

多基原民族药岩陀DNA条形码鉴定

方强强, 王燕*

(大理大学 药学与化学学院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的:采用 *ITS*, *ITS2*, *rbcL*, *matK* 和 *psbA-trnH* 这5种热门DNA条形码序列对多基原民族药岩陀的鉴别能力进行评价,筛选出适合该物种鉴定的DNA条形码。方法:通过比较各序列聚合酶链式反应(PCR)扩增成功率及测序成功率,计算种内种间遗传距离,运用 Wilcoxon 非参数秩和检验进行遗传差异分析,邻接(NJ)法构建系统发育树以及采用 Blast 1 和 NJ 建树方法评价不同序列对物种的鉴定成功率等策略的实施,综合评价上述5种DNA候选条形码在多基原岩陀植物中的鉴别效果。结果:*ITS*序列扩增成功率及测序成功率分别为100%和96.61%;*ITS2*序列扩增成功率及测序成功率分别为100%和98.31%;*psbA-trnH*序列扩增成功率及测序成功率均为100%;*rbcL*序列扩增成功率及测序成功率均为100%,*matK*扩增成功率及测序成功率均为98.31%。*psbA-trnH*序列拥有最高的种内及种间遗传变异,且种内最大变异的平均值小于种间最小变异的平均值。系统发育树构建结果显示,*psbA-trnH*序列能区分3种不同来源的岩陀药用植物,而*ITS*,*ITS2*,*rbcL*和*matK*序列聚类效果较差。*psbA-trnH*序列鉴定成功率均为100%,而*ITS*,*ITS2*,*matK*和*rbcL*序列对物种鉴定成功率均低于50%。结论:*psbA-trnH*较其他序列有明显优势,因此推荐*psbA-trnH*序列作为理想的DNA条形码,用于多基原民族药岩陀的鉴定研究。

[关键词] 岩陀; DNA条形码; 分子鉴定

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0142-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201811

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200619.1757.007.html>

[网络出版日期] 2020-6-20 16:59

Identification of Multi-source Ethnodrug *Rodgersiae Rhizoma* by DNA Barcoding Technology

FANG Qiang-qiang, WANG Yan*

(College of Pharmacology and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** Five popular DNA barcoding sequences, namely *ITS*, *ITS2*, *rbcL*, *matK* and *psbA-trnH*, were employed to evaluate the identification efficiency of multi-source ethnodrug *Rodgersiae Rhizoma*, and the most suitable sequence was then screened out. **Method:** Efficiency of polymerase chain reaction (PCR) amplification, success rate of sequencing, intra- and inter-specific distances calculated by rank sum test, phylogenetic tree constructed with neighbor-joining (NJ) method and identification efficiency assessed by Blast 1 and NJ method were adopted in this study. **Result:** Efficiency of PCR amplification and success rate of sequencing for *ITS*, *ITS2*, *psbA-trnH*, *rbcL* and *matK* were 100%, 96.61%, 100%, 98.31%, 100%, 100%, 100%, 98.31% and 98.31%, respectively. Intra- and inter-specific genetic distances and identification achievement rate for *psbA-trnH* were the highest among the five candidate sequences. Besides, the average coalescent depth was less than the smallest interspecific distance for *psbA-trnH*. Phylogenetic tree also illustrated that *Rodgersiae Rhizoma* could be distinguished based on *psbA-trnH*. **Conclusion:** According to the findings, *psbA-trnH* was superior to other DNA barcodes. Therefore, *psbA-trnH* was recommended as the ideal DNA

[收稿日期] 20200420(024)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560695);大理大学博士启动基金项目(KYBS201512);大理大学第八批中青年学术带头人培养基金项目

[第一作者] 方强强, 硕士, 从事中药DNA条形码研究, E-mail: 1053725723@qq.com

[通信作者] *王燕, 从事中药DNA条形码研究, E-mail: 175404624@qq.com

barcode for the identification of multi-source ethnodrug *Rodgersiae Rhizoma*.

[Key words] *Rodgersiae Rhizoma*; DNA barcoding; molecular identification

岩陀来源于虎耳草科鬼灯檠属植物西南鬼灯檠、羽叶鬼灯檠或七叶鬼灯檠的干燥根茎^[1],为少数民族(苗族、白族、傈僳族等)习用药材,对支气管炎、风湿关节炎、肠炎、外伤出血等疾病有明显疗效^[2-3]。长期以来,目前也没有相关文献对鬼灯檠种属进行明确划分,3种鬼灯檠来源的岩陀药材均在市场上流通并混淆使用致使其品种混乱;传统的中药鉴定方法通常采用眼看、手摸、鼻闻等表观方式或者根据药物理化性质进行判定,然而对于多基原药材而言,由于其表观形态、结构极其相似,化学成分易受生境和储存条件等因素影响,加之传统鉴别方法对鉴定人员的专业知识和经验积累有较高要求,未经过专业训练的人员很难保证精确无误地准确区分近缘种物种。3种鬼灯檠虽均为正品,但化学成分及其含量存在差异^[2],药材标准也未进行统一修订,致使其品质不一、药材市场混乱、质量控制不尽人意,这些因素的存在均难以保证岩陀临床用药的安全性和有效性。因此,寻找一种准确、有效、可靠的技术用于解决岩陀基原鉴定问题尤为必要。

DNA条形码技术是一种新兴的分子生物学鉴别技术,该技术利用一段标准DNA短片段对物种进行快速、准确的鉴定^[4-7]。作为物种鉴定的DNA理

想条形码序列应该保证具有良好的通用引物,合适的序列长度,较小的种内变异和较大的种间变异^[8]。该技术可以弥补和克服传统形态学鉴别物种时产生的诸多问题和缺陷,并且该方法不需要太多鉴别经验的累积,可以满足不同科研背景工作者对中药快速鉴定的要求^[9]。本文采用众多学者推荐的在物种鉴定方面具有良好效率的DNA条形码^[10-12](核糖体 *ITS*, *ITS2* 序列和叶绿体 *rbcl*, *matK*, *psbA-trnH* 序列)对3种鬼灯檠药用植物进行区分和鉴定,为进一步构建岩陀DNA条形码识别系统奠定基础,为其在分子生物学方面质量控制和资源评价提供新手段,也为岩陀药材资源保护和充分利用提供理论依据。

1 材料

3种鬼灯檠共59份样本由课题组成员于2016年8月至2019年6月采自云南省丽江、大理、昆明,贵州省威宁、六盘水、陕西省安康,甘肃省陇南等地,样品采集详细信息见表1。采集的样品经大理大学药学与化学学院生药学教研室夏从龙教授和张德全博士鉴定分别为虎耳草科鬼灯檠属植物西南鬼灯檠 *Rodgersia sambucifolia*,羽叶鬼灯檠 *R. pinnata* 或七叶鬼灯檠 *R. aesculigolia*。新鲜植物叶片经硅胶干燥处理后于低温放置保存。

表1 3种鬼灯檠样品采集信息

Table1 Sample collection information table of three kinds of *Rodgersiae Rhizoma*

物种名称	采集地	地理坐标	海拔/m	凭证标本号	采集时间
西南鬼灯檠	中科院昆明植物研究所	N25°14'/E102°75'	1 946	DLUWYXN01	2016-06-15
<i>R.sambucifolia</i>	中科院昆明植物研究所	N25°14'/E102°75'	1 946	DLUWYXN02	2016-06-15
	中科院昆明植物研究所	N25°14'/E102°75'	1 946	DLUWYXN03	2016-06-15
	中科院昆明植物研究所	N25°14'/E102°75'	1 946	DLUWYXN04	2016-06-15
	贵州六盘水丹米县	N26°33'/E104°47'	2 088	DLUWYXN05	2016-09-03
	贵州六盘水丹米县	N26°33'/E104°47'	2 088	DLUWYXN06	2016-09-03
	云南大理苍山十六峰	N25°55'/E100°6'	2 402	DLUWYXN07	2016-08-21
	云南大理苍山十六峰	N25°55'/E100°6'	2 402	DLUWYXN08	2016-08-21
	云南大理苍山十六峰	N25°55'/E100°6'	2 402	DLUWYXN09	2016-08-21
	云南大理苍山十六峰	N25°57'/E100°6'	2 450	DLUWYXN10	2017-08-18
	云南大理苍山十六峰	N25°57'/E100°6'	2 450	DLUWYXN11	2017-08-18
	云南大理苍山十六峰	N25°57'/E100°6'	2 450	DLUWYXN12	2017-08-18
	云南大理苍山十六峰	N25°57'/E100°6'	2 450	DLUWYXN13	2017-08-18
	贵州六盘水纸厂县	N26°31'/E104°48'	2 067	DLUWYXN14	2016-09-03
	贵州六盘水纸厂县	N26°31'/E104°48'	2 067	DLUWYXN15	2016-09-03
	贵州六盘水纸厂县	N26°31'/E104°48'	2 067	DLUWYXN16	2016-09-03

续表 1

物种名称	采集地	地理坐标	海拔/m	凭证标本号	采集时间	
<i>R. aesculifolia</i>	贵州六盘水纸厂县	N26°31' / E104°48'	2 067	DLUWYXN17	2016-09-03	
	贵州六盘水纸厂县	N26°31' / E104°48'	2 067	DLUWYXN18	2016-09-03	
	贵州六盘水纸厂县	N26°31' / E104°48'	2 067	DLUWYXN19	2016-09-03	
	贵州六盘水纸厂县	N26°31' / E104°48'	2 067	DLUWYXN20	2016-09-03	
	云南大理蝴蝶泉	N25°57' / E100°6'	2 480	DLUWYXN21	2018-07-15	
	七叶鬼灯檠	贵州六盘水丹米县	N26°34' / E104°53'	1 771	DLUWYQY01	2016-09-03
	贵州六盘水丹米县	N26°34' / E104°53'	1 771	DLUWYQY02	2016-09-03	
	贵州六盘水丹米县	N26°34' / E104°53'	1 771	DLUWYQY03	2016-09-03	
	云南大理洗马潭	N25°73' / E100°18'	3 902	DLUWYQY04	2018-06-18	
	云南大理洗马潭	N25°73' / E100°18'	3 902	DLUWYQY05	2018-06-18	
	云南大理洗马潭	N25°73' / E100°18'	3 902	DLUWYQY06	2018-06-18	
	云南大理洗马潭	N25°73' / E100°18'	3 902	DLUWYQY07	2018-06-18	
	云南鹤庆马厂县	N26°32' / E100°3'	3 095	DLUWYQY08	2016-08-15	
	云南鹤庆马厂县	N26°32' / E100°3'	3 095	DLUWYQY09	2016-08-15	
	云南鹤庆马厂县	N26°32' / E100°3'	3 095	DLUWYQY10	2016-08-15	
	云南鹤庆马厂县	N26°32' / E100°3'	3 095	DLUWYQY11	2016-08-15	
	陕西安康宁陕县	N33°31' / E108°31'	901	DLUWYQY12	2019-06-07	
	陕西安康宁陕县	N33°31' / E108°31'	901	DLUWYQY13	2019-06-07	
	陕西安康宁陕县	N33°31' / E108°31'	901	DLUWYQY14	2019-06-07	
陕西安康宁陕县	N33°31' / E108°31'	901	DLUWYQY15	2019-06-07		
甘肃陇南康县	N33°32' / E105°61'	1 370	DLUWYQY16	2019-06-25		
甘肃陇南康县	N33°32' / E105°61'	1 370	DLUWYQY17	2019-06-25		
甘肃陇南康县	N33°32' / E105°61'	1 370	DLUWYQY18	2019-06-25		
<i>R. pinnata</i>	羽叶鬼灯檠	云南大理无为寺	N25°48' / E100°13'	2 635	DLUWYYY01	2016-09-18
	云南大理无为寺	N25°48' / E100°13'	2 635	DLUWYYY02	2016-09-18	
	云南大理无为寺	N25°48' / E100°13'	2 635	DLUWYYY03	2016-09-18	
	云南大理无为寺	N25°48' / E100°13'	2 635	DLUWYYY04	2016-09-18	
	云南大理无为寺	N25°48' / E100°13'	2 635	DLUWYYY05	2016-09-18	
	云南大理无为寺	N25°43' / E100°5'	2 766	DLUWYYY06	2018-06-30	
	云南大理无为寺	N25°43' / E100°5'	2 766	DLUWYYY07	2018-06-30	
	云南大理无为寺	N25°43' / E100°5'	2 766	DLUWYYY08	2018-06-30	
	贵州威宁毕节大方县	N27°09' / E105°36'	2 330	DLUWYYY09	2018-06-30	
	贵州威宁毕节大方县	N27°09' / E105°36'	2 330	DLUWYYY10	2018-06-30	
	贵州威宁毕节大方县	N27°09' / E105°36'	2 330	DLUWYYY11	2018-06-30	
	贵州威宁毕节大方县	N27°09' / E105°36'	2 330	DLUWYYY12	2018-06-30	
	云南大理花甸坝	N25°85' / E100°11'	2 259	DLUWYYY13	2016-07-02	
	云南大理花甸坝	N25°85' / E100°11'	2 259	DLUWYYY14	2016-07-02	
	云南大理花甸坝	N25°85' / E100°11'	2 259	DLUWYYY15	2016-07-02	
	云南大理花甸坝	N25°84' / E100°09'	2 269	DLUWYYY16	2017-08-23	
	云南大理花甸坝	N25°84' / E100°09'	2 269	DLUWYYY17	2017-08-23	
	云南大理花甸坝	N25°84' / E100°09'	2 269	DLUWYYY18	2017-08-23	
	云南大理花甸坝	N25°84' / E100°10'	2 249	DLUWYYY19	2018-07-14	
	云南大理花甸坝	N25°84' / E100°10'	2 249	DLUWYYY20	2018-07-14	

CP114型1/1万电子天平(美国奥豪斯公司),1-14ED型台式离心机(德国Sigma公司),XW-80A型旋涡震荡仪(上海沪西分析仪器厂有限公司),DYCP-31DN型电泳仪(北京六一生物科技有限公司),SmartSpec Plus型蛋白质核酸定量检测仪和My Cyclcr型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国伯乐公司),Gene Genius型凝胶成像仪(英国Syngene公司)。

溴化乙锭(美国Amresco公司,批号1011A042);DNA Quick Plant System型试剂盒(非离心柱型),琼脂糖,D15000 DNA Marker(北京天根生化科技有限公司,批号分别为Q6115,142045,P4816);Taq PCR Master Mix(2×, red dye),DNA Marker D(100~2 000 bp)[生工生物工程(上海)有限公司,批号分别为DA12KAC935,B415KA0150];异丙醇和

无水乙醇等均为国产分析纯。

2 方法

2.1 DNA的提取 取适量经硅胶干燥的岩陀植物叶片于预冷干净的研钵中研磨,称取细粉约20 mg于离心管中,采用试剂盒提取样品总DNA。

2.2 DNA纯度检测 将提取的各样品DNA溶液适当稀释后,采用0.8%的琼脂糖凝胶电泳,0.5×Tris-Borate-EDTA(TBE)Buffer,溴化乙锭染色,恒压(5 V·cm⁻¹),电泳45 min,凝胶成像系统拍照并观察。

2.3 候选序列PCR扩增 PCR扩增反应体积为25 μL,包含2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,DNA模板1 μL,正反向引物各1 μL,ddH₂O 9.5 μL。候选引物序列参考高婷^[13]方法,对5个候选序列PCR扩增反应程序进行优化,优化结果见表2。

表2 候选序列扩测条件优化

Table 2 Optimization results of candidate sequence expansion conditions

序列名称	引物名称	引物序列(5'-3')	PCR反应条件
ITS2	S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 °C 5 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 45 s,35 cycles;72 °C 10 min
	S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
ITS	5a fwd	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	94 °C 5 min;94 °C 30 s,50 °C 30s,72 °C 1 min,30 cycles;72 °C 10 min
	Rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
rbcL	1f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,30 cycles;72 °C 10 min
	724r	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
psbA-trnH	fwd	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	94 °C 5 min;94 °C 30 s,57 °C 1 min,72 °C 1 min,34cycles;72 °C 10 min
	Rev	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	
matK	390F	CGATCTATTCATTCAATATTC	94 °C 5 min94 °C 30 s,48 °C 30 s,72 °C 1.5 min,35 cycles;72°C 10 min
	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	

2.4 数据处理 将PCR扩增成功的样品寄送上海生工生物工程有限公司和华大基因测序公司进行双向测序。利用软件Seqman 7.1去除序列低质量区和引物区,利用MEGA7.0软件的Clustal W功能进行数据比对后,采用Kimura-2-Parameter遗传距离模型计算各样品种内种间遗传距离。采用SPSS 17.0软件对相同样本间不同候选序列遗传差异进行Wilcoxon非参数秩和检验。运用Taxon DNA软件对种内种间遗传差异进行统计分析,绘制Barcoding gap图。通过Neighbor-joining邻接(NJ)法构建系统发育树,系统发育树各分支自展支持度采用Bootstrap模型,自展次数设置为1 000。根据Blast 1^[14]和NJ建树两种方法考察物种的鉴定效率。

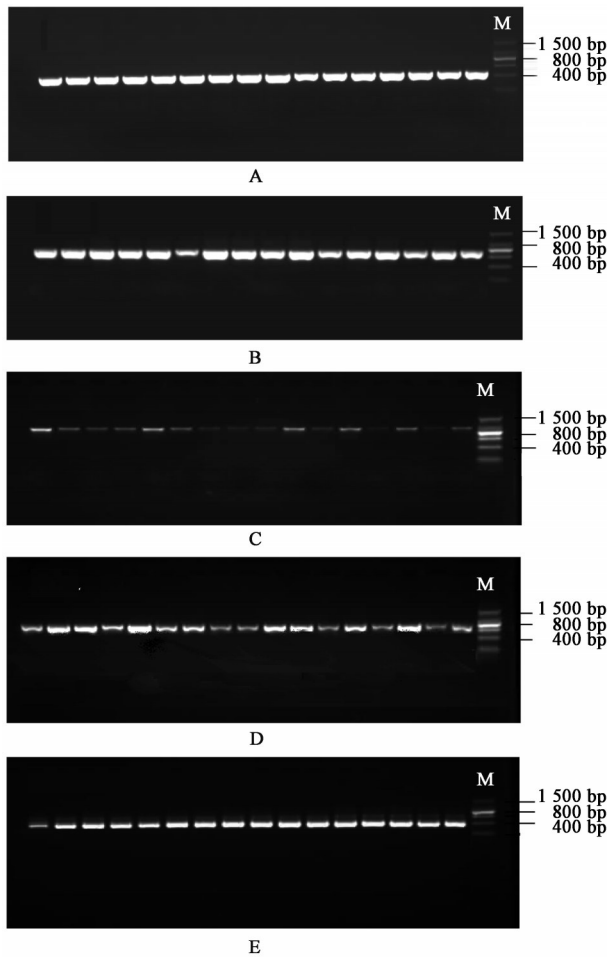
3 结果与分析

3.1 DNA提取、PCR扩增及测序 本实验对59份

样品进行DNA提取,得到的电泳条带均单一明亮且DNA长度在15 000 base pair(bp)左右。后续对所有DNA样品进行PCR扩增,ITS,ITS2,matK,rbcL和psbA-trnH序列扩增后的片段长度分别为700,400,1 200,700,400 bp左右,部分样品PCR产物电泳图见图1。将扩增成功的样品进行双向测序,获得的所有样品基因序列提交至GeneBank。

3.2 候选序列信息 对测序获得的序列峰图文件(.AB1文件)用SeqMan7.1软件进行校对拼接,并对测序错误碱基进行人工校对。比较分析各候选序列PCR扩增成功率、测序成功率、保守位点、简约位点和变异位点等信息,详细结果见表3,其中,psbA-trnH在5个候选序列中变异位点最多,且扩增和测序成功率均为100%。

3.3 遗传距离分析 采用6个阈值比较不同候选



A. *ITS2* 序列; B. *ITS* 序列; C. *matK* 序列; D. *rbcL* 序列; E. *psbA-trnH* 序列

图 1 5 种候选序列部分样品 PCR 扩增电泳

Fig. 1 PCR amplified electrophoretogram of five candidate sequences

表 4 3 种鬼灯檠种内种间遗传差异比较($\bar{x} \pm s, n=291$)

Table 4 Comparison of genetic differences among three kinds of Rodgerside Rhizoma($\bar{x} \pm s, n=291$)

参数	<i>ITS</i>	<i>ITS2</i>	<i>matk</i>	<i>rbcL</i>	<i>psbA-trnH</i>
物种种间变异的平均值	0.001 084±0.000 900	0.000 726±0.001 022	0.000 501±0.000 674	0.000 626±0.000 754	0.004 014±0.002 069
物种种间平均变异的平均值	0.001 086±0.000 168	0.000 729±0.000 100	0.000 514±0.000 329	0.000 608±0.000 453	0.003 970±0.000 952
物种种间最小变异的平均值	0	0	0	0	0.003 160±0.001 371
物种种内变异的平均值	0.000 998±0.001 100	0.000 714±0.001 018	0.000 314±0.000 587	0.000 347±0.000 642	0.001 547±0.001 687
不同物种种内平均变异的平均值	0.001 000±0.000 517	0.000 728±0.000 277	0.000 333±0.000 379	0.000 320±0.000 415	0.001 613±0.000 671
物种种内最大变异的平均值	0.002 402±0.000 833	0.002 163±0.000 000	0.000 939±0.000 813	0.001 022±0.000 885	0.002 371±0.001 936

遗传距离有所分离,有利于区分物种 Wilcoxon 非参数秩和检验统计结果见表 6,可以看出,5 种候选序列变异性大小依次为 *psbA-trnH*>*ITS*>*ITS2*=*matK*>*rbcL*。

3.4 系统发育树构建 构建系统发育树能更好的反映各物种间的进化关系,利用 MEGA7.0 软件,采用 Kimura-2-Parameter 模型构建 NJ 树,5 条候选序

表 3 5 种候选序列基本信息

Table 3 Basic information about five candidate sequences

序列名称	序列长度 /bp	保守位点 /%	变异位点 /%	简约信息位点 /%	GC 含量 /%	PCR 扩增成功率 /%	测序成功率 /%
<i>ITS</i>	696	99.71	0.29	0.29	49.4	100	96.61
<i>ITS2</i>	463	99.78	0.22	0.22	51.6	100	98.31
<i>matK</i>	744	99.60	0.40	0.40	34.1	98.31	98.31
<i>rbcL</i>	615	99.84	0.16	0.16	43.1	100	100
<i>psbA-trnH</i>	443	99.16	0.84	0.84	27.7	100	100

序列种内种间遗传距离,计算结果见表 4。

从种间遗传距离 3 个阈值可以看出, *psbA-trnH* 序列种间遗传距离最大,其次是 *ITS* 序列, *ITS2*, *matK* 和 *rbcL* 序列种间遗传距离均低于 0.001; *ITS*, *ITS2*, *matK* 和 *rbcL* 4 个序列种间最小遗传距离均为 0。从种内遗传距离 3 个阈值可以看出 *psbA-trnH* 序列种内遗传距离也较大,而 *ITS2*, *matK* 和 *rbcL* 序列种内遗传距离均低于 0.000 9。通过种内种间遗传距离分析可知,仅 *psbA-trnH* 序列种内最大变异的平均值小于种间最小变异的平均值,使其有可能成为 3 种鬼灯檠 DNA 条形码的推荐序列。实验对各候选序列种内种间遗传差异分布进行统计,见表 5。5 种候选序列种内遗传变异集中在 0.3% 以下; *ITS*, *ITS2*, *matK* 和 *rbcL* 序列种内种间遗传分布有较高的重叠, *psbA-trnH* 序列种内种间遗传分布虽有部分重叠,但种间遗传差异明显高于种内遗传差异,且 Barcoding gap 具有一定趋势,相对来说,种内种间

列进行单倍体划分,见表 7,单倍型的变异位点在五条候选序列中的分布情况见表 8,研究 3 种鬼灯檠植物的 5 种候选序列聚类分支情况,为了更好的定位进化树树根,从 GeneBank 下载与岩陀同科不同属的梅花草属梅花草 (*Parnassia palustris*) 3 条序列 (GeneBank ID AY929353.1, KC475154.1, JF942903.1) 和山梅花属云南山梅花 (*Philadelphus*

表 5 不同候选序列种内种间遗传分布情况

Table 5 Intraspecific and intraspecific genetic distribution of different candidate sequences %

序列	种内		种间	
	遗传距离	频率	遗传距离	频数
<i>ITS</i>	0	44.36	0	34.94
	0.10~0.15	42.02	0~0.1	54.90
	0.25~0.3	13.62	0.25~0.3	10.17
<i>ITS2</i>	0	66.98	0	66.43
	0.20~0.25	33.02	0.20~0.25	33.57
<i>matK</i>	0	77.67	0	64.43
	0.10~0.15	22.33	0.10~0.15	35.57
<i>rbcL</i>	0	77.40	0	59.15
	0.15~0.20	22.60	0.15~0.20	40.85
<i>psbA-trnH</i>	0	48.65	0	8.55
	0.20~0.25	37.43	0.20~0.25	32.38
	0.45~0.50	13.92	0.45~0.50	40.42
	0.70~0.75	0	0.70~0.75	18.65

表 6 各候选序列 Wilcoxon 秩和检验

Table 6 Wilcoxon rank sum test for candidate sequence

正号秩和(W^+)	负号秩和(W^-)	相对秩和	n	P	结果
<i>ITS</i>	<i>ITS2</i>	$W^+=240.25, W^-=164.80$	666	0	<i>ITS>ITS2</i>
<i>ITS</i>	<i>matK</i>	$W^+=187.03, W^-=60.50$	496	0	<i>ITS>matK</i>
<i>ITS</i>	<i>rbcL</i>	$W^+=85.43, W^-=34.36$	190	0	<i>ITS>rbcL</i>
<i>ITS</i>	<i>psbA-trnH</i>	$W^+=349.06, W^-=791.60$	1 596	0	<i>ITS<psbA-trnH</i>
<i>ITS2</i>	<i>matK</i>	$W^+=64.94, W^-=61.52$	153	0.286	<i>ITS2=matK</i>
<i>ITS2</i>	<i>rbcL</i>	$W^+=90.37, W^-=84.50$	231	0	<i>ITS2>rbcL</i>
<i>ITS2</i>	<i>psbA-trnH</i>	$W^+=89.50, W^-=186.27$	435	0	<i>ITS2<psbA-trnH</i>
<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	$W^+=112.14, W^-=75.99$	351	0.005	<i>matK>rbcL</i>
<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i>	$W^+=260.00, W^-=713.21$	1 596	0	<i>matK<psbA-trnH</i>
<i>rbcL</i>	<i>psbA-trnH</i>	$W^+=235.00, W^-=657.96$	1 596	0	<i>rbcL<psbA-trnH</i>

七叶鬼灯檠样品的聚类没有明显的地域差别,采自甘肃陇南康县和陕西安康宁陕县的七叶鬼灯檠聚为一小支后再与其他产地(贵州六盘水丹米县、云南大理洗马潭和云南鹤庆马厂县)的七叶鬼灯檠聚类,表明不同产地的七叶鬼灯檠样品之间无显著差异;羽叶鬼灯檠和西南鬼灯檠主产于云南、贵州两省,2种鬼灯檠 *psbA-trnH* 基因序列均出现了地域差异性,表明种内还是发生了一定程度的变异,例如从贵州采集的西南鬼灯檠与云南采集的西南鬼灯檠大致分别聚为一小支的情况。但这种种内变异并不是特别显著,因同种样品不同产地之间又出现

delavayi) 2 条序列 (GeneBank ID MF785648.1, MF785951.1) 作为建树分析的外类枝。建树结果见图 2。

ITS, *ITS2*, *matK* 和 *rbcL* 序列 NJ 建树结果混乱, *ITS* 序列样品聚为 3 支,每个聚类分支都混有 3 种鬼灯檠; *ITS2* 序列聚类情况与 *ITS* 相似; *matK* 序列样品聚类分为 2 支,采自贵州六盘水丹米县的七叶鬼灯檠首先聚为一分支后再与其他产地的不同鬼灯檠聚类,致使岩陀不同品种聚类结果混淆不清; *rbcL* 序列聚类效果也极差,原因可能为 *matK* 和 *rbcL* 基因序列相对比较保守,自身变异率很低,从而导致近缘种没有足够长的时间遗传分化成单系群,这也意味着 *matK* 和 *rbcL* 不适合单独用于区分亲缘关系非常近的物种。

psbA-trnH 序列可以将采集的每种鬼灯檠所有样本单独聚为具有高支持率的单系,即七叶鬼灯檠、羽叶鬼灯檠、西南鬼灯檠样品都各自单独聚为一支,自展支持率在 87% 以上,种间关系明确。

相互交叠的现象,例如采自贵州威宁毕节大方县的 4 批羽叶鬼灯檠其中有 3 批与采自云南大理无为寺的羽叶鬼灯檠聚为一小支,而另外一批采自贵州威宁毕节大方县的羽叶鬼灯檠又与采自云南大理花甸坝的羽叶鬼灯檠聚类的情况,可能的原因为云南贵州两省地理位置相近,致使样品遗传变异的累积效果表现的不明显。另外,七叶鬼灯檠和羽叶鬼灯檠最终合并为一大支,自展支持率高达 100%,表明七叶鬼灯檠和羽叶鬼灯檠较西南鬼灯檠亲缘关系更近,《中国植物志》描述七叶鬼灯檠和羽叶鬼灯檠外观上极为相似,仅叶片形态有细微差别, NJ 建树

表7 不同候选序列聚类分组情况

Table 7 Grouping of different candidate sequences

单倍型组编号	凭证标本号	单倍型组编号	凭证标本号
A1	DLUWYYY01-04	B1	DLUWYYY01-07
A2	DLUWYYY05,DLUWYYY08,DLUWYYY20	B2	DLUWYYY08,DLUWYYY14
A3	DLUWYYY06-07,DLUWYYY09-17	B3	DLUWYYY09-13,DLUWYYY15-20
A4	DLUWYYY19	B4	DLUWYQY01-13
A5	DLUWYQY01-03,DLUWYQY07-09,DLUWYQY11	B5	DLUWYQY14-18
A6	DLUWYQY04-06,DLUWYQY10,DLUWYQY12-13	B6	DLUWYXN01-06
A7	DLUWYQY14-18	B7	DLUWYXN07-09,DLUWYXN12-13
A8	DLUWYXN01-04,DLUWYXN06	B8	DLUWYXN10-11,DLUWYXN14-16,DLUWYXN18-21
A9	DLUWYXN05,DLUWYXN011,DLUWYXN14-15,DLUWYXN18-21	D1	DLUWYYY01-20
A10	DLUWYXN07-10,DLUWYXN12-13,DLUWYXN16	D2	DLUWYQY01-13
C1	DLUWYYY01-20	D3	DLUWYQY14
C2	DLUWYQY01-09	D4	DLUWYQY15-18
C3	DLUWYQY10-13,DLUWYQY15-18	D5	DLUWYXN01-04,DLUWYXN07-13,DLUWYXN21
C4	DLUWYQY14	D6	DLUWYXN05-06,DLUWYXN14-19
C5	DLUWYXN01-04,DLUWYXN07-13	D7	DLUWYXN20
C6	DLUWYXN14-20	H1	DLUWYYY01-04,DLUWYYY06-10,DLUWYYY12,DLUWYYY18
C7	DLUWYXN21	H2	DLUWYYY05,DLUWYYY11,DLUWYYY13-17,DLUWYYY19-20
C8	DLUWYXN05-06	H3	DLUWYQY01-11
H4	DLUWYQY12-18	H5	DLUWYXN01,DLUWYXN03-04,DLUWYXN06-13,DLUWYXN21
H6	DLUWYXN02,DLUWYXN05,DLUWYXN14-20		

注:A,B,C,D,H组分别为 *ITS*, *ITS2*, *matK*, *rbcL*, *psbA-trnH* 序列单倍型组。

结果与形态学鉴定的分类结果一致。对比NJ结果可以看出,基于 *psbA-trnH* 的DNA条形码技术能有效区分岩陀种类。

3.5 不同序列鉴定能力考察 不同候选DNA片段的物种鉴定成功率是评价候选序列好坏的条件之一。因此,对候选序列鉴定能力的考察也是衡量该序列鉴别物种可靠性的重要组成部分。本课题采用Blast1^[14]和NJ建树2种方法考察序列对物种的鉴别能力,评价不同序列物种鉴定的可靠性,结果见表9。*psbA-trnH* 序列鉴定成功率均为100%,*ITS*,*ITS2*,*matK*和*rbcL*序列均低于50%,Blast1和NJ建树2种方法鉴定结果基本一致,因此,确定*psbA-trnH*序列可以作为3种鬼灯檠DNA条形码鉴别序列。

4 讨论

长期以来,对岩陀的基础研究还很薄弱,主要

集中在化学成分^[15-16]、药理药效^[17]等方面,在亲缘关系、遗传多样性等方面欠缺深入研究,而了解物种间的亲缘关系是合理有效利用多基原植物种质资源的前提与基础。

DNA条形码技术已广泛运用于多种中药材的研究中,但关于不同条形码在岩陀物种方面的鉴定,尤其是在亲缘关系较近的3种鬼灯檠药用植物中的识别能力未见报道。因此,本研究选取*psbA-trnH*,*matK*,*rbcL*,*ITS*和*ITS2*为候选DNA条形码,探讨不同序列在该物种鉴定方面的有效性。在种内种间遗传变异分析,Barcoding gap检验,Wilcoxon非参数秩和检测,NJ建树以及Blast1和NJ建树2种方法评价各序列鉴定能力中,*psbA-trnH*与其他候选条形码相比具有明显优势,因此,推断*psbA-trnH*序列可作为3种鬼灯檠物种DNA条形码的鉴别序列。

表8 3种鬼灯檠不同单倍型的变异位在候选序列中的分布情况

Table 8 Distribution of variation sites of different haplotypes in candidate sequences in three kinds of Rodgersiae Rhizoma

编号	ITS			编号	ITS2			编号	matK			编号	rbcL			编号	psbA-trnH									
	1	4	5		1		2		2		2		5	9	1	1	1	2	2	2	4	4				
	0	2	1		4		4		4		4		9	6	8	8	9	0	7	8	0	2				
Hap	N	9	0	Hap	N	2	Hap	N	0	Hap	N	6	Hap	N			5	6	8	8	5	0	5	6		
A1	4	A	G	A	B1	7	A	C1	20	A	D1	20	A	H1	11	C	I ^a	-	-	A	-	T	G	-	-	
A2	3	A	G	T	B2	2	T	C2	9	A	D2	13	A	H2	9	C	I ^a	-	-	A	I ^b	T	T	-	I ^d	
A3	11	A	G	A	B3	11	A	C3	9	A	D3	1	C	H3	11	T	I ^a	T	T	A	-	T	T	-	I ^d	
A4	1	A	G	A	B4	13	A	C4	1	C	D4	4	A	H4	7	C	I ^a	T	T	A	-	G	T	-	I ^d	
A5	7	A	A	A	B5	5	T	C5	11	C	D5	11	C	H5	12	T	-	T	-	C	-	T	T	I ^c	I ^d	
A6	6	A	G	A	B6	6	A	C6	7	A	D6	8	A	H6	9	T	-	T	-	A	-	T	T	-	I ^d	
A7	5	-	G	T	B7	5	T	C7	1	C	D7	1	A													
A8	5	A	A	A	B8	9	A	C8	2	A																
A9	8	A	G	A																						
A10	7	A	G	T																						

注: Hap, 单倍型; I^a-AGTAAA I^b-CTTAAATCAAGTATTAT I^c-TTAATTATAAATACTA I^d-TAAATACTATATA。

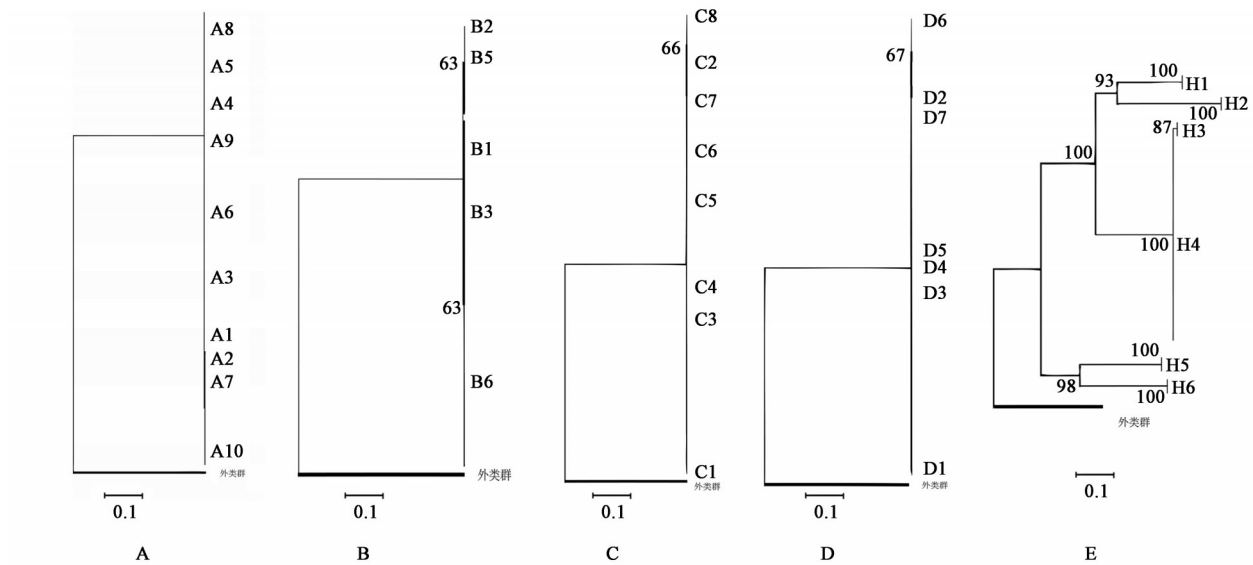


图2 候选序列NJ建树
A.3种鬼灯檠ITS序列NJ建树(*Parnassia palustris*为外类枝, Genbank AY929353.1); B.3种鬼灯檠ITS2序列NJ建树图(*Philadelphus delavayi*为外类枝, Genbank MF785648.1); C.3种鬼灯檠matK序列NJ建树(*Parnassia palustris*为外类枝, Genbank KC475154.1); D.3种鬼灯檠rbcL序列NJ建树(*Parnassia palustris*为外类枝, Genbank JF942903.1); E.3种鬼灯檠psbA-trnH序列NJ建树(*Philadelphus delavayi*为外类枝, Genbank MF785951.1)

图2 候选序列NJ建树

Fig. 2 NJ tree of candidate sequences

psbA-trnH序列作为叶绿体非编码区序列,和核糖体ITS序列同样具有较高的鉴定能力,通过阅读大量文献报道总结得出,叶绿体psbA-trnH序列鉴别物种多数是与其他序列组合出现,分析原因可能是与该序列在不同物种间隔期中变异性大或该序列存在较高比例的插入/缺失等现象有关,该序列在DNA条形码鉴别研究中作为通用序列,但满足对物

种的鉴别准确性其数据分析方法的研究还需进一步完善,本研究中限于岩陀采集种类少,仅有3类,对国内岩陀品种不能进行全面剖析,有待不断研究完善。但研究中采集的各类岩陀样品均涵盖了主产区,对该物种DNA条形码鉴别研究尚有一定代表性。

关于DNA条形码的研究目前大多集中在亲缘

表9 候选序列物种鉴定成功率

Table 9 Candidate sequence species identification success rate

序列名称	样品数量/个	正确鉴定率/%	
		Blast 1 法	NJ法
<i>ITS</i>	57	35.09	31.58
<i>ITS2</i>	58	34.48	31.03
<i>matK</i>	58	43.10	32.75
<i>rbcL</i>	59	27.12	20.33
<i>psbA-trnH</i>	59	100	100

关系较远的物种之间进行,本文则是少数的将目标定位于评价DNA条形码在种水平中识别能力的研究之一,而不仅仅限于在高级分类单元中的物种鉴别。随着技术的不断深入,越来越多的学者认为关于近缘物种DNA条形码的鉴定需要采用更多的片段进行,例如全基因组序列。因此,不同基原岩陀全基因组分析有待后续研究。

[参考文献]

[1] 湖南省食品药品监督管理局.湖南省中药材标准[M].长沙:湖南科学技术出版社,2010.

[2] 王燕,鲍家科,金杨,等.岩陀药材质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):85-88.

[3] 李萍萍,孟衡玲,陈军文,等.云南岩陀及其近缘种质资源群体表型多样性[J].生态学报,2012,32(24):7747-7756.

[4] CASIRAGHI M, LABRA M, FERRI E, et al. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method RID E-7273-2011 [J]. Brief Biginform, 2010, 11(4):440-453.

[5] 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.

[6] 石召华,陈士林,姚辉,等.娑罗子基原物种的DNA条形码鉴定研究[J].中草药,2013,44(18):2593-2599.

[7] 孙稚颖,陈士林,姚辉,等.基于ITS2序列的羌活及其混伪品的DNA条形码鉴定[J].中草药,2012,43(3):568-571.

[8] PETERSEN G, SEBERG O. A DNA barcode for land plants[J].Proc Natl Acad Sci, 2009, 106(31):12794-12797.

[9] 陈士林.中药DNA条形码分子鉴定[M].北京:人民卫生出版社,2012.

[10] 陈芙蓉,汪涛,郭巧生,等.基于DNA条形码 *psbA-trnH*, *matK*, *trnL* 对不同地理居群野菊和药用菊的鉴定研究[J].中国中药杂志,2019,44(4):38-43.

[11] 刘海双.DNA条形码与SRAP标记在软枣猕猴桃种质资源鉴别中的应用[D].北京:中国农业科学院,2018.

[12] 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.

[13] 高婷.利用DNA条形码技术鉴定药用双子叶植物[D].北京:中国协和医科大学,2010.

[14] LI D Z, GAO L M, LI H T, et al. From the Cover: 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] 张诗昆.海枣和岩陀的化学成分研究[D].昆明:云南中医学院,2015.

[16] 施贵荣,李冬梅,刘光明.西南鬼灯檠的化学成分研究[J].大理学院学报,2008,7(4):1-2.

[17] 张小燕,李多伟,王义潮,等.鬼灯檠的资源分布药用价值及开发利用[J].亚热带植物科学,2005,34(2):60-62.

[责任编辑 顾雪竹]