

## · 基础研究 ·

基于 *psbA-trnH* 序列的辽宁省黄精药材  
DNA 条形码研究<sup>△</sup>高铭泽<sup>1</sup>, 于莹<sup>1</sup>, 薛嘉宁<sup>1</sup>, 尹海波<sup>1</sup>, 赵容<sup>1,2\*</sup>

1. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600;

2. 道地药材国家重点实验室, 北京 100700

**[摘要]** 目的: 基于 *psbA-trnH* 序列, 运用 DNA 条形码技术对辽宁省 12 个地区及省外 2 个地区黄精药材样本进行鉴别分析, 为辽宁省黄精药材的鉴别和遗传多样性分析提供参考。方法: 利用 DNA 试剂盒提取法, 从 38 个黄精样本的药用部位中提取 DNA, 对 *psbA-trnH* 部分进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增及双向测序, 并从 GenBank 下载药用植物黄精的不同来源和外群序列, 运用 SeqMan 软件对测序结果进行拼接, 使用 MEGA 软件对数据进行分析比对, 计算 K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离, 并采用邻接法 (NJ) 建立系统发育树进行分析。结果: 根据 NJ 系统发育树结果可知, 不同来源的所有黄精样品聚为一大支, 外群猪牙花聚为一支, 区别较明显; 辽宁省、湖北省及贵州省黄精与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 所下载的黄精聚为一支, 并且结合变异位点与遗传距离可知, 辽宁省、湖北省及贵州省的黄精物种为黄精 *Polygonatum sibiricum* Red., 种间差异较小, 辽宁省所收集的黄精有 4 个样品出现了变异位点, 其余样本碱基序列均相同。结论: 使用 *psbA-trnH* 序列 DNA 条形码技术能够对黄精药材不同的基原植物进行区分鉴别且成功率较高, 可用于对黄精属物种进行种内和种间鉴别, 为保障辽宁省黄精药材来源的准确鉴定提供参考。

**[关键词]** 黄精; *psbA-trnH*; DNA 条形码

**[中图分类号]** R282.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)03-0493-06

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20230119004

DNA Barcoding of *Polygonatum* in Liaoning Province Based on *psbA-trnH* SequencesGAO Ming-ze<sup>1</sup>, YU Ying<sup>1</sup>, XUE Jia-ning<sup>1</sup>, YIN Hai-bo<sup>1</sup>, ZHAO Rong<sup>1,2\*</sup>

1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China

**[Abstract]** **Objective:** To distinguish the *Polygonatum* samples from 12 producing regions in Liaoning Province and 2 regions outside Liaoning by DNA barcoding based on *psbA-trnH* sequences, so as to provide a theoretical basis for the identification and genetic diversity analysis of *Polygonatum* in Liaoning. **Methods:** DNA was extracted from the medicinal parts of 38 *Polygonatum* samples by DNA extraction kits. Bidirectional sequencing was performed after polymerase chain reaction (PCR) amplification of *psbA-trnH* sequences. The sequences of different *Polygonatum* sources and the outgroup were downloaded from GenBank. A neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was established based on Kimura 2-parameter (K2P) after the sequence assembly by SeqMan and sequence alignment in MEGA 11.0. **Results:** According to the phylogenetic tree, all the *Polygonatum* samples from different sources were clustered into one clade, and the outgroup (*Erythronium japonicum*) was in a separate clade. The sequences of the *Polygonatum* samples from Liaoning, Hubei, and Guizhou and those downloaded from GenBank shared the same clade. This result, together with the mutation sites and genetic distance, indicated that the *Polygonatum* species in Liaoning, Hubei, and Guizhou was *Polygonatum sibiricum* Red., with small interspecific differences. Four samples collected in Liaoning had mutation sites, and the sequences of the rest samples were the same. **Conclusion:** The DNA barcoding based on *psbA-trnH* sequences can distinguish *Polygonatum* plants of different origins with a high success rate, which can be used for the intraspecific and interspecific identification of

<sup>△</sup> [基金项目] 中央本级重大增减支项目 (2060302); 辽宁省道地 DNA 指纹图谱建立项目 (2022003)

\* [通信作者] 赵容, 副教授, 研究方向: 分子生药学; E-mail: zhaoxiaorong1985@163.com

*Polygonatum* and provide a reference for the accurate identification of *Polygonatum* resources in Liaoning.

[Keywords] *Polygonatum sibiricum* Red.; *psbA-trnH*; DNA barcode

黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 为百合科黄精属多年生草本植物, 具有重要的药用价值<sup>[1]</sup>。黄精、多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua 和滇黄精 *P. kingianum* Coll. et Hemsl. 的干燥根茎是黄精药材的来源。按其形状不同将黄精习称为“鸡头黄精”, 多花黄精习称为“姜形黄精”, 滇黄精习称为“大黄精”。黄精始载于《名医别录》, 以黄精为正名, 后世沿用<sup>[2]</sup>。其味甘, 性平, 具有补气养阴、健脾、润肺等功效<sup>[1]</sup>。黄精也具有显著的食用价值, 在民族药中应用也较为广泛<sup>[3]</sup>。黄精中含有丰富的多糖、薯蓣皂苷元、毛地黄苷元, 在临床上可以用于治疗糖尿病、肺病、疲劳、消化不良等病症<sup>[4-6]</sup>。同时, 民间还将长梗黄精 *P. filipes* Merr. ex C. Jeffrey et McEwan、湖北黄精 *P. zanlanscianense* Pamp.、点花黄精 *P. punctatum* Royle ex Kunth 等植物也作为药用<sup>[5]</sup>。辽宁省是我国黄精的重点产区之一, 栽培历史悠久, 规模化种植近40年<sup>[7]</sup>。*psbA-trnH*序列被认为是叶绿体基因间隔区中进化速率较快的片段之一, 可以作为内转录间隔区2 (ITS2) 的互补序列对药用植物进行鉴定, 且该片段的引物具有通用性强、扩增成功率高的特点, 是药用植物鉴定推荐的条形码<sup>[8-9]</sup>。丛悦等<sup>[4]</sup>发现 *rpl20-rps12*、*trnL-trnF*、*psbA-trnH*序列都可以区分正品来源的3种黄精。辽宁省内人工栽培的黄精品种一般是野生资源的驯化品种, 由于驯化效果不太理想, 经常出现黄精、多花黄精、滇黄精品种分类不清等问题, 且驯化品质良莠不齐<sup>[10]</sup>。本研究基于

预实验结果, 采集了辽宁省大部分地区的栽培品种黄精的主要药用部位根茎作为研究对象, 基于 *psbA-trnH*序列对其进行分析, 并将在省外2个地区采集的黄精作为对比, 同时与GenBank上下载的其他种黄精的序列进行聚类, 考察 *psbA-trnH*序列对不同产地黄精的鉴别能力, 为辽宁省黄精药材来源的准确鉴定提供参考。

## 1 材料

### 1.1 样品

通过野外收集及栽培基地走访, 共收集辽宁省12个地区的百合科黄精属植物黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 样品36份; 湖北、贵州省各1份。所有样品经辽宁中医药大学中药资源教研室尹海波教授鉴定, 见表1; 从GenBank上下载其余黄精属药材及外群样品 *psbA-trnH*序列, 见表2。

### 1.2 试剂

DP320新型植物基因组提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司); 2×Es Taq Master Mix、正向引物、反向引物、双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)、琼脂糖、溴化乙锭(上海生工生物工程股份有限公司); Trans 2k DNA Marker (Takara公司); 无水乙醇等试剂(天津科密欧有限公司)。

### 1.3 仪器

TC1000-G型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪、

表1 黄精样品来源信息

编号	产地	资源类型	经度	纬度	海拔/m
H1-1~H1-3	辽宁省丹东市宽甸满族自治县石湖沟乡	栽培	E40°40'39.37"	N124°46'39.94"	249.60
H2-1~H2-3	辽宁省本溪市桓仁满族自治县华来镇	栽培	E41°23'48.14"	N125°1'47.28"	382.12
H3-1~H3-3	辽宁省本溪市桓仁满族自治县华来镇	栽培	E41°23'29.31"	N125°2'11.19"	387.34
H4-1~H4-3	辽宁省铁岭市西丰县营厂满族乡	栽培	E42°34'21.26"	N124°41'52.20"	231.90
H5-1~H5-3	辽宁省鞍山市岫岩满族自治县大营子镇	栽培	E40°16'50.18"	N123°34'57.10"	52.50
H6-1~H6-3	辽宁省鞍山市海城市马风镇朱红村	栽培	E40°47'59.78"	N122°59'16.68"	130.21
H7-1~H7-3	辽宁省阜新市阜新蒙古族自治县务欢池镇	野生	E42°19'21.74"	N121°54'53.13"	180.51
H8-1~H8-3	辽宁省抚顺市清原满族自治县大孤家镇	栽培	E42°21'1.17"	N124°52'22.78"	327.10
H9-1~H9-3	辽宁省铁岭市西丰县营厂满族乡	栽培	E42°34'21.26"	N124°41'52.20"	231.90
H10-1~H10-3	辽宁省本溪市本溪满族自治县观音阁街道	栽培	E41°23'32.39"	N124°4'38.72"	373.24
H11-1~H11-3	辽宁省本溪市本溪满族自治县清河城镇	栽培	E41°27'36.5"	N124°14'27.80"	280.62
H12-1~H12-3	辽宁省锦州市义县七里河镇	栽培	E41°23'4.93"	N121°15'9.85"	60.55
H13	湖北省	栽培			
H14	贵州省千户苗寨	栽培			

表2 GenBank下载的黄精属植物及外群样本  
*psbA-trnH*序列信息

编号	药材	拉丁学名	GenBank号
A	黄精	<i>P. sibiricum</i>	MK855014.1
B	滇黄精	<i>P. kingianum</i>	MK463558.1
C	多花黄精	<i>P. cyrtanema</i>	EU850208.1
D	点花黄精	<i>P. punctatum</i>	KJ745800.1
E	长梗黄精	<i>P. filipes</i>	KX375113.1
F	玉竹	<i>P. odoratum</i>	KJ745868.1
G	猪牙花	<i>Erythronium japonicum</i> Decne.	EU939295.1

D3024R型高速离心机(北京大龙兴创实验仪器股份有限公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Tabnon-4100型凝胶成像处理系统(上海天能科技有限公司);DZKW-S-4型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);XH-C型旋涡混匀器(金坛市城东新瑞仪器厂)。

## 2 方法

### 2.1 总DNA提取

取样品干燥部位,使用75%乙醇擦拭表面,干燥后放入无菌研钵,加入适量液氮研磨成细粉,称取粉末30 mg,使用DP320新型植物基因组提取试剂盒提取各样本的总DNA,具体步骤严格按照试剂盒流程操作。

### 2.2 PCR扩增体系及条件

PCR扩增体系为50  $\mu$ L,包括2 $\times$ Es Taq Master Mix 25  $\mu$ L、正反双向引物各2  $\mu$ L(正向引物为5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3',反向引物为5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC)、DNA模板4  $\mu$ L,加入ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L补充至50  $\mu$ L,充分混匀后备用。

PCR扩增条件:95  $^{\circ}$ C变性3 min,95  $^{\circ}$ C变性15 s,65  $^{\circ}$ C退火15 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s(35个循环),72  $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR扩增产物经纯化后由上海生工生物工程股份有限公司进行双向测序。

### 2.3 数据处理

将测序后的正反向序列使用SeqMan 7.1.0软件进行拼接,除去低质量区及引物区获得目标序列;使用MEGA 11.0软件进行多序列比对,计算K2P遗传距离;采用邻接法(NJ)构建系统聚类进化树;使用Bootstrap进行聚类分析,重复次数为1000次。

## 3 结果

### 3.1 基于*psbA-trnH*序列的黄精鉴定分析

对所采集的辽宁省12个地区及外省2个地区的38个黄精药材样本进行总DNA的提取及PCR扩增,由于5个样品提取的DNA质量较差,最终获得序列的样品数量为33个。琼脂糖凝胶电泳的DNA提取率为87%,33个样本的*psbA-trnH*序列扩增率为100%(图1)。由测序结果可知,各序列的碱基质量值均大于20,通过BLAST比对确定33个样本的碱基序列均为所鉴定物种黄精。

### 3.2 种内种间变异分析

黄精33个样本*psbA-trnH*序列长度约为500 bp,利用MEGA 11.0软件对黄精样品进行比对分析,33份样品中共有5个碱基变异位点,来源于辽宁省的黄精H5-2、H9-1、H9-3各有1个变异位点,H10-3有2个变异位点;来源于湖北和贵州的黄精未发现变异位点。通过与美国国家生物技术信息中心(NCBI)上下载的序列进行比对分析,黄精没有发现变异位点,滇黄精发现16个变异位点,多花黄精有9个变异位点、32个位点缺失,点花黄精有16个变异位点,长梗黄精有8个变异位点,玉竹有4个变异位点、16个位点缺失,见表3。

辽宁省内大多数样品和湖北省、贵州省的黄精药材与NCBI下载的黄精序列种内遗传距离为0。H9-1、H9-3、H10-3与其他样品的种内遗传距离为0.001 897,H5-2与其他样品的种内遗传距离

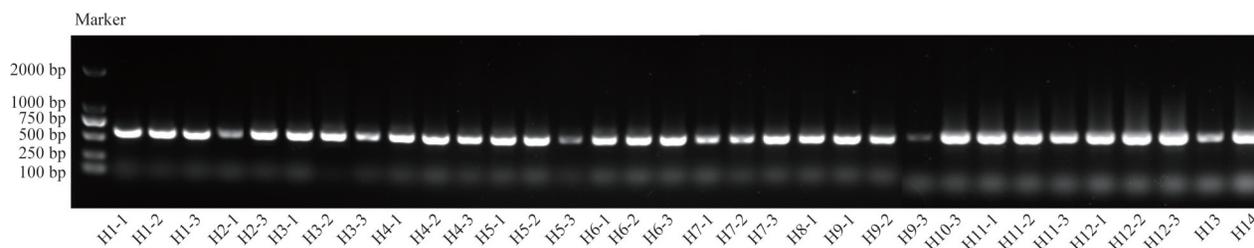


图1 黄精样品PCR扩增

表3 黄精样品 *psbA-trnH* 序列变异位点

编号	1~8	17	19	20	51	87	88	103	105~108	110	222~224	389	613~620	621~632	633~636
H1-1	T-C	G	T	G	G	T	C	G	T-C	T	C-T	A	G-A	A-T	G-A
H5-2	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H9-1	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H9-3	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H10-3	*	*	C	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*
B	*	*	*	*	*	C	T	A	G-A	C	G-A	C	*	*	T-G
C	—	*	*	*	*	*	*	A	G-A	C	G-A	*	—	—	—
D	*	*	*	*	A	C	T	A	G-A	C	G-A	*	*	*	T-G
E	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	G-A	*	*	*	T-G
F	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	G-A	*	*	-	—
其他	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

注：\*表示碱基相同；—表示此碱基位点缺失。

为0.001 896。由于H9-1、H9-3、H10-3、H5-2存在变异位点，导致遗传距离出现了变化。与NCBI上下载的序列相比，辽宁省黄精与滇黄精的种间遗传距离为0.030 932~0.032 909，与多花黄精的种间遗传距离为0.018 371~0.020 442，与点花黄精的种间遗传距离为0.030 933~0.032 913，与长梗黄精的种间遗传距离为0.015 314~0.017 253，与同属玉竹的种间遗传距离为0.007 858~0.009 837，与外群猪牙花的种间遗传距离为0.172 033。由于滇黄精与点花黄精都存在16个变异位点，所以与样品黄精遗传距离更大，玉竹存在4个变异位点，长梗黄精存在8个变异位点，多花黄精有9个变异位点及32个位点缺失，所以遗传距离逐渐变大，与上述结果吻合。相比之下，玉竹与黄精的遗传距离最小，外群猪牙花与其他样品的遗传距离较大（表4）。

### 3.3 NJ系统聚类进化树分析

利用MEGA 11.0软件对所有序列比对后建立

NJ系统聚类进化树（图2），40个样本序列首先分为两大支，外群猪牙花单独聚为一支，其余黄精属植物聚为一大支。可以发现辽宁、湖北、贵州省的黄精与NCBI下载的黄精序列聚在一起，但由于H5-2、H9-1、H9-3、H10-3出现了种内变异，存在变异位点，所以又单独聚为了一个小分支，但亲缘非常接近。在NCBI上下载的其他黄精属植物由于存在变异位点及位点缺失，分成了几个小分支。通过NJ系统聚类进化树可以发现黄精属植物的亲缘关系较近，但不同种之间也可以区分。

## 4 结论与讨论

本研究基于 *psbA-trnH* 序列对辽宁省广泛栽培药材黄精进行鉴定分析，对不同来源百合科黄精属植物黄精、滇黄精、多花黄精、点花黄精、长梗黄精、玉竹和猪牙花属猪牙花进行聚类分析，通过NJ系统聚类进化树可以将所收集的辽宁、湖北、贵州省所产黄精与NCBI下载的黄精序列聚在一起，同时与

表4 基于 *psbA-trnH* 序列各黄精样本的 K2P 遗传距离

编号	M	H9-1、H9-3、H10-3	H5-2	B	C	D	E	F
H9-1、H9-3、H10-3	0.001 897							
H5-2	0.001 896	0.003 797						
B	0.030 932	0.032 908	0.032 909					
C	0.018 371	0.020 437	0.020 442	0.005 293				
D	0.030 933	0.032 913	0.032 908	0.003 329	0.005 300			
E	0.015 314	0.017 244	0.017 253	0.018 498	0.012 404	0.018 502		
F	0.007 858	0.009 831	0.009 837	0.019 010	0.012 404	0.019 014	0	
G	0.172 033	0.172 033	0.172 033	0.166 016	0.176 290	0.159 922	0.169 018	0.175 261

注：M.A、H1-1~H1-3、H2-1~H2-3、H3-1~H3-3、H4-1~H4-3、H5-1、H5-3、H6-1~H6-3、H7-1~H7-3、H8-1、H9-2、H11-1~H11-3、H12-1~H12-3、H13、H14。

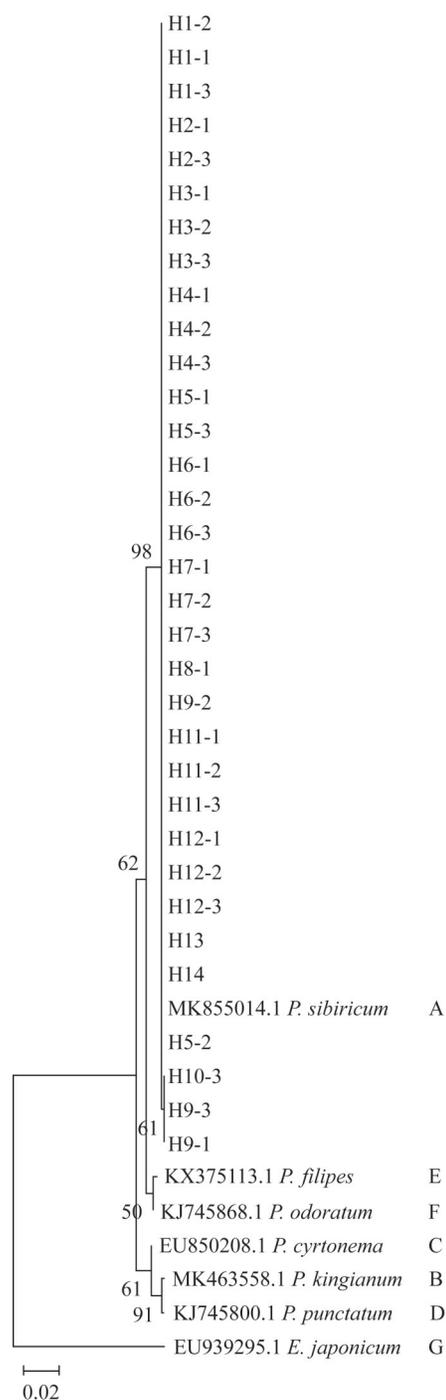


图2 基于黄精 *psbA-trnH* 序列的 NJ 系统聚类进化树

其他黄精属植物及外群猪牙花进行区分, 黄精属植物被聚为一大支, 其中长梗黄精和玉竹与黄精亲缘关系最近, 点花黄精与黄精亲缘关系相对较远。结合变异位点的研究结果分析, 除辽宁省内4个黄精样品发生种内变异外, 其他的黄精样品都与NCBI所下载的黄精样品序列一致, 没有变异位点存在。同时, 黄精属其他物种存在数量不同的变异位点及缺失位点, 长梗黄精与玉竹的变异位点相对较少,

而外群猪牙花存在的变异位点远多于其他黄精属植物的变异位点。结合遗传距离的结果发现, 除发生种内变异的几个样品外, 其他采集的黄精样品与NCBI所下载的黄精序列遗传距离为0, 发生种内变异的样品的遗传距离远小于玉竹、长梗黄精与黄精的种间遗传距离, 可以发现即使发生了种内变异, 但其亲缘关系仍旧很近。点花黄精在黄精属中亲缘关系与黄精最远。分析NJ系统聚类进化树、变异位点及遗传距离, 得到的结果一致, 所以认为本次采集的辽宁、湖北及贵州省所产黄精物种均为黄精 *P. sibiricum*。

本研究收集了38个黄精样品, 由于5个样品提取的DNA质量较差, 最终获得序列的样品数量为33个, 除4个样品存在较小的种内变异外, 其余黄精的碱基序列均完全相同。有研究表明, 在以黄精叶片为植物材料时, ITS、ITS2、*rbcL*、*psbA-trnH* 和 *psbK-psbI* 序列的种内和种间变异重合多且无条形码间隙, 这些序列不适合鉴别黄精属物种之间的差异<sup>[5-6]</sup>。但是由于本研究材料均为黄精的根状茎, 根据预实验的结果 *psbA-trnH* 序列的扩增结果最好, 同时实验结果显示 *psbA-trnH* 序列可以鉴别出种内种间存在的变异位点, 并且通过遗传距离及NJ系统聚类进化树可以将不同种的黄精区分开来, 故认为 *psbA-trnH* 序列可以作为DNA条形码对黄精药材不同来源的基原植物进行区分鉴别且成功率较高。通过本研究发现, 辽宁省种植的黄精种类单一, 以黄精 *P. sibiricum* 为主, 同时也为辽宁省黄精药材来源的鉴定提供了参考。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:86,319.
- [2] 陶弘景. 名医别录[M]. 尚志钧, 辑校. 北京:人民卫生出版社,1986:23.
- [3] 徐宇琳, 王元忠, 杨美权, 等. 黄精的本草考证及民族用法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17):237-250.
- [4] 丛悦, 李莉, 张金霞, 等. 基于叶绿体DNA序列的多基原黄精分子鉴定[J]. 中国现代中药, 2021, 23(12):2072-2076.
- [5] 张明英, 李依民, 程文萍, 等. 基于通用DNA条形码序列的黄精属药用植物分子鉴定[J]. 中草药, 2023, 54(1):235-244.
- [6] 龙炳宏, 蒋向辉, 宋荣, 等. DNA条形码在黄精属药用植物鉴定与遗传多样性分析中的应用[J]. 植物科学学报,

- 2022,40(4):533-543.
- [7] 杨国日. 辽宁省黄精产业现状及发展建议[J]. 辽宁林业科技,2020(2):73-74.
- [8] 陈士林,庞晓慧,姚辉,等. 中药DNA条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2011,13(5):747-754.
- [9] CHEN S, YAO H, HAN J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS ONE,2010,5(1):e8613.
- [10] 孙佳琳,孙文松,王新雅,等. 辽宁黄精的药用价值研究进展及其产业发展的SWOT分析[J]. 园艺与种苗,2022,42(3):14-17.

(收稿日期: 2023-01-19 编辑: 田苗)