

• 药材与资源 •

北柴胡特异 DNA 条形码筛选及种质资源鉴定

王 馨¹, 尹光耀¹, 张志飞¹, 陈 颖¹, 刘珊瑚¹, 满金辉¹, 石 玥¹, 黄钰莹¹, 张晓芹¹, 王晓晖^{2*}, 魏胜利^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学中药研究院, 北京 100029

摘 要: **目的** 基于北柴胡 *Bupleurum chinense* 叶绿体基因组筛选特异性 DNA 条形码, 并利用特异 DNA 条形码鉴定不同产地北柴胡种质资源。**方法** 利用 Illumina HiSeq X Ten 平台对北柴胡进行叶绿体基因组测序, 利用 mVISTA 软件和核酸多样性分析筛选特异性片段, 基于特异性片段进一步分析不同产区北柴胡样品单倍型。**结果** 不同产地 3 份北柴胡叶绿体基因组全长为 155 557~155 959 bp, 均呈现典型的环状四分体结构, 均编码 131 个基因。*trnV-UAC*、*trnC-GCA_petN*、*petN-psbM*、*ndhF_rpl32* 可以作为潜在的北柴胡种质资源鉴定的特异性 DNA 条形码。基于扩增效率, 选择 *petN-psbM* 和 *ndhF_rpl32* 对来自 4 省 7 个产地 177 份北柴胡样品进行序列分析, 结果表明 *petN-psbM* 和 *ndhF_rpl32* 分别有 91 和 78 个变异位点, 分别鉴定到 28、29 个单倍型; 两段序列联合分析形成 40 个单倍型 (Hap1~Hap40), 各单倍型的遗传距离为 0~0.022。6 个产地拥有特有单倍型, 可以将不同产地的北柴胡种质资源进行区分。**结论** 利用比较叶绿体基因组学筛选的特异 DNA 条形码 *petN-psbM* 和 *ndhF_rpl32* 可以用于北柴胡种内种质资源鉴定, 为后续鉴定北柴胡的产地来源、种质资源保护利用和育种等工作奠定基础。

关键词: 北柴胡; 叶绿体基因组; 序列对比; 种质资源; DNA 条形码

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)17-5703-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.023

Screening of specific DNA barcoding and identification of germplasm resources of *Bupleurum chinense*

WANG Xin¹, YIN Guang-yao¹, ZHANG Zhi-fei¹, CHEN Ying¹, LIU Shan-hu¹, MAN Jin-hui¹, SHI Yue¹, HUANG Yu-ying¹, ZHANG Xiao-qin¹, WANG Xiao-hui², WEI Sheng-li¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To screen the specific DNA barcodes based on Beichaihu (*Bupleurum chinense*) chloroplast genome, so as to identify the plasm resource of *B. chinense* from different producing areas. **Methods** The Illumina HiSeq X Ten platform was used to sequence the chloroplast genome of three samples of *B. chinense*. Specific DNA barcodes was analyzed with mVISTA soft and nucleotide polymorphism analysis. The haplotype of *B. chinense* from different producing areas was identified with specific DNA barcodes. **Results** The total length of chloroplast genomes of three samples from different habitats was 155 557—155 959 bp, all of which had typical circular tetrad structure and coded 131 genes. *trnV-UAC*, *trnC-GCA_petN*, *petN-psbM* and *ndhF_rpl32* can be used as specific DNA barcodes for identification of potential germplasm resources of *B. chinense*. Based on amplification efficiency, *petN-psbM* and *ndhF_rpl32* were selected to analyse the sequence of 177 samples of *B. chinense* from seven places in four provinces. The results showed that *petN-psbM* and *ndhF_rpl32* had 91 and 78 mutation loci, and 28 and 29 haplotypes were identified; The two sequences were analyzed together to form 40 haplotypes (Hap1—Hap40), and the genetic distance of each

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 北京市科学技术委员会基金项目 (Z201100005420005); 北柴胡精准药材批次分子防伪技术研究项目 (2020071720419)

作者简介: 王 馨 (1999—), 硕士, 主要从事中药资源与分子生药学研究。Tel: 18813062869 E-mail: nz18813062869@163.com

*通信作者: 王晓晖, 副研究员, 主要从事中药活性成分生物合成调控研究。Tel: 18810722975 E-mail: wangxhui2014@163.com

魏胜利, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源研究。Tel: 13683336930 E-mail: wsl7491@126.com

haplotype was 0—0.022. Six producing areas had unique haplotypes, which can distinguish the germplasm resources of *B. chinense* from different producing areas. **Conclusion** The specific DNA barcodes *petN_psbM* and *ndhF_rpl32*, identified by *B. chinense* chloroplast genome analysis, could be used to demonstrate the genotypes of *B. chinense*, which provides values for the identification of *B. chinense* producing area, the protection and utilization of germplasm resources and breeding work.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; chloroplast genome; sequence comparison; germplasm resources; DNA barcoding

柴胡 *Bupleuri Radix* 具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气之功效，是最常用的大宗药材之一。《中国药典》2020 年版^[1]规定柴胡为伞形科柴胡属药用植物北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡（红柴胡）*B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根。北柴胡是中药柴胡的主要来源，现代药理学作用研究表明其具有多种药理活性，如解热、镇静催眠、抗炎保肝、抗病毒、抗肿瘤和正向调节免疫等功能^[2-8]。因此对北柴胡进行种质资源鉴别，对于北柴胡的质量控制、安全合理利用及开展相关的研究具有重要意义。

叶绿体是一种拥有自身遗传物质的多功能细胞器，叶绿体基因组与核基因组和线粒体基因组相比，依赖母系遗传，相对分子质量较小，基因组成和结构相对保守，叶绿体基因组包含的大量遗传信息被广泛应用于植物分子进化及系统发育的研究^[9-10]。随着高通量测序技术和生物信息学的快速发展，多种植物的叶绿体基因组已经解析。目前柴胡属的北柴胡、紫花阔叶柴胡 *B. boissieuianum* H. Wolff、竹叶柴胡 *B. marginatum* Wall. ex DC.、红柴胡、长茎柴胡 *B. longicaule* Wall. ex DC. 等^[11-15]物种的叶绿体基因组已有研究报道，但是种内叶绿体比较基因组学相关研究鲜有报道。

DNA 条形码是有关物种鉴定的新技术，通过用标准化的、较短的 DNA 序列作为条形码，实现对物种进行快速、准确的鉴定^[16]，是传统性状鉴定和理化鉴定方法的有效补充。如 *matK* 能够鉴别大黄不同基原及混伪品^[17]；而 *ITS*、*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL* 等条形码为柴胡属植物的分类鉴定与系统学研究提供了重要依据^[18]。随着叶绿体基因组测序技术和叶绿体比较基因组学的发展，通过比较叶绿体基因组序列差异获得不同物种或不同基原的特异 DNA 条形码也变得切实可行，如利用

叶绿体基因组及比较基因组学方法获得鉴定唐古特大黄、药用大黄和掌叶大黄的特异性条形码为 *rps16-trnQ*、*psaA-ycf3*、*psbE-petL*、*ndhF-rpl32* 以及 *trnT-trnL*^[19]。基于叶绿体基因组测序和比较基因组学获得黄芩的突变位点最多的 3 个特异 DNA 条形码 *petA-psbJ*、*ycf4-cemA*、*trnH-psbA*，利用 3 段叶绿体基因组 DNA 的联合分析对黄芩的野生居群展开研究，共发现 29 个变异位点，形成 50 个单倍型^[20]。但是目前基于北柴胡叶绿体比较基因组学的特异 DNA 条形码研究还未见报道，因此本研究选取不同产地的 3 个北柴胡样品进行叶绿体测序，进行比较基因组学研究，筛选特异性 DNA 条形码，并利用筛选的特异 DNA 条形码对 4 省 7 产地 177 份北柴胡样品进行种质资源鉴定，为后续北柴胡种质筛选、质量控制及相关的研究奠定基础。

1. 材料与仪器

1.1 材料

用于叶绿体全基因组测序的北柴胡样品分别采自辽宁省朝阳市、陕西省宝鸡市和河南省洛阳市（表 1）；用于种质资源鉴定的 7 个产地 177 份样品来源及单倍型分布如表 2 所示。所用样品经北京中医药大学魏胜利教授鉴定为北柴胡 *B. chinense* DC.。

1.2 仪器

GL-88B 型涡旋器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；HH-S4A 型电热恒温水浴锅（北京科伟永兴仪器有限公司）；TGL-16 型冷冻高速离心机（湘仪离心机仪器有限公司）；NanoDrop one 型超微量分光光度计（Thermo Fisher）；JY300E 型电泳仪（北京君意东方电泳设备有限公司）；WD-9413B 型凝胶成像仪（北京六一生物科技有限公司）。

表 1 北柴胡叶绿体全基因组测序样品来源

Table 1 Source of chloroplast whole genome sequencing samples from *B. chinense*

名称	采集地点	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m
北柴胡 1	辽宁省朝阳市朝阳县台子镇孙丈子村	120°16'46.44"	41°40'91.13"	753
北柴胡 2	陕西省宝鸡市	106°18'00.00"	33°35'00.00"	813
北柴胡 3	河南省洛阳市嵩县车村镇龙池峰村	112°43'44.68"	34°63'04.10"	1539

表 2 7 个产地 177 份北柴胡样品来源及单倍型分布

Table 2 Source and haplotype distribution of 177 samples of *B. chinense* from seven regions

编号	样品来源	单倍型类型 (数量)
HNLY1~HNLY28	河南省洛阳市	Hap1(11)、Hap2(11)、Hap3(3)、Hap4(1)、Hap5(1)、Hap6(1)
HBQHD1~HBQHD23	河北省秦皇岛市	Hap7(9)、Hap8(9)、Hap9(2)、Hap10(2)、Hap11(1)
SXLFHM1~SXLFHM53	山西省临汾市侯马市	Hap2(3)、Hap5(4)、Hap6(1)、Hap12(1)、Hap13(1)、Hap14(8)、Hap15(1)、Hap16(6)、 Hap17(7)、Hap18(3)、Hap19(5)、Hap20(2)、Hap21(2)、Hap22(1)、Hap23(1)、 Hap24(1)、Hap25(1)、Hap26(1)、Hap27(3)、Hap28(1)
SXXZ1~SXXZ9	山西省新绛县西庄村	Hap17(2)、Hap24(1)、Hap29(1)、Hap30(1)、Hap31(2)、Hap32(1)、Hap33(1)
SXGJ1~SXGJ4	山西省新绛县古交村	Hap17(1)、Hap27(1)、Hap30(1)、Hap34(1)
SXBJ1~SXBJ18	陕西省宝鸡市	Hap1(1)、Hap2(1)、Hap5(1)、Hap12(2)、Hap19(1)、Hap30(2)、Hap31(1)、Hap32(2)、 Hap34(1)、Hap35(3)、Hap36(1)、Hap37(1)、Hap38(1)
SXSL1~SXSL42	陕西省商洛市商州区代街村	Hap1(22)、Hap2(16)、Hap5(1)、Hap14(1)、Hap39(1)、Hap40(1)

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取与测序

利用 FastPure® Plant DNA Isolation Mini Kit (诺唯赞) 提取植物总 DNA, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 超微量分光光度计检测 DNA 浓度。检测合格的基因组总 DNA 构建插入片段长度约 350 bp 的文库, 利用 Illumina HiSeq X Ten 平台进行序列读长为 150 bp 的双端测序, 并对原始序列进行 4 步处理, 分别是去除质量值连续 ≤ 20 的碱基数达到 40% 的 reads、去除含 N 的碱基数目总和达到 10% 的 reads、去除 adapter 污染和去除 duplication 污染, 得到高质量待分析序列 (clean reads)。

2.2 叶绿体基因组组装、拼接和注释

使用 NOVOPlasty 将待分析序列组装成完整的叶绿体基因组, 采用 PGA 软件进行组装结果进行注释 (默认参数)。采用 BWA 将待分析序列比对北柴胡参考基因组 (NC_046774) 的叶绿体基因组序列, 利用在线软件 tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 确定所有 tRNA 基因的边界, 并通过 CLC Sequence Viewer 8 人工检查确保组装无误。利用 Organellar Genome DRAW (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>) 在线绘制叶绿体全基因组图谱。

2.3 重复序列分析

利用 REPuter (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer>) 检测叶绿体全基因组序列中的分散重复序列, 参数设置为最小重复序列长度为 30 bp, 重复序列间的相似度 $> 90\%$ 。串联重复序列利用 Tandem repeats finder 软件 (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) 进行检测,

参数选择默认值。利用 MISA 软件 (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 检测简单重复序列位点类型与数目, 对于单、二、三、四、五和六核苷酸重复序列, 重复次数的最小值分别设置为 10、5、4、3、3 和 3, 2 个 SSR 之间最小距离设置为 100 bp。

2.4 叶绿体基因组比较分析

利用 mVISTA 在线软件对测序获得 3 份叶绿体基因组进行全局比对分析, 利用 Dna SP 6 软件检测 3 条叶绿体基因组的核苷酸多样性 (nucleotide polymorphism, P_i)。

2.5 高变区域扩增、遗传距离分析与进化树构建

为利用高变区基因对不同产区的种质资源进行分析, 以高变区基因为模板设计引物, 对收集到的 7 个产区 177 份样品进行 PCR 扩增分析。PCR 混合体系共 50 μL , 包括 ddH₂O 37 μL , 10 $\times$ Buffer 5 μL , dNTP 4 μL , 引物-F 1 μL , 引物-R 1 μL , DNA 模板 0.5 μL , 0.1%BSA 1 μL , TaKaRa Taq 0.5 μL 。扩增程序为 93 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 30 个循环 (93 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 44.4 或 36.8 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s), 70 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 同时根据不同的引物设定不同的退火温度 (表 3)。通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳和 FastPure® Gel DNA Extraction Mini Kit (诺唯赞) 对 PCR 产物进行纯化, 纯化后的产物送北京六合华大公司进行双向测序。

利用 DNAMAN 和 Chromas 软件对测序结果进行核对和单倍型汇总。将汇总后的单倍型序列通过 mafft 软件进行比对。比对后的序列通过 MEGA X 软件计算单倍型间的遗传距离, 构建邻接法系统进化树, 设置 bootstrap 重复值为 1000。

表 3 北柴胡 2 个基因引物信息
Table 3 Primer information of two genes of *B. chinense*

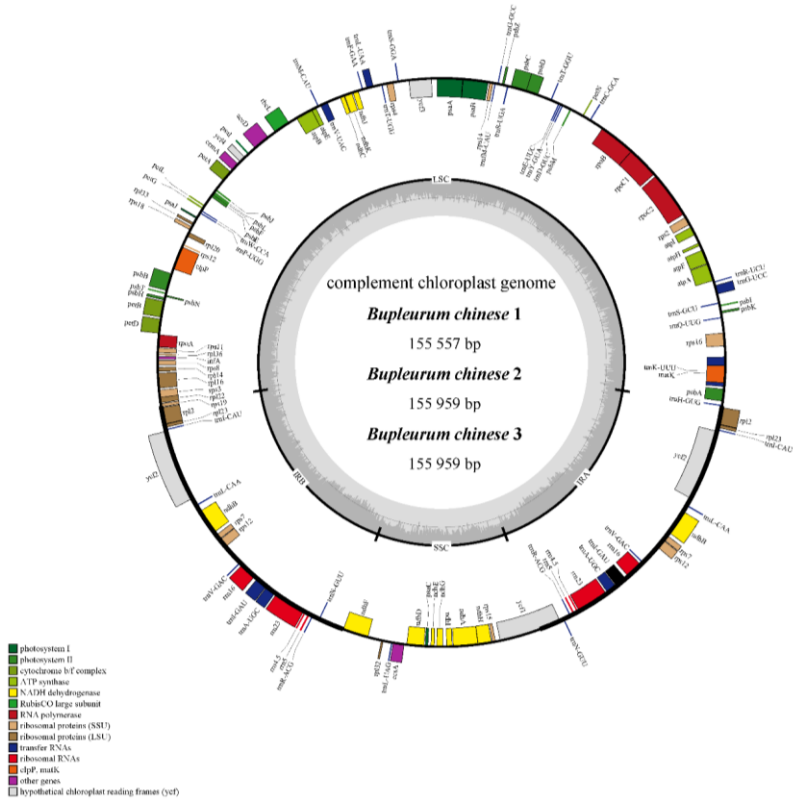
基因名	引物名称	碱基序列	退火温度/℃
<i>petN_psbM</i>	<i>petN_psbM</i> -F	5'-AGGTACTACGAATTGATTGAGGAATC-3'	44.4
	<i>petN_psbM</i> -R	5'-TTAATTTTAATTAATGTTTACTTCTG-3'	
<i>ndhF_rpl32</i>	<i>ndhF_rpl32</i> -F	5'-AAAAAAAGTTTTTTTCTTAATTAAT-3'	36.8
	<i>ndhF_rpl32</i> -R	5'-TTTAAATGAAGAGGTTACTCGTTG-3'	

3 结果与分析

3.1 叶绿体全基因组测序、序列组装与拼接注释

将北柴胡 1、北柴胡 2 和北柴胡 3 的测序结果过滤去除低质量序列和接头序列等杂质,分别得到 30 038 384 条 (4.50 Gb)、29 684 332 条 (4.45 Gb) 和 27 841 256 条 (4.18 Gb) clean reads。将 3 份北柴胡叶绿体全基因组组装拼接后均得到完整的环状四分体结构,序列总长度分别为 155 557、155 959 和 155 959 bp。环状四分体结构由 1 个大单拷贝区 (large single copy area, LSC)、1 个小单拷贝区 (small

single copy region, SSC) 和 2 个反向重复区 (inverted repeat regions, IRA 和 IRB) 组成,其中 LSC 长度分别为 85 431、85 831、85 831 bp, SSC 长度均为 17 546 bp, IRs 长度分别为 26 290、26 291 和 26 291 bp (图 1)。北柴胡 2 和北柴胡 3 的叶绿体全基因组序列及 LSC、SSC 和 IRs 的 GC 含量均相同,分别为 37.68%、35.80%、31.48%和 42.81%。北柴胡 1 的叶绿体全基因组序列及 LSC、SSC 和 IRs 的 GC 含量依次为 37.69%、35.83%、31.43%和 42.81% (表 4)。



外圈基因逆时针转录,内圈基因顺时针转录;彩色条表示不同的功能组;内圈较深的灰色区域表示 GC 含量,而较浅的灰色对应于基因组的 AT 含量。LSC-大单拷贝区 SSC-小单拷贝区域 IRA 和 IRB-反向重复区
Genes in the outer circle are transcribed counterclockwise, and genes in the inner circle are transcribed clockwise; Color bars represent different functional groups. The darker gray area in the inner circle indicates the GC content, while the lighter gray corresponds to the AT content of the genome
LSC-large single copy area SSC-small single copy region IRA and IRB-inverted repeat regions

图 1 3 份北柴胡的叶绿体全基因组图
Fig. 1 Three complete chloroplast genome maps of *B. chinense*

表 4 3 份北柴胡的叶绿体基因组特征概述

Table 4 Summary of chloroplast genome characteristics of three *B. chinense*

样本	全基因组		LSC		SSC		IRs		CDS	
	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%
北柴胡 1	155 557	37.69	85 431	35.83	17 546	31.43	52 580	42.81	77 793	38.20
北柴胡 2	155 959	37.68	85 831	35.80	17 546	31.48	52 582	42.81	77 793	38.21
北柴胡 3	155 959	37.68	85 831	35.80	17 546	31.48	52 582	42.81	77 793	38.21

3 个不同产地的北柴胡叶绿体全基因组序列都注释了 131 个基因 (表 5), 包括 86 个蛋白质编码基因、37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。其中, SSC 区含有 11 个蛋白质编码基因 (*ndhF*、*rpl32*、*ccsA*、*ndhD*、*psaC*、*ndhE*、*ndhG*、*ndhI*、*ndhA*、*ndhH* 和 *rps15*) 和 1 个 tRNA (*trnL-UAG*); 有 17 个基因分别在 2 个 IR 区出现 1 次, 包含 6 个蛋白质编码基因 (*rpl2*、*rpl23*、*ycf2*、*ndhB*、*rps7* 和 *rps12*), 7 个 tRNA (*trnI-CAU*、*trnL-CAA*、*trnV-GAC*、*trnI-GAU*、

trnA-UGC、*trnR-ACG* 和 *trnN-GUU*) 和 4 个 rRNA (*rrn16*、*rrn23*、*rrn4.5* 和 *rrn5*); LSC 区含有 61 个蛋白质编码基因和 22 个 tRNA。此外, 蛋白质编码基因 *rps19* 和 *ycf1* 分别横跨 LSC/IRb 边界和 SSC/IRA 边界。含 1 个内含子的基因有 16 个 (*ndhA*、*ndhB*、*petB*、*petD*、*atpF*、*rpl16*、*rpl2*、*rps12*、*rps16*、*rpoC1*、*trnA-UGC*、*trnG-UCC*、*trnI-GAU*、*trnK-UUU*、*trnL-UAA* 和 *trnV-UAC*), 含 2 个内含子的基因有 2 个 (*clpP* 和 *ycf3*)。

表 5 3 份北柴胡叶绿体基因组的基因组成

Table 5 Gene composition of chloroplast genomes of three *B. chinense*

类别	基因群	基因名称
光合系统基因	光系统 I	<i>psaA</i> 、 <i>psaB</i> 、 <i>psaC</i> 、 <i>psaI</i> 、 <i>psaJ</i>
	光系统 II	<i>psbA</i> 、 <i>psbB</i> 、 <i>psbC</i> 、 <i>psbD</i> 、 <i>psbE</i> 、 <i>psbF</i> 、 <i>psbH</i> 、 <i>psbI</i> 、 <i>psbJ</i> 、 <i>psbK</i> 、 <i>psbL</i> 、 <i>psbM</i> 、 <i>psbN</i> 、 <i>psbT</i> 、 <i>psbZ</i>
遗传系统基因	NADH 脱氢酶	<i>ndhA</i> [*] 、 <i>ndhB</i> ^{*(2)} 、 <i>ndhC</i> 、 <i>ndhD</i> 、 <i>ndhE</i> 、 <i>ndhF</i> 、 <i>ndhG</i> 、 <i>ndhH</i> 、 <i>ndhI</i> 、 <i>ndhJ</i> 、 <i>ndhK</i>
	细胞色素 b/f 复合体	<i>petA</i> 、 <i>petB</i> [*] 、 <i>petD</i> [*] 、 <i>petG</i> 、 <i>petL</i> 、 <i>petN</i>
	ATP 合成酶	<i>atpA</i> 、 <i>atpB</i> 、 <i>atpE</i> 、 <i>atpF</i> [*] 、 <i>atpH</i> 、 <i>atpI</i>
	二磷酸核酮糖羧化酶大亚基	<i>rbcL</i>
	核糖体蛋白大亚基	<i>rpl14</i> 、 <i>rpl16</i> [*] 、 <i>rpl2</i> ^{*(2)} 、 <i>rpl20</i> 、 <i>rpl22</i> 、 <i>rpl23</i> (2)、 <i>rpl32</i> 、 <i>rpl33</i> 、 <i>rpl36</i>
	核糖体蛋白小亚基	<i>rps11</i> 、 <i>rps12</i> 、 <i>rps12</i> ^{*(2)} 、 <i>rps14</i> 、 <i>rps15</i> 、 <i>rps16</i> [*] 、 <i>rps18</i> 、 <i>rps19</i> 、 <i>rps2</i> 、 <i>rps3</i> 、 <i>rps4</i> 、 <i>rps7</i> (2)、 <i>rps8</i>
	RNA 聚合酶	<i>rpoA</i> 、 <i>rpoB</i> 、 <i>rpoC1</i> [*] 、 <i>rpoC2</i>
	核糖体 RNA	<i>rrn16</i> (2)、 <i>rrn23</i> (2)、 <i>rrn4.5</i> (2)、 <i>rrn5</i> (2)
	转运 RNA	<i>trnA-UGC</i> ^{*(2)} 、 <i>trnC-GCA</i> 、 <i>trnD-GUC</i> 、 <i>trnE-UUC</i> 、 <i>trnF-GAA</i> 、 <i>trnG-GCC</i> 、 <i>trnG-UCC</i> [*] 、 <i>trnH-GUG</i> 、 <i>trnI-CAU</i> (2)、 <i>trnI-GAU</i> ^{*(2)} 、 <i>trnK-UUU</i> [*] 、 <i>trnL-CAA</i> (2)、 <i>trnL-UAA</i> [*] 、 <i>trnL-UAG</i> 、 <i>trnM-CAU</i> 、 <i>trnN-GUU</i> (2)、 <i>trnP-UGG</i> 、 <i>trnQ-UUG</i> 、 <i>trnR-ACG</i> (2)、 <i>trnR-UCU</i> 、 <i>trnS-GCU</i> 、 <i>trnS-GGA</i> 、 <i>trnS-UGA</i> 、 <i>trnT-GGU</i> 、 <i>trnT-UGU</i> 、 <i>trnV-GAC</i> (2)、 <i>trnV-UAC</i> [*] 、 <i>trnW-CCA</i> 、 <i>trnY-GUA</i> 、 <i>trnM-CAU</i>
	其他基因	<i>matK</i>
未知功能基因	成熟酶	<i>clpP</i> ^{**}
	蛋白酶	<i>cemA</i>
	胞膜蛋白	<i>accD</i>
	乙酰辅酶 A 羧化酶	<i>ccsA</i>
	细胞色素 C 合成酶	<i>infA</i>
	翻译起始因子	<i>ycf1</i> 、 <i>ycf2</i> (2)、 <i>ycf3</i> ^{**} 、 <i>ycf4</i>

*-含有 1 个内含子的基因 **-含有 2 个内含子的基因 (2)-有 2 个拷贝的基因

*-genes with one intron **-genes with two introns (2)-genes with two copies

3.2 重复序列分析

不同产地的北柴胡样品叶绿体全基因组序列中北柴胡 1 发现 66 条分散重复序列, 北柴胡 2 和北柴胡 3 均发现 75 条分散重复序列。其中北柴胡 2 和北柴胡 3 包括 29 条正向重复 (forward repeats)、12

条反向重复 (reverse repeats)、29 条回文重复 (palindromic repeats) 和 5 条互补重复 (complement repeats); 北柴胡 1 包括 30 条正向重复、4 条反向重复、28 条回文重复和 4 条互补重复序列 (图 2)。同时检测到 3 份北柴胡样品中长度为 9~49 bp、重

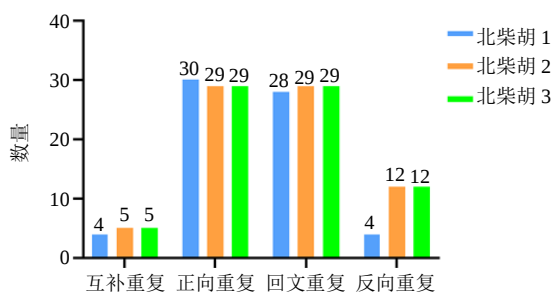


图 2 3 份北柴胡叶绿体基因组中重复序列的数量

Fig. 2 Number of repetitive sequence in chloroplast genomes of three *B. chinense*

复次数为 2~4 次的串联重复序列分别为 37、38 和 38 条。对不同产地北柴胡样品的叶绿体全基因组简单重复序列 (SSR) 的数量、类型及其在叶绿体基因组中的分布情况分析显示, SSRs 主要分布于叶绿体基因组的 LSC 区 (71.83%~72.31%) 和非编码的基因间区序列中。编码基因序列总长度占叶绿体全基因组的 49.88%~50.00%, 而编码基因序列中分布的 SSRs 数量仅占其总数的 15.38%~15.49% (表 6、7)。

3.3 比较基因组学分析

为检测 3 份北柴胡叶绿体基因组的种内变异情

表 6 SSRs 在 3 份北柴胡叶绿体基因组中的分布

Table 6 Distribution of SSRs in chloroplast genomes of three *B. chinense*

样本	SSRs 总量	SSRs 数量 (占比/%)			
		LSC	IRs	SSC	CDS
北柴胡 1	65	47 (72.31)	17 (26.15)	1 (1.54)	10 (15.38)
北柴胡 2	71	51 (71.83)	16 (22.54)	4 (5.63)	11 (15.49)
北柴胡 3	71	51 (71.83)	16 (22.54)	4 (5.63)	11 (15.49)

表 7 3 份北柴胡叶绿体基因组中 SSRs 种类及其数量

Table 7 Types and numbers of SSRs in chloroplast genomes of three *B. chinense*

样本	SSRs 总量	核苷酸类型占比 (数量)					
		单核苷酸/%	二核苷酸/%	三核苷酸/%	四核苷酸/%	五核苷酸/%	六核苷酸/%
北柴胡 1	65	40 (61.54)	12 (18.46)	6 (9.23)	4 (6.15)	2 (3.08)	1 (1.54)
北柴胡 2	71	49 (69.01)	10 (14.08)	7 (9.86)	5 (7.04)	/	/
北柴胡 3	71	49 (69.01)	10 (14.08)	7 (9.86)	5 (7.04)	/	/

况, 以注释过的北柴胡样本叶绿体基因组 (NC_046774) 为参考, 利用 mVISTA 在线软件将获得的其余 3 个叶绿体基因组进行全局对比 (图 3)。结果显示, 叶绿体基因组序列中蛋白编码区域变异低于非编码区变异, 且 IRs 区变异明显小于其他 LSC 区和 SSC 区。此外, 绝大多数基因的相似度在 90% 以上, rRNA 基因 (*rrn4.5*、*rrn5*、*rrn16*、*rrn23*) 高度保守没有变异。基因区 *rpoC1*、*trnF-GAA*、*trnV-UAC*、*ycf1* 和基因间区 *trnR-UCU-atpA*、*petN-psbM*、*ycf4-cemA*、*rpl33-rps18*、*ndhF-rpl32*、*rpl32-trnL-UAG* 等基因有不同程度的变异。同时, 对 3 份北柴胡样品的 P_i 进行分析显示种内变异度较小, P_i 值范围为 0~0.017 78, LSC、SSC 和 IRs 区的平均 P_i 值分别为 0.001 32、0.001 63 和 0.000 24, 与 mVISTA 分析结果一致 (图 4)。基因区 *trnV-UAC* (0.008 89) 和基因间区 *trnC-GCA-petN* (0.006 67)、*petN-psbM* (0.017 78)、*ndhF-rpl32* (0.006 67) 的

P_i 值较高。综上可知, 北柴胡种内基因的保守程度很高, 基因间区变异程度高于基因区, 结合 mVISTA 和 P_i 结果, 显示基因区 *trnV-UAC* 和基因间区 *trnC-GCA-petN*、*petN-psbM*、*ndhF-rpl32* 可作为潜在的分子高变区域。

3.4 不同产地北柴胡样品的 *petN-psbM* 和 *ndhF-rpl32* 的扩增

根据 *trnV-UAC* (643 bp)、*trnC-GCA-petN* (656 bp)、*petN-psbM* (1102 bp)、*ndhF-rpl32* (1220 bp) 序列设计引物, 进行 PCR 扩增, 发现 *trnV-UAC* (643 bp)、*trnC-GCA-petN* (656 bp) 扩增效率不高, *petN-psbM*、*ndhF-rpl32* 的扩增效率为 100%, 因此本研究选择 *petN-psbM*、*ndhF-rpl32* 为北柴胡种内鉴定的特异 DNA 条形码, 进行后续研究。以 7 个产地 177 份北柴胡样品总 DNA 为模板对筛选的 2 个叶绿体基因组高变区进行 PCR 扩增, 并对测序结果进行分析。利用设计的 *petN-psbM* 引物进行 PCR

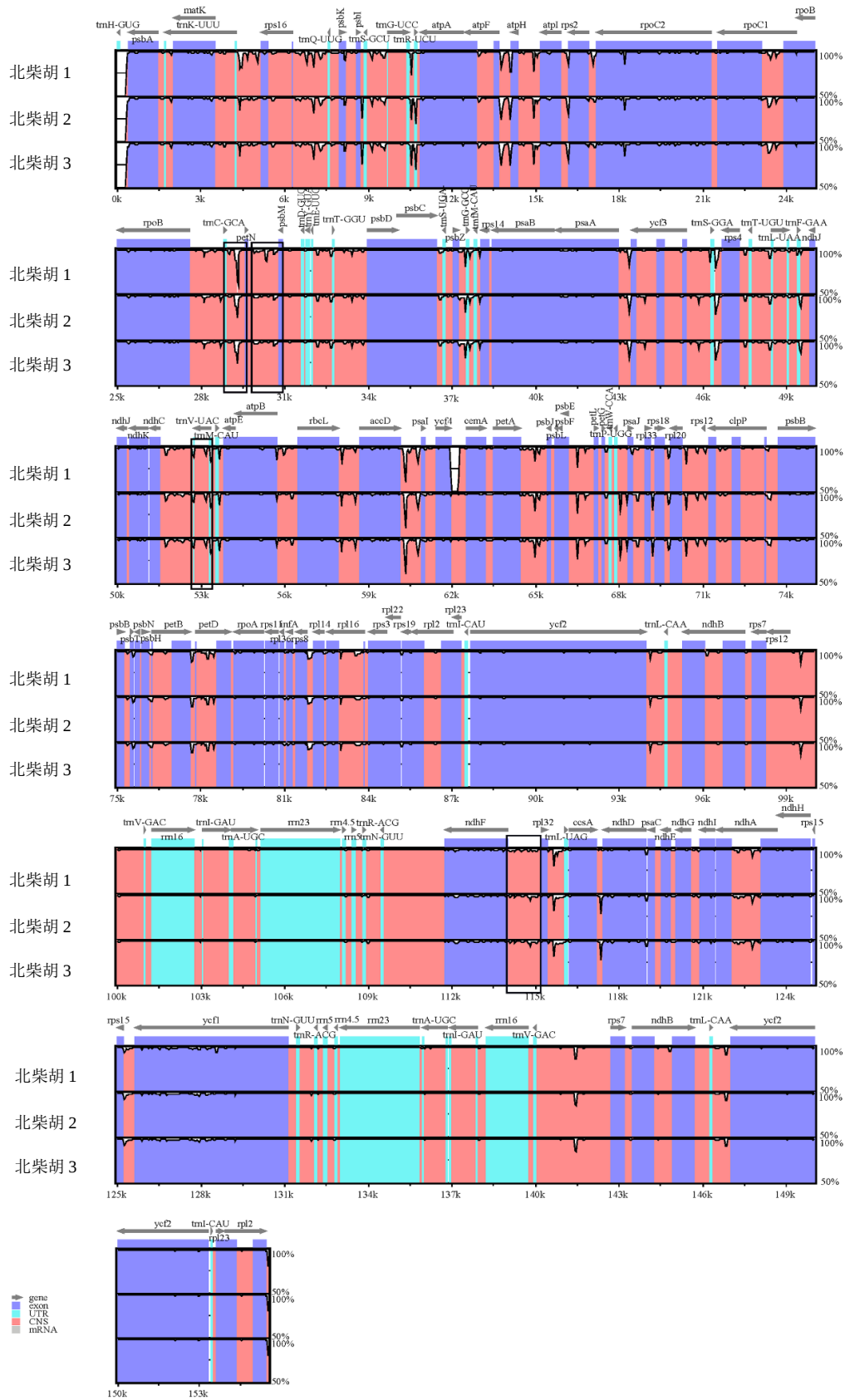


图 3 3 份北柴胡叶绿体基因组全局对比

Fig. 3 Global comparison of chloroplast genomes of three *B. chinense*

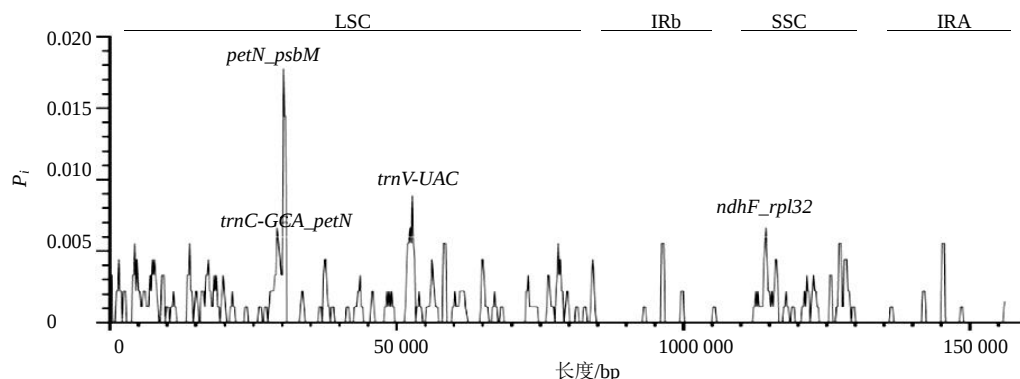


图 4 3 份北柴胡叶绿体基因组核苷酸多样性

Fig. 4 Nucleotide diversity of chloroplast genome of three *B. chinense*

扩增,全部样品扩增到 1000~2000 bp (图 5),对 PCR 产物纯化后测序,与北柴胡 1 的 *petN_psbM* 序列对比可判断其为 *petN_psbM* 序列;利用设计的 *ndhF_rpl32* 引物进行 PCR 扩增,全部样品扩增到 1000~2000 bp (图 6),对 PCR 产物纯化后测序,与北柴胡 1 的 *ndhF_rpl32* 序列对比可判断其为 *ndhF_rpl32* 序列。

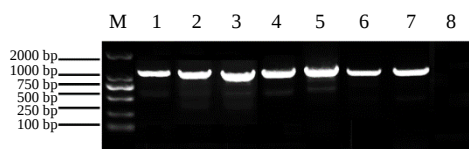
3.5 不同产地样品 DNA 条形码分析

基因 *petN_psbM* 共检测到 91 个变异位点,共形成 28 个单倍型 (图 7)。其中位于 249、396、576、

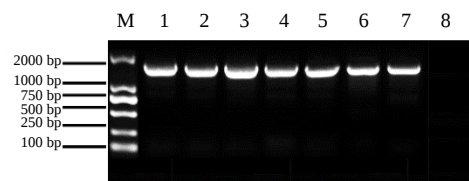
612、837 和 926 bp 的 6 个位点突变类型为插入;位于 932~976 bp 的 45 个位点突变类型为缺失,同时 942~944 bp 和 950 bp 伴有单点突变;其他 40 个位点为单点突变,分别位于 219、228、303、327、331、362、401、403、428、445、485、536、578、581、607、620、621、626、628~631 bp、633、636、639、641~644、646、652、682、708、716、749、869、873、883、928、1013 bp。

基因 *ndhF_rpl32* 共检测到 78 个变异位点,共形成 29 个单倍型 (图 8)。其中位于 255、256、280、331、749、794、803、807、950、1001 bp 的 10 个位点突变类型为插入,此外,749 bp 位点也存在缺失突变和单点突变;位于 258、750、775~780、819~827、853~856 bp 的 21 个位点突变类型为缺失,同时 853 bp 伴有单点突变;其他 47 个位点为单点突变,分别位于 132、134、167、178、179、184、207、223、224、262、279、286、317、318、343、353、356、423、449、462、472、478、482、518、570、574、577、594、647、656、713、741、742、790、796、809、839、874、876、877、886、960、1011、1014、1015、1022 和 1044 bp。

对 2 基因联合分析共形成了 40 个单倍型 (表 2),占比最多分布最广的单倍型为 Hap1,占全部样品的 19.21%,其次是 Hap2,占比为 17.51% (图 9),而特异的单倍型可作为该产地特有的种质资源加以扩繁,也可以作为鉴定北柴胡产地来源的 DNA 分子标签。河南省洛阳市的 DNA 分子标签为 Hap3 和 Hap4,河北秦皇岛市的 DNA 分子标签为 Hap7、Hap8、Hap9、Hap10 和 Hap11,山西省临汾市侯马市的 DNA 分子标签为 Hap13、Hap15、Hap16、Hap18、Hap20、Hap21、Hap22、Hap23、Hap25、



M-Marker 1-HNLY10 (Hap3) 2-HBQHD1 (Hap7)
3-SXL FHM19 (Hap20) 4-SXXZ2 (Hap29) 5-SXGJ1 (Hap34)
6-SXBJ1 (Hap35) 7-SXSL7 (Hap39) 8-阴性对照, 图 6 同
M-Marker 1-HNLY10 (Hap3) 2-HBQHD1 (Hap7) 3-SXL-
FHM19 (Hap20) 4-SXXZ 2(Hap29) 5-SXGJ1 (Hap34)
6-SXBJ1 (Hap35) 7-SXSL7 (Hap39) 8-negative controls, same as
fig. 6

图 5 北柴胡样品 *petN_psbM* 序列 PCR 扩增Fig. 5 PCR amplification of *petN_psbM* sequence of *B. chinense* samples图 6 北柴胡样品 *ndhF_rpl32* 序列 PCR 扩增Fig. 6 PCR amplification of *ndhF_rpl32* sequence of *B. chinense* samples

*-核酸与 Hap1 相同 “-”-核酸缺失, 图 8 同
*-nucleic acid is the same as Hap1 “-”-nucleic acid deletion, same as fig.8

Fig. 7 Haplotypes variation outliers of *petN_psbM* gene

间遗传距离为 0.017, 亲缘关系较远。结合表 2 中每个产地样品的单倍型发现, Hap35 和 Hap38 为陕西省宝鸡市的特异单倍型, Hap16 为山西省临汾市侯马市特异单倍型, Hap33 为山西省新绛县西庄村特异单倍型。此外, 陕西省宝鸡市的另 2 个特异单倍型 Hap36 和 Hap37 之间遗传距离为 0.001, 亲缘关系较近。山西省临汾市侯马市的另一特异单倍型 Hap15 和山西省新绛县西庄村的另一特异单倍型 Hap29 之间遗传距离为 0.003, 亲缘关系较近。河北省秦皇岛市的 2 个特异单倍型 Hap7 和 Hap11 之间遗传距离为 0.001, 亲缘关系较近。陕西省商洛市商州区代街村的特异单倍型 Hap40 和河南省洛阳市的特异单倍型 Hap4 之间遗传距离为 0.002, 亲缘关系较近。

对表2中每个产地的特异单倍型之间遗传距离

使用 Mega X 对 2 个基因联合分析的单倍型进行遗传距离分析,结果显示 40 个单倍型的遗传距离为 0~0.022, 平均遗传距离为 0.010, 表明北柴胡样品间亲缘关系差别不大。最大遗传距离 0.022 存在于 Hap3 和 Hap20 之间, 亲缘关系最远; 最小遗传距离为 0.000 存在于多个单倍型之间, 分别在 Hap6、Hap16、Hap17 和 Hap33 之间, Hap14、Hap23 和 Hap24 之间, Hap26 和 Hap27 之间, Hap35 和 Hap38 之间, 亲缘关系最近。占比较多的 Hap1 和 Hap2 之

图 8 *ndhF_rpl32* 基因的单倍型变异位点

A pie chart illustrating the distribution of 40 different haplotypes. The chart is divided into 40 segments, each representing a specific haplotype. The two most prevalent haplotypes are Hap1, which constitutes 19.21% of the total, and Hap2, which constitutes 17.51%. The remaining 38 haplotypes are represented by much smaller segments, indicating their relative rarity. A legend on the right side of the chart lists all 40 haplotypes, each associated with a unique color-coded square that matches its corresponding segment in the pie chart.

Haplotype	Percentage
Hap1	19.21%
Hap2	17.51%
Hap3	
Hap4	
Hap5	
Hap6	
Hap7	
Hap8	
Hap9	
Hap10	
Hap11	
Hap12	
Hap13	
Hap14	
Hap15	
Hap16	
Hap17	
Hap18	
Hap19	
Hap20	
Hap21	
Hap22	
Hap23	
Hap24	
Hap25	
Hap26	
Hap27	
Hap28	
Hap29	
Hap30	
Hap31	
Hap32	
Hap33	
Hap34	
Hap35	
Hap36	
Hap37	
Hap38	
Hap39	
Hap40	

Fig. 9 Haplotypes proportion of combined analysis of two genes

分析发现,河南省洛阳市的特异单倍型 Hap3 与河北省秦皇岛市的特异单倍型 Hap7 之间遗传距离为 0.021; Hap3 与山西省临汾市侯马市特异单倍型 Hap20 之间遗传距离为 0.022, 亲缘关系最远。河南省洛阳市的另一特异单倍型 Hap4 与山西省新绛县西庄村的特异单倍型 Hap29 之间遗传距离为 0.018; Hap7 与 Hap29 之间的遗传距离为 0.019; Hap20 与 Hap29 之间的遗传距离为 0.020, 亲缘关系较远。Hap4 与陕西省宝鸡市的特异单倍型 Hap35 之间遗传距离为 0.019; Hap7 与 Hap35 之间的遗传距离为 0.020; Hap20 与 Hap35 之间的遗传距离为 0.021, 亲缘关系较远。Hap4 与陕西省商洛市商州区代街村的特异单倍型 Hap39 之间遗传距离为 0.019; Hap7 与 Hap39 之间遗传距离为 0.020; Hap20 与 Hap39 之间遗传距离为 0.021; Hap29 与陕西省商洛市商州区代街村的另一特异单倍型 Hap40 之间遗传距离为 0.017; Hap35 与 Hap40 之间遗传距离为 0.017, 亲缘关系较远。这些结果表明每个产地的特异单倍型之间的遗传距离较远。

3.7 系统进化分析

将 2 个基因联合分析后的单倍型序列对比后构建 NJ Tree, 从而进一步分析各单倍型的亲缘关系。

如图 10 所示, Hap1、Hap3、Hap14、Hap18、Hap19、Hap23、Hap24、Hap28、Hap35 和 Hap38 聚在同一支上, 其他单倍型聚为一支, 同一支的单倍型之间亲缘关系较近。占比较多的 Hap1 和 Hap2 分别属于 2 个不同的单系分支, 亲缘关系较远。

结合表 2 分析各产地的特异单倍型发现, 部分单倍型之间亲缘关系较近, 与遗传距离分析结果一致。陕西省宝鸡市的特异单倍型 Hap35 和 Hap38 聚为同一支, 支持率为 62%; 陕西省宝鸡市的另 2 个特异单倍型 Hap36 和 Hap37 聚为同一支, 支持率为 98%; 河北省秦皇岛市的 2 个特异单倍型 Hap7 和 Hap11 聚为同一支, 支持率为 96%; 陕西省商洛市商州区代街村的特异单倍型 Hap40 和河南省洛阳市的特异单倍型 Hap4 聚为同一支, 支持率为 92%; 山西省临汾市侯马市的特异单倍型 Hap16 与山西省新绛县西庄村的特异单倍型 Hap33 聚为同一支, 支持率为 23%; 山西省临汾市侯马市的另一特异单倍型 Hap15 和山西省新绛县西庄村的另一特异单倍型 Hap29 聚为同一支, 支持率为 62%。

结合表 2 中每个产地的特异单倍型发现, 与遗传距离分析结果一致, 遗传距离较大的特异单倍型均不聚在同一支, 亲缘关系较远。

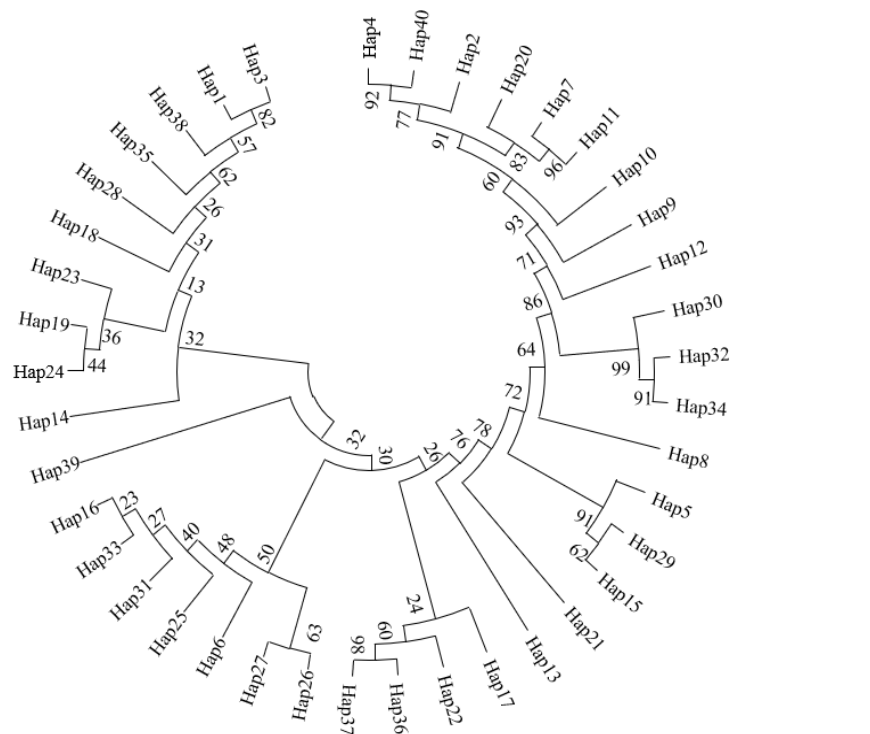


图 10 2 个基因联合分析的单倍型 NJ Tree

Fig. 10 Haplotypes NJ tree of combined analysis of two genes

4 讨论

据报道北柴胡叶绿体基因组为典型的环状四分体结构,总长度为 155 458~155 869 bp,GC 含量为 37.68%~37.70%,IR 长度为 52 596~52 620 bp,LSC 长度为 85 343~85 772 bp,SSC 长度为 17 495~17 505 bp;共包含 129~133 个基因,其中蛋白质编码基因为 19~84 个,tRNA 基因为 30~37 个,rRNA 基因为 4~8 个^[11, 21-22]。北柴胡及其同属植物的分散重复序列为 33~49 条,串联重复序列为 22~30 条,简单重复序列为 57~72 条^[21-22]。本研究测得的 3 个北柴胡叶绿体全基因组大小和结构与上述北柴胡研究结果基本相符。

目前已经有多篇文献报道^[19, 23-25]利用叶绿体测序和比较基因组进行筛选高变区作为特异 DNA 条形码用于物种的鉴定,但是用筛选的特异 DNA 条形码验证的比较少。如通过比较叶绿体基因组学研究有学者推荐 *psbI-trnS*、*psbC-trnS*、*clpP-ex1-psbB*、*rpl33-rps18*、*psaJ-rpl33* 等叶绿体基因组高变区作为鉴定石豆兰属药用植物的特异 DNA 条形码^[23]; *ycf1*、*rpl32-trnL-UAG*、*trnK-UUU-rps16*、*psbK-trnQ-UUG*、*petN-psbM* 是通过叶绿体基因组学分析筛选的龙胆属植物鉴定的高变片段^[24]。目前也有少量研究对叶绿体基因组高变区用于鉴定物种进行了验证,如基于叶绿体基因组筛选的秦艽的特异性 DNA 片段 *trnT-trnL* 和 *ycf2* 个高变区,能够用于长梗秦艽、全萼秦艽的鉴别^[25];高变区 *rps16-trnQ*、*psaA-ycf3*、*psbE-petL*、*ndhF-rpl32* 与 *trnT-trnL* 能作为特异 DNA 条形码鉴定大黄药材 3 个基原^[19]。但是也有相关报道证明利用叶绿体基因组测序获得特异 DNA 条形码后扩增效果不理想,如豆蔻属的特异性 DNA 片段 *atpH-atpI* 扩增效果不理想,不适合豆蔻属的鉴定^[26]。综合文献研究表明^[25-26],在筛选高变区域后,需要经过实际扩增效率验证。近期已有学者通过比较基因组学分析柴胡属植物叶绿体基因组高变区为 *trnK-UGG-rps16*、*petN-psbM*、*petA-psbJ*、*ndhF*、*ndhF-rpl32*、*ycf* 为柴胡属种间高变区,但是没有相应的实验验证^[22]。本研究基于 mVISTA 和 Pi 结果分析北柴胡叶绿体基因组的高变区,结果表明 *trnV-UAC*、*trnC-GCA-petN*、*petN-psbM*、*ndhF-rpl32* 是北柴胡种内的潜在 DNA 条形码,结合以前的文献^[22]报道结果表明 *petN-psbM*、*ndhF-rpl32* 既可以作为北柴胡种内特异性 DNA 片段也可以作为种间鉴定的 DNA 条形码。

基于扩增效率,选择 *petN-psbM*、*ndhF-rpl32* 用于后续北柴胡种质资源的鉴定。

DNA 条形码技术在药用植物物种鉴定及种内资源鉴定方面起到重要的作用,具有简便、高效、客观等特点。目前 DNA 条形码技术也在柴胡属药用植物鉴定方面取得显著进展,如赵晴等^[27]利用 ITS 序列鉴定了北柴胡、红柴胡、三岛柴胡的种子;曾伟萍^[28]考察了 DNA 条形码候选序列 *psbA-trnH*、*rbcL*、*matK*、*ITS2* 在柴胡属药用植物的鉴定能力,发现 *ITS2* 序列和 *psbA-trnH* 序列可作为柴胡属药用植物鉴定的候选序列。但是目前关于北柴胡种内资源鉴别的研究比较少。本研究基于叶绿体高变区筛选的 2 条 DNA 条形码 *petN-psbM* 和 *ndhF-rpl32* 对北柴胡的遗传多样性进行分析,发现了大量的变异位点和较全面的遗传信息。其中 6 个产地的特异单倍型作为该产地特有的种质资源,为后续鉴别不同产地北柴胡样品奠定基础;各单倍型之间遗传距离较小,北柴胡种内亲缘关系较近,但主流单倍型 Hap1 和 Hap2 之间亲缘关系相对较远,部分产地特异单倍型之间亲缘关系较远。因此本研究基于比较叶绿体基因组学筛选的北柴胡鉴定的特异性片段 *petN-psbM* 和 *ndhF-rpl32* 可以有效鉴定北柴胡种质资源,为北柴胡种质资源保护和后续育种工作奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 293.
- [2] 孙世君. 柴胡的药理学分析以及临床应用 [J]. 中国医药指南, 2010, 8(29): 210-211.
- [3] 金顺姬. 柴胡的药理作用及临床应用 [J]. 现代医药卫生, 2009, 25(7): 1074-1075.
- [4] 王占一, 南极星. 北柴胡对对乙酰氨基酚所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国药师, 2008, 11(7): 747-749.
- [5] 胡继鹰, 许湘, 潘克英, 等. 保康北柴胡解热抗炎作用的药效学研究 [J]. 中医药学刊, 2005, 23(4): 631-632.
- [6] 刘晓斌, 高燕, 刘永仙, 等. 北柴胡提取组分对小鼠淋巴细胞活性的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 600-601.
- [7] 冯煦, 王鸣, 赵友谊, 等. 北柴胡茎叶总黄酮抗流感病毒的作用 [J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(4): 15-18.
- [8] 安玉明, 接传胤, 祝世伟. 柴胡的研究进展 [J]. 人参研究, 2001, 13(1): 11-13.
- [9] 杨小英, 刘畅, 曾宪法, 等. 八角枫及其亚种叶绿体基因组序列结构及系统发育分析 [J/OL]. 药学报, 2023, 64(1): 1-10.

- 2022: [2022-07-18]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2163.R.20220716.1931.002.html>.
- [10] 李卓蔚, 邱迁, 郎佳琪, 等. 尖刀唇石斛和翅梗石斛叶绿体全基因组分析 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5159-5169.
- [11] Zhang F, Zhao Z Y, Yuan Q J, *et al.* The complete chloroplast genome sequence of *Bupleurum chinense* DC. (Apiaceae) [J]. *Mitochondrial DNA B*, 2019, 4(2): 3665-3666.
- [12] Wu Y, Zhang T Z, Qiu D Y, *et al.* Complete plastid genome of *Bupleurum boissieuianum*, an endemic herb plant in Western China [J]. *Conservation Genet Resour*, 2018, 10(4): 635-637.
- [13] Deng X D, Liu H Z, Yang Y H, *et al.* The first complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Bupleurum marginatum* (Apiaceae) [J]. *Mitochondrial DNA B*, 2020, 5(2): 1836-1838.
- [14] Zhang F, Yang Z, Wang Z, *et al.* The complete chloroplast genome sequence of *Bupleurum scorzonifolium* Willd. (Apiaceae) [J]. *Mitochondrial DNA B*, 2020, 5(2): 1998-1999.
- [15] Yang L C, Xiong F, Xiao Y M, *et al.* The complete chloroplast genome of *Bupleurum longicaule* var. *strictum*, an annual herb endemic to China [J]. *Mitochondrial DNA B*, 2020, 5(1): 899-901.
- [16] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [17] 张晓芹, 刘春生, 闫兴丽, 等. 多基原药材大黄叶绿体 *matK* 基因序列分析及鉴定研究 [J]. 药学学报, 2013, 48(11): 1722-1728.
- [18] 袁伯川. 柴胡属药用植物的分子鉴定及柴胡药材的质量考察 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [19] 李冉郡, 武立伟, 辛天怡, 等. 大黄药材基原物种叶绿体基因组分析与特异 DNA 条形码开发 [J]. 药学学报, 2022, 57(5): 1495-1505.
- [20] 姜丹. 黄芩道地性的遗传和化学物质基础研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [21] 张明英, 张雨曲, 李依民, 等. 北柴胡、紫花阔叶柴胡叶绿体全基因组解析及柴胡属药用植物叶绿体基因组比较与系统发育分析 [J]. 药学学报, 2021, 56(2): 618-629.
- [22] Li J, Xie D F, Guo X L, *et al.* Comparative analysis of the complete plastid genome of five *Bupleurum* species and new insights into DNA barcoding and phylogenetic relationship [J]. *Plants*, 2020, 9(4): 543.
- [23] 杨嘉鹏, 朱紫乐, 范雅娟, 等. 三种石豆兰属药用植物的叶绿体基因组比较分析及其在物种鉴定中的意义 [J]. 药学学报, 2020, 55(11): 2736-2745.
- [24] 胡海粟, 张德全. 几种滇产龙胆属 *Gentiana* 药用植物的 DNA 超级条形码研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5260-5269.
- [25] 董博然, 赵志礼, 倪梁红, 等. 基于叶绿体基因组的长梗秦艽、全萼秦艽物种 DNA 分子标记与鉴定 [J]. 药学学报, 2021, 56(9): 2584-2591.
- [26] 崔英贤. 药食两用药材砂仁、枸杞、山楂和姜基原植物叶绿体基因组结构解析 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [27] 赵晴, 谢红波, 央拉, 等. 基于 DNA 条形码技术的北柴胡种子分子鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 182-189.
- [28] 曾伟萍. 柴胡属药用植物的条形码研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2016.

[责任编辑 时圣明]