条形码的乌头属藏药植物鉴别 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4614-4620.
- [19] 吕瑞华, 冯昭, 马添翼, 等. 陕西关中野生商陆资源的 ITS2 和 psbA-trnH 条形码序列研究 [J]. 药学学报, 2020, 55(8): 1951-1956.
- [20] 袁伯川, 李文东, 马永生, 等. 柴胡属药用植物的分子鉴定及市售柴胡药材的质量调查 [J]. 药学学报, 2017, 52(1): 162-171.
- [21] 辛天怡, 娄千, 郝利军, 等. 市售中药饮片 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学学报, 2021, 56(3): 879-889.
- [22] 熊瑶, 金晨, 王晓云, 等. 鸡血藤及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(12): 3274-3283.
- [23] Jiao J, Huang W L, Bai Z Q, et al. DNA barcoding for the efficient and accurate identification of medicinal *polygonati rhizoma* in China [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0201015.
- [24] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A] // *PCR Protocols* [M]. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [25] Tate J A, Simpson B B. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species [J]. *Syst Bot*, 2003, 28(4): 723-737.
- [26] Sang T, Crawford D, Stuessy T. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *Am J Bot*, 1997, 84(8): 1120.
- [27] 高连明, 刘杰, 蔡杰, 等. 关于植物 DNA 条形码研究技术规范 [J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(6): 592-606.

- [28] Kress W J, Erickson D L. 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): e508.
- [29] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [30] Fu C N, Mo Z Q, Yang J B, *et al.* Testing genome skimming for species discrimination in the large and taxonomically difficult genus *Rhododendron* [J]. *Mol Ecol Resour*, 2022, 22(1): 404-414.
- [31] Hollingsworth P M. Refining the DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19451-19452.
- [32] Hollingsworth P M, Li D Z, van der Bank M, *et al.* Telling plant species apart with DNA: From barcodes to genomes [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016, 371(1702): 20150338.
- [33] 程芳婷, 李忠虎, 刘春艳, 等. 地黄属植物的 DNA 条形码研究 [J]. *植物科学学报*, 2015, 33(1): 25-32.
- [34] Zhang N, Erickson D L, Ramachandran P, *et al.* An analysis of *Echinacea* chloroplast genomes: Implications for future botanical identification [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 216.
- [35] Zhu S Y, Niu Z T, Xue Q Y, *et al.* Accurate authentication of *Dendrobium officinale* and its closely related species by comparative analysis of complete plastomes [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(6): 969-980.
- [36] Yin X M, Liao B S, Guo S, *et al.* The chloroplasts genomic analyses of *Rosa laevigata*, *R. rugosa* and *R. canina* [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 18.
- [37] Flodena A, Schillingb E E. Using phylogenomics to reconstruct phylogenetic relationships within tribe Polygonateae (Asparagaceae), with a special focus on *Polygonatum* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2018, 129: 202-213.

[责任编辑 时圣明]