

甘松属资源遗传多样性及其 ITS 二级结构系统发育信息分析

崔琪^{1,3,4}, 俸明康^{1,3,4}, 丰日落^{1,3,4}, 王涛^{1,3,4}, 张绍山^{2,3,4}, 李莹^{1,3,4}, 李文兵^{2,3,4}, 陈晨^{2,3,4*}, 刘圆^{2,3*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川 成都 610225

3. 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

4. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225

摘要: 目的 基于 ITS1 和 ITS2 序列, 对来自四川、青海、甘肃和西藏不同地区的甘松属植物甘松 *Nardostachys chinensis*、匙叶甘松 *N. jatamansi* 遗传多样性进行研究及分子鉴定。方法 通过 PCR 扩增获得甘松 ITS1、ITS2 序列, 采用 MEGA 软件进行多重序列比对, 用 DNA EditSeq 软件进行剪切、拼接和统计等分析, 运用 Kimura two-parameter (K2-P) 模型进行遗传距离分析, 运用 DNASTAR 软件进行同源性和差异性分析, 利用邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建系统发育树, 采用 DNAsp V5 软件进行遗传多样性分析。结果 ITS1 序列长度范围为 687~689 bp, 仅 2 bp 差异; ITS2 序列长度高度保守, 均为 468 bp。ITS1 与 ITS2 序列 G/C 含量均达 66.00% 以上。系统发育分析发现, ITS 序列可将甘松属 20 个样本分为 2 支, 甘松与匙叶甘松各自为一支, 但二者亲缘关系很近。遗传多样性分析发现, 匙叶甘松综合遗传多样性水平指标大于甘松。结论 据形态学及遗传学分析, 甘松属应分为甘松与匙叶甘松 2 种, 且遗传多样性较低, 种内遗传变异相对稳定。ITS 序列可用于甘松属品种的鉴定。研究结果可以为甘松属植物资源分类、评价、保护与可持续利用提供一定的理论基础。

关键词: 甘松; 匙叶甘松; ITS 序列; 分子鉴定; 遗传多样性

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)01-0249-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.025

Genetic diversity and ITS secondary structure phylogenetic information analysis of *Nardostachys* resources

CUI Qi^{1,3,4}, FENG Mingkan^{1,3,4}, FENG Riluo^{1,3,4}, WANG Tao^{1,3,4}, ZHANG Shaoshan^{2,3,4}, LI Ying^{1,3,4}, LI Wenbing^{2,3,4}, CHEN Chen^{2,3,4}, LIU Yuan^{2,3}

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China

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

4. Key Laboratory of Protection and Utilization of Ethnic Medicinal Resources on Qinghai-Tibet Plateau, State Ethnic Affairs Commission, Chengdu 610225, China

Abstract: Objective Based on the ITS1 and ITS2 sequences, we studied the genetic diversity and molecular identification of the *Nardostachys chinensis* and *N. jatamansi* from different regions of Sichuan, Qinghai, Gansu and Tibet. **Methods** ITS1 and ITS2 sequences of *Nardostachys* were obtained by PCR amplification; MEGA software was applied for multiple alignment; DNA EditSeq software was used for cutting, splicing and statistical analysis; Kimura two-parameter (K2-P) model was used for genetic distance analysis; DNASTAR software was used for homology and difference analysis; Neighbor joining (NJ) method was used to construct phylogenetic trees and DNAsp

收稿日期: 2023-06-06

项目基金: 国家重点研发计划 (2018YFC1706101); 四川省自然科学基金项目 (青年科学基金项目-2022NSFSC1588); 2021 年国家民委领军人才支持计划; 西南民族大学双一流项目 (CX2023053)

作者简介: 崔琪 (1997—), 硕士研究生, 研究方向为中药鉴定学。Tel: 18280563878 E-mail: 1747396783@qq.com

*通讯作者: 陈晨 (1987—), 助理研究员, 博士, 主要从事药用植物发育分子机制及民族药资源研究。

Tel: (028)83372832 E-mail: lilychenqhu@163.com

刘圆 (1968—), 教授, 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

V5 was used to analysed genetic diversity. **Results** The ITS1 sequences ranged from 687 to 689 bp, with only 2 bp difference; the ITS2 sequences were highly conserved with 468 bp length, and the G/C content of both ITS1 and ITS2 sequences reached over 66.00%. Phylogenetic analysis revealed that the ITS sequences could divide the 20 samples of *Nardostachys* into two branches, *N. chinensis* and *N. jatamansi*, but they were closely related to each other. The genetic diversity analysis showed that the comprehensive genetic diversity index of *N. jatamansi* was higher than that of *N. chinensis*. **Conclusion** According to the morphological and genetic analysis, the *Nardostachys* should be divided into two species of *N. chinensis* and *N. jatamansi*, and the genetic diversity was low, and the intraspecific genetic variation was relatively stable. The ITS sequences can be used to identify the species of *Nardostachys*. The results of the study can provide a theoretical basis for the classification, evaluation, conservation and sustainable use of plant resources of the *Nardostachys*.

Key words: *Nardostachys chinensis* Bat; *Nardostachys jatamansi* DC.; ITS sequence; molecular identification; genetic diversity

甘松 *Nardostachys chinensis* Bat, 又名甘松香、香松, 作为药用始载于《本草拾遗》^[1]。甘松以干燥根及根茎入药, 因富含甘松新酮、甘松新酮二醇、甘松香酮 A、甘松香酮 B、当归香素、蒙花苷^[2-3]等成分, 具有理气解郁、祛湿消肿^[4]的功效, 具有重要的药用价值。另外, 甘松作为藏香、香水^[5]、化妆品^[6]等产品的重要成分, 亦具有重要的工业价值。甘松的市场需求增大, 但其分布范围小, 生长周期长, 对生长环境要求严苛, 无差别和非系统性采集使其野生资源遭到严重破坏, 野生资源日益减少, 以致于被纳入《濒危动植物国际贸易公约》(CTES) 附录 II^[7]。因此, 为满足甘松市场需求, 可持续利用该资源, 展开种质资源收集、评价、开发、利用及新品种选育等工作至关重要。

早期研究认为, 败酱科 (Valerianaceae) 甘松属 *Nardostachys* L. 植物共有 3 种, 分别为甘松 *N. chinensis* Bet.、匙叶甘松 *N. jatamansi* DC. 和大花甘松 *N. grandiflora* DC., 三者均分布于喜马拉雅山区^[8]。在我国主要分布的为甘松和匙叶甘松 2 种, 位于青海、四川、云南、西藏和甘肃等省份地区^[1]; 大花甘松 *N. grandiflora* DC., 多分布于印度、尼泊尔等地^[9]。三者均为青藏高原生态系统的组成部分。目前大多数研究认为, 甘松、匙叶甘松、大花甘松是同种植物, 统称为“甘松”。由此可见, 甘松属植物如何分类, 目前并未有确切依据。

真核生物核糖体 DNA 内转录间隔区序列 (internal transcribed spacer, 下简称 ITS) 作为国际公认的植物 DNA 条形码候选序列^[10], 序列十分保守, 但在近缘种之间存在明显差异^[11], 广泛运用于中药材真伪^[12]、近缘种亲缘性鉴定^[13]、基原鉴定^[14]、遗传多样性^[15]等方面, 相比其他标记手段具有进化速率快、扩增效率高、灵敏准确等有点, 已成为主流的核基因分子标记之一^[16-17]。本研究通过调查国内甘松属资源的分布, 从四川、青海、甘肃、西藏的野生甘松资源分布区收集甘松属资源 20 份, 利用 ITS

DNA 条形码序列, 对青藏高原甘松属植物资源展开遗传多样性研究, 为甘松属分类、资源生态适应机制及种质筛选等的研究提供理论指导, 同时为野生甘松属植物资源的保护选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2020 年 6 月于四川省阿坝藏族羌族自治州、四川省甘孜藏族自治州、青海省黄南藏族自治州、青海省果洛藏族自治州、甘肃省甘南藏族自治州、西藏自治区日喀则市采集甘松属资源样本 20 份, 移栽至西南民族大学青藏高原基地。经西南民族大学刘圆教授鉴定, 四川甘孜藏族自治州的 4 份样本为匙叶甘松 *N. jatamansi* DC., 其余地区样本均为甘松 *N. chinensis* Bat, 鉴定结果^[8]及样本来源见表 1。

1.2 方法

1.2.1 试验样地概况 于西南民族大学青藏高原基地甘松资源圃内 (102°35'00"E, 32°50'07"N) 展开试验, 试验地海拔 3 490 m。2020 年年平均温度 2.9 °C, 年降水量 860.8 mm, 年日照时数 2 212.3 h, 气候干燥寒冷。

1.2.2 样品 DNA 的提取、PCR 扩增及测序 待植株长出新叶, 分别取长势一致的叶片, 首先用无菌水洗净, 然后滤纸吸干后剪碎加液氮研磨, 采用 CTAB 法提取样品 DNA。提取后对样品的 DNA 进行纯度与浓度的检测。ITS1、ITS2 序列扩增所用引物及 PCR 反应条件见表 2。所用 PCR 反应试剂为北京擎科生物科技有限公司所生产的 I-5™2×High-Fidelity Master Mix, 将 1.3% 琼脂糖凝胶电泳单一、清晰、明亮的扩增产物送至北京擎科生物科技有限公司进行测序。

经检测, 所有样本提取的 DNA 在 260、280 nm 的吸光度比值 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0, A_{260}/A_{230} 在 1.8~2.3, 所有样本 DNA 纯度达到检测要求。提取的 DNA 质量浓度在 34.9~90 ng/μL, 且纯度均达到要求, 见图 1。

表 1 甘松属样本采集信息
Table 1 Samples information of *Nardostachys*

种	编号	采集地点	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m	特征
甘松	G01	四川省阿坝藏族羌族自治州若尔盖县	102°39'22"	33°27'47"	3 383	根茎被片状老叶鞘；花后花序主轴和侧轴多数明显伸长；果实光秃
	G02	青海省黄南藏族自治州河南蒙古族自治县	101°39'54"	34°43'28"	3 440	
	G03	青海省黄南藏族自治州河南蒙古族自治县	101°56'11"	34°32'32"	3 273	
	G04	青海省黄南藏族自治州河南蒙古族自治县	102°2'47"	34°31'20"	3 367	
	G05	青海省黄南藏族自治州河南蒙古族自治县	101°56'47"	34°32'11"	3 358	
	G06	青海省黄南藏族自治州河南蒙古族自治县	101°56'11.36"	34°32'32"	3 270	
	G07	甘肃省甘南藏族自治州碌曲县	102°15'25"	34°20'50"	3 343	
	G08	四川省阿坝藏族羌族自治州若尔盖县	102°57'34"	33°48'12"	3 357	
	G09	青海省果洛藏族自治州久治县	101°24'41.89"	33°27'19.63"	3 736	
	G10	青海省果洛藏族自治州久治县	101°23'19.88"	33°23'34.93"	3 740	
	G11	青海省果洛藏族自治州久治县	101°23'19.52"	33°23'35.25"	3 747	
	G12	青海省果洛藏族自治州久治县	101°18'38.38"	33°22'19.58"	3 978	
	G13	甘肃省甘南藏族自治州玛曲县	101°56'25"	33°53'41"	3 434	
	G14	四川省阿坝藏族羌族自治州阿坝县	101°27'55.36"	33°09'46.11"	3 200	
	G15	西藏自治区日喀则市亚东县	88°57'18"	27°40'21"	3 800	
	G16	西藏自治区日喀则市吉隆县	85°08'09"	28°52'53"	4 530	
匙叶甘松	S17	四川省甘孜藏族自治州理塘县	99°54'09.37"	30°08'17.66"	4 237	根茎密被叶鞘纤维；花后花序主轴和侧轴多数不明显伸长；果实被毛
	S18	四川省甘孜藏族自治州理塘县	100°15'30.33"	30°14'53.52"	4 046	
	S19	四川省甘孜藏族自治州理塘县	99°55'19.28"	30°13'13.01"	4 277	
	S20	四川省甘孜藏族自治州乡城县	99°45'09.24"	28°57'26"	3 997	

表 2 PCR 扩增与扩增程序
Table 2 PCR amplification and amplification procedures

条形码序列	引物	碱基序列 (5'→3')	退火温度/℃
ITS1	1F	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55
	1R	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
ITS2	2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	52
	2R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	



M-Marker, 1~10-样本。
M-Marker, 1—10-samples.

图 1 ITS1 (A) 和 ITS2 (B) 扩增产物的琼脂糖凝胶检测电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of amplified products in ITS1 (A) and ITS2 (B) sequences

2 数据处理

测序结果用 DNA EditSeq 软件进行剪切、拼接和统计等分析，并用 MEGA7.0 软件进行多重序列比对并用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树，并计算遗传距离，利用 DNASP ver.5.0 软件对 各居群的遗传多样性参数进行计算，并估算群体间的遗传分化系数 (genetic differentiation coefficient, G_{st})，并将不同单倍型序列用网络在线版 Mfold 进行二级结构分析。

3 结果与分析

3.1 ITS 序列 G/C 含量与长度多态性分析
分析所有材料的 ITS1 和 ITS2 序列 G+C 含量

发现, ITS1 G+C 含量为 67.92%~68.46%, ITS2 G+C 含量为 66.88%~67.09%, G+C 含量普遍较高, 都在 66%以上, 最高达 68.46% (S18)。比较各 ITS1 和 ITS2 序列, 可见其长度变化不大, ITS1 序列长

度范围为 687~689 bp, 仅 2 bp 差异, ITS2 序列长度比较一致为 468 bp。因此, 从序列 G+C 含量和长度多态性来看, 甘松属资源 ITS1 的变异较 ITS2 的序列变异大, 但二者种内变异均较小, 见表 3。

表 3 20 个甘松属样本 ITS1 和 ITS2 序列长度及 G+C 值

Table 3 ITS1 and ITS2 sequences length and G + C content in 20 samples of *Nardostachys*

编号	ITS1		ITS2		总 ITS 序列	
	长度/bp	G+C/%	长度/bp	G+C/%	长度/bp	G+C/%
G01	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G02	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G03	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G04	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G05	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G06	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G07	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G08	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G09	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G10	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G11	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G12	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G13	687	67.98	468	67.09	1 155	67.62
G14	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G15	688	68.02	468	67.09	1 156	67.65
G16	689	67.92	468	66.88	1 157	67.50
S17	688	68.31	468	67.09	1 156	67.82
S18	688	68.46	468	67.09	1 156	67.91
S19	688	68.31	468	67.09	1 156	67.82
S20	689	68.07	468	67.09	1 157	67.68

3.2 序列特征及遗传距离分析

利用 MEGA 软件对 20 个甘松属样本 ITS1 和 ITS2 序列进行对比分析, 结果见表 4。ITS1 序列比对长度为 689 bp, 变异位点为 15 个, 占该区位点的 21.8%, 简约信息位点 11 个, 其中 1 个位点发生 G/C 或 A/T 碱基的颠换、10 个位点发生 GC/AT 碱基的转换, 简约信息位点为变异较大的位点。如表 5 所示, ITS2 序列比对长度为 468 bp, 变异位点为 7 个, 占 15.0%, 简约信息位点 6 个, 其中 1 个位点发生 G/C 或 A/T 碱基的颠换、5 个位点发生 GC/AT 碱基的转换。

序列变异结果分析表明, ITS1 序列的变异位点较 ITS2 序列变异位点多, 甘松与匙叶甘松的 ITS1 和 ITS2 序列差异较大, 差异的碱基及位点的变化呈现出一定的规律性, 即在特定的位点变异, 且变异的碱基大多相同; 不同产地的甘松之间、不同产地的匙叶甘松之间变异均较小。

基于 K2P 模型对实验材料进行遗传距离分析, 结果 (表 6) 表明, 甘松种内平均遗传距离为 0.001 7, 匙叶甘松种内平均遗传距离为 0.005 2, 种间平均遗传距离为 0.005 3, 种内平均遗传距离小于种间平均遗传距离。

3.3 聚类与同源性分析

构建的系统发育树 (图 2) 可看出, 20 个甘松属样本可分为 2 大类, 其中各个地区的甘松 (G1~G16) 聚为一组, 匙叶甘松 (S17~S20) 聚为另一组。上述结果与形态学分类中归为 2 个不同的种的分类结果一致, 说明 ITS 序列可用于鉴别甘松与匙叶甘松。此外, 本研究所用甘松样品可分为 2 个亚类, 其中第一个亚类包括 14 个种质资源, 3 个来自四川、9 个来自青海、2 个来自甘肃; 第 2 个亚类包括 2 个种质资源均来自西藏。ITS 聚类结果与种质的纬度空间分布具有一定的相关性。可见, ITS 分子标记在一定程度上反映了甘松属种质的地理分布特点。

表 4 ITS1 简约信息位点
Table 4 Parsimony informative site of ITS1

编号	简约信息位点/bp										
	56	67	166	183	235	510	554	560	568	581	583
G01	G	A	C	C	A	T	T	T	C	A	C
G02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G03	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G04	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G05	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G06	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G08	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G09	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G13	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G15	*	*	G	T	C	*	G	*	A	*	*
G16	*	*	G	T	C	*	G	*	A	*	*
S17	*	G	G	T	C	C	G	*	*	G	A
S18	T	G	G	T	C	C	G	C	*	G	A
S19	T	G	G	T	C	C	G	*	*	G	A
S20	T	G	G	T	C	*	G	C	*	*	*

表 5 ITS2 简约信息位点
Table 5 Parsimony informative site of ITS2

编号	简约信息位点/bp					
	122	174	190	191	290	301
G01	T	G	C	G	T	C
G02	*	*	*	*	*	*
G03	*	*	*	*	*	*
G04	*	*	*	*	*	*
G05	*	*	*	*	*	*
G06	*	*	*	*	*	*
G07	*	*	*	*	*	*
G08	*	*	*	*	*	*
G09	*	*	*	*	*	*
G10	*	*	*	*	*	*
G11	*	*	*	*	*	*
G12	*	*	*	*	*	*
G13	*	*	*	*	*	*
G14	*	*	*	*	*	*
G15	G	A	*	C	*	*
G16	G	A	*	C	*	*
S17	G	A	A	C	C	*
S18	G	A	*	C	C	A
S19	G	A	A	C	C	*
S20	G	A	*	C	C	A

表 6 甘松属 2 种药用植物的遗传距离
Table 6 Genetic distances among two medicinal plants in *Nardostachys*

比较对象	两两之间遗传距离	平均遗传距离
甘松 16 个 ITS 序列	0.000 0~0.007 8	0.001 7
匙叶甘松 4 个 ITS 序列	0.001 7~0.009 5	0.005 2
甘松属	0.000 0~0.013 0	0.005 3

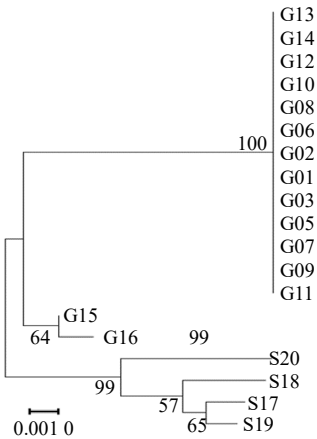


图 2 基于 ITS 序列构建甘松属样本 NJ 聚类树
Fig. 2 NJ Phylogenetic trees of *Nardostachys* based on ITS sequences

本研究进一步利用 DNASTAR 软件对甘松属 20 个样品的 ITS 序列间的同源性和差异性进行分析,结果如图 3 所示,物种水平上看,甘松(G1~G16) ITS 序列的同源性在 99.0%~100%,差异性在 0~0.8%,其中 G1~G14 的 ITS 序列完全一致,说明若尔盖县、河南蒙古自治县、久治县、碌曲县和玛曲县几个地区的甘松没有因为地理变化而发生碱基上的突变,而 G15、G16 与 G1~G14 的同源性在 99.0%~99.3%,差异性在 0.7%~0.8%,说明东亚县、吉隆县几个地区与其余地区的甘松相比,碱基序列有较小变化,可能是由于地理变化引起的。匙叶甘松(S17~S20)同源性在 99.0%~

99.8%,差异性在 0.2%~1.0%,说明不同地区的匙叶甘松碱基序列有一定差异。从属的水平看,甘松与匙叶甘松的同源性在 98.5%~99.8%,差异性在 0.7%~1.3%,甘松与匙叶甘松 ITS 碱基序列有较小差异,表明二者亲缘关系较近。

3.4 ITS 序列二级结构分析

在甘松属的 2 个品种的 ITS 基因中,分别选择遗传距离最远的 2 个序列,ITS1 序列选择甘松 G01 和 G16、匙叶甘松 S17 和 S20,ITS2 序列选择甘松 G01 和 G16、匙叶甘松 S17 和 S18,采用 RNAfold web server 在线版绘制其二级结构,见图 4。甘松与匙叶甘松 ITS1 序列二级结构构象、茎环及内部环的结构

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
差异性%	1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	1 G1	
	2	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	2 G2	
	3	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	3 G3	
	4	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	4 G4	
	5	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	5 G5	
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	6 G6	
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	7 G7	
	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	8 G8	
	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	9 G9	
	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	10 G10	
	11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	11 G11	
	12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.9	100.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	12 G12	
	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.9	99.2	99.0	98.7	98.6	98.7	98.5	13 G13
	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	99.3	99.1	98.8	98.7	98.8	98.6	14 G14
	15	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	99.8	99.3	99.2	99.3	99.1	15 G15	
	16	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.1	99.1	99.1	99.1	99.1	16 G16	
	17	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	0.7	0.8	99.6	99.8	99.0	17 S17	
	18	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	0.8	0.9	0.4	99.7	99.4	18 S18	
	19	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	0.7	0.8	0.2	0.3	99.1	19 S19	
	20	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	0.8	0.9	1.0	0.5	0.8	20 S20	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
	同源性%																					

同源性/%

图 3 20 个甘松属样本 ITS 序列的同源性及其差异性

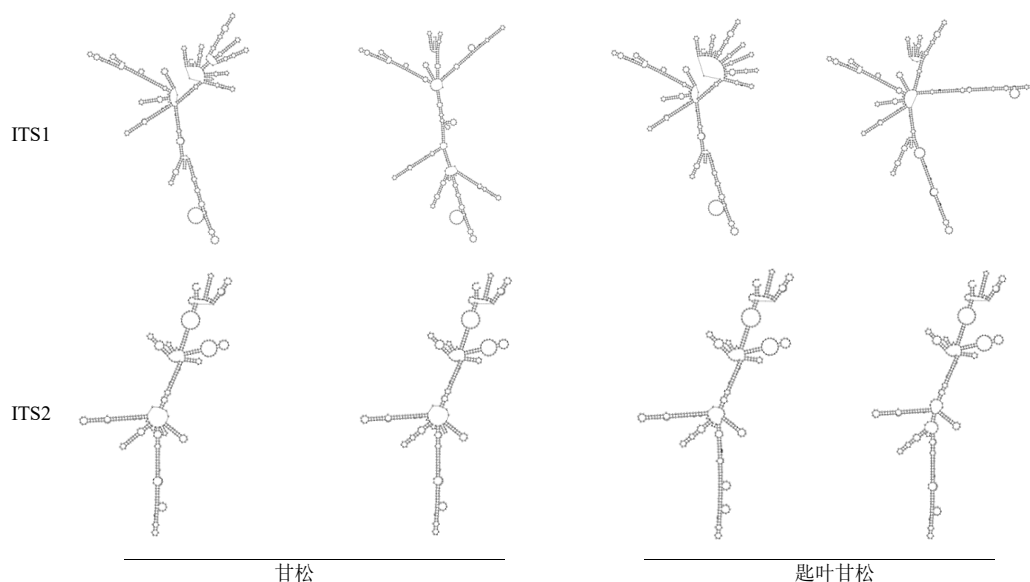
Fig. 3 Homology and difference of ITS sequences among 20 samples of *Nardostachys*

图 4 基于 ITS 序列构建的 rRNA 二级结构

Fig. 4 rRNA secondary structure based on ITS sequences

均有明显差异，而 ITS2 序列二级结构差异较小，这与 ITS1 和 ITS2 序列的碱基变异程度不同有关，结果与序列特征分析一致。

3.5 甘松与匙叶甘松遗传多样性比较

利用 DNAsp 软件对甘松属资源进行遗传多样性进行分析，分离点位数(number of segregating sites, S)、单倍型数量(number of haplotypes, Hh)、单倍型多样性(haplotypes diversity, Hd)、平均核苷酸差异(average number of nucleotide

differences, k)和核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)分别进行计算，结果如表 7 所示，甘松种群分离位点数为 9，共 3 个单倍型，单倍型多样性为 0.242，平均核苷酸差异为 1.992 和核苷酸多样性为 0.001 72；匙叶甘松分离位点数为 11，共 4 个单倍型，单倍型多样性为 1.000，平均核苷酸差异为 6.000 和核苷酸多样性为 0.005 19。综合遗传多样性水平指标也显示，甘松的遗传多样性小于匙叶甘松(图 5)。

表 7 甘松与匙叶甘松的遗传多样性参数统计

Table 7 Statistics of genetic diversity parameters of *N. chinensis* and *N. jatamansi*

品种	单倍型	编号	分离点位数	序列数目	单倍型数量	单倍型多样性	核苷酸多样性	平均核苷酸差异
甘松	Hap1	G1~G14	9	16	3	0.242	0.001 72	1.992
	Hap2	G15						
	Hap3	G16						
匙叶甘松	Hap4	S17	11	4	4	1.000	0.005 19	6.000
	Hap5	S18						
	Hap6	S19						
	Hap7	S20						

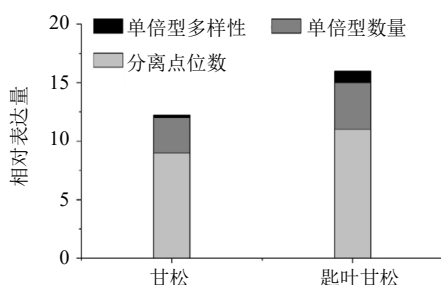


图 5 甘松与匙叶甘松的遗传多样性比较

Fig. 5 Comparison of genetic diversity between *N. chinensis* and *N. jatamansi*

4 讨论

4.1 形态学

甘松为重要的中药材及民族药材，基原准确是保证药材质量的基础及关键。早期研究认为世界甘松属资源分为甘松、匙叶甘松和大花甘松 3 种，其中，我国产甘松和匙叶甘松 2 种，但它们现在被 Flora of China (《中国植物志》英文版)认为是同一种^[18]。因此，对我国甘松属资源进行鉴定，认为我国甘松属从形态学上应为甘松和匙叶甘松 2 种，二者有以下显著差异：(1)甘松叶鞘残基呈片状，而匙叶甘松呈纤维状，(2)甘松叶钝形，呈倒披针状，而匙叶甘松则叶尖尖形，呈长匙状，(3)甘松果实光秃，匙叶甘松果实被毛，(4)甘松花后主轴和侧轴明显

伸长，而匙叶甘松并无明显伸长，(5)甘松花冠内光滑无毛，匙叶甘松则密布白毛。以上结论与耿晓萍等^[19]的研究结果一致。

4.2 ITS 分子标记鉴定甘松属资源的适用性

ITS 序列因受到的选择压力小，具有较高的遗传变异，被视为中草药及其近缘种的鉴定、药材真伪的鉴定、物种遗传多样性最常用的 DNA 条形码技术^[20]。缘毛紫菀 *Aster souliei* 及其近缘物种^[21]、鸡血藤 *Spatholbi caulis* 及其混伪品的鉴定及雷公藤属 *Tripterygium* 的遗传多样性^[22-23]均成功利用 ITS 序列进行鉴定。在甘松属中，金乾等^[24]利用 rbcL 序列和 ITS2 序列均无法鉴定甘松资源。本研究将 ITS2 和 ITS1 结合，利用 MEGA 软件对 ITS 序列进行系统发育分析，结果表明，甘松与匙叶甘松各自聚为一类，且与形态学鉴定结果一致，表明 ITS 可用于甘松属资源的划分与基原鉴定，且我国甘松属应分为甘松和匙叶甘松 2 种。

4.3 甘松属资源的遗传多样性与地理分布

种质资源多样性的核心是遗传多样性，资源多样性为新品种选育提供重要基础^[25]。甘松种质资源的多样性分析研究目前主要集中在形态遗传标记及生物化学遗传标记，偶见分子遗传标记研究。耿晓萍^[19]对甘松的形态学进行观测与分析，研究发现甘松与匙叶甘松表型差异明显，同时利用 HPLC 指纹

图谱分析甘松属资源的化学成分,从生物化学方面对甘松资源鉴定提供依据。上文也提及金乾^[24]利用 *rbcL* 序列对甘松属资源进行了鉴定。本研究发现形态学鉴定与 ITS 序列系统发育分析,均能对甘松属资源进行有效区分。

植物的遗传多样性与其地理分布范围存在着密切联系,自然分布广泛的物种往往具有更高的遗传多样性。甘松与匙叶甘松分布位置分析发现,二者分布在喜马拉雅山脉至横断山脉区域—青藏高原东南边缘地带。该地区是我国特有植物种类最丰富的地区,同时也是现代北温带和高山植物区系的重要分化和起源中心,具有植物种类多样化的特点^[26]。地理谱系研究的两种高原植物分布演化模式均表明,青藏高原植物群体在冰期后向边缘演化。甘松属植物分布演化可能遵循此规律从而多分布在青藏高原的东南边缘地区,分布面狭窄。本研究发现甘松属资源遗传多样性较其他物种低,这可能是造成其分布面狭窄的原因之一。同时,本研究发现,甘松遗传多样性低于匙叶甘松,但走访调查发现甘松自然分布范围却大于匙叶甘松。甘松在四川、青海、甘肃、西藏多个地区均有分布,而匙叶甘松仅在四川省甘孜藏族自治州、云南省有分布。分析原因,可能是由于气候类型不同引起的。在长期的演化过程中,基因和气候之间形成了稳定的相互作用关系。气候变化必然影响植物的遗传物质,从而导致植物的遗传多样性发生改变。甘松分布区主要为高原高山气候,其遗传物质相对稳定。而匙叶甘松分布区既有高原高山气候还受亚热带季风气候影响,使得其为适应环境发生遗传变异^[27]。马丽娟等^[28]研究发现,东北野生杏遗传多样性受气候环境影响发生遗传变异。李明等^[29]研究发现不同气候环境显著影响油松 *Pinus tabulaeformis* Carr. 居群的遗传多样性。在后续工作中,本课题组将继续走访调查甘松属资源分布区,进一步研究验证该推论。

本研究结合形态学特征分析,利用 ITS 条形码技术,研究了中国主要野生甘松分布区甘松属资源的遗传多样性,并对其分类进行分析,结果表明青藏高原分布区采集的甘松属植物资源分为甘松和匙叶甘松 2 种,为甘松属资源的分类提供分子层面的支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 尚志钧. 本草拾遗 [M]. 合肥: 皖南医学院科研科,

1983: 23.

- [2] 张旭, 兰洲, 董小萍, 等. 甘松有效成分研究 [J]. 中药材, 2007, 30(1): 38-41.
- [3] 于素玲, 叶霄, 贾国夫, 等. 青藏高原药用植物甘松研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 243-250.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 23.
- [5] 刘铁程. 甘松芳草的地名记录及汉、藏文化交流 [J]. 中国历史地理论丛, 2016, 31(4): 143-152.
- [6] 余海清, 彭克忠, 何超群, 等. 四川甘孜州不同产地甘松药材的挥发油成分分析 [J]. 安徽农业科学, 2019, 47(20): 199-203.
- [7] 李世晋, 李波, 罗世孝. 濒危野生动植物种国际贸易公约中国重点植物 [M]. 北京: 北京日报出版社, 2020: 59.
- [8] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第三十八卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1986: 36.
- [9] Satyal P, Chhetri B K, Dosoky N S, et al. Chemical composition of *Nardostachys grandiflora* rhizome oil from Nepal: A contribution to the chemotaxonomy and bioactivity of *Nardostachys* [J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(6): 1067-1070.
- [10] Wang X C, Liu C, Huang L, et al. ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? [J]. *Mol Ecol Resour*, 2015, 15(3): 573-586.
- [11] Urbanowicz J, Gaweł A, Bobrek K. *Ascaridia galli* isolates with ITS1-5.8rRNA-ITS2 fragment homologous to *Ascaridia columbae* [J]. *Acta Parasitol*, 2018, 63(3): 640-644.
- [12] 侯富国, 桂新景, 王艳丽, 等. 基于智能视觉技术的白及饮片真伪快速辨识方法研究 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 509-519.
- [13] 叶晓霞, 周兴文, 赵仕花, 等. 八角 DNA 条形码分子鉴定 [J]. 分子植物育种, 2022, 5: 1-11.
- [14] 赵新礼, 舒泉湧, 崔蕾, 等. 倒卵叶五加药材的基原鉴定研究 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(15): 166-172.
- [15] 关婉, 张丹纯, 丁晓霞, 等. 广东省巴戟天 DNA 条形码及遗传多样性分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(10): 3765-3771.
- [16] 张国林, 邢以文, 薛满. DNA 条形码等分子鉴定技术与动植物类中药材的鉴定 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(2): 381-388.
- [17] 张力鹏, 滕彦娇, 宋文芹, 等. 西藏地区红景天属植物 ITS, *rbcL*, *trnS-G* 序列多态性分析 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2019, 52(5): 93-101.
- [18] 吴征镒, 洪德元. 中国植物志 [M]. 北京: 北京科学出版社, 2011: 26.
- [19] 耿晓萍. 甘松化学成分及质量标准研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.

- [20] Voglmayr H. Phylogenetic relationships of *Peronospora* and related Genera based on nuclear ribosomal ITS sequences [J]. *Mycol Res*, 2003, 107(Pt 10): 1132-1142.
- [21] 赵日杂, 张英秀, 王君军, 等. 基于 DNA 条形码鉴别缘毛紫菀及狭苞紫菀 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6167-617.
- [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] 励娜, 王丹, 陈一龙, 等. 基于 ITS2 DNA 序列的雷公藤属药材资源谱系地理学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5476-5483.
- [24] 金乾. 藏药植物甘松的生药学研究 [D]. 成都: 西南民族大学, 2019.
- [25] 徐燕玲, 王振宇, 杨淑达, 等. 进化生态学在药用植物种质资源评价中的应用与展望 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1221-1233.
- [26] 张婵, 安宇梦, Yun J SCHKE, 等. 青藏高原及周边高山地区的植物繁殖生态学研究进展 [J]. 植物生态学报, 2020, 44(1): 1-21.
- [27] 何远政, 黄文达, 赵昕, 等. 气候变化对植物多样性的影响研究综述 [J]. 中国沙漠, 2021, 41(1): 59-66.
- [28] 马丽娟, 郭太君, 何丹丹, 等. 中国东北部野生杏资源 ISSR 遗传多样性 [J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(12): 13-16.
- [29] 李明, 王树香, 高宝嘉. 油松天然次生林居群遗传多样性及与产地地理气候因子的关联分析 [J]. 生态学报, 2013, 33(12): 3602-3610.

[责任编辑 时圣明]