

黔产 9 种薯蓣属植物分子鉴别及亲缘关系研究

魏怡冰,魏升华*,王志威,严福林
(贵阳中医学院,贵州 贵阳 550000)

摘要: 为揭示黔产薯蓣属植物 9 个种之间的亲缘关系,根据叶绿体 *matK*、*rbcL*、*psbA-trnH* 序列片段对其进行种间分子鉴别研究。结果表明,黔产薯蓣属植物 9 个种的 *matK*、*psbA-trnH*、*rbcL* 序列长度分别为 1 076~1 144 bp、361~382 bp、1 160~1 209 bp,当空位始终做缺失处理时,其变异位点分别占序列总长度的 14.3%、7.8% 及 8.7%。系统进化分析显示,来自 9 个种 31 份样本的薯蓣属植物分为了 4 个大组。其中,黄独单独为一组,为基生翅组;黑珠芽薯蓣和高山薯蓣聚为一组,为复叶组;光亮薯蓣和毛胶薯蓣聚为一组,为顶生翅组;光叶薯蓣、薯蓣、日本薯蓣以及薯蓣聚为一组,为周生翅组。表明 *matK*、*rbcL*、*psbA-trnH* 序列片段对薯蓣属植物的系统分类具有明显的指导价值。

关键词: 薯蓣属; DNA 条形码; *matK*; *rbcL*; *psbA-trnH*

中图分类号: S567.23⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)11-0108-05

Molecular Identification and Genetic Relationship of 9 *Dioscorea* Species in Guizhou Province

WEI Yibing, WEI Shenghua*, WANG Zhiwei, YAN Fulin
(Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550000, China)

Abstract: In order to reveal the genetic relationship between 9 species of *Dioscorea* in Guizhou province, the molecular identification of the species was conducted using the sequence fragments of chloroplast genes *matK*, *rbcL* and *psbA-trnH*. The results showed that the lengths of *matK*, *psbA-trnH* and *rbcL* in 9 species of *Dioscorea* in Guizhou province were 1 076—1 144 bp, 361—382 bp and 1 160—1 209 bp. When the vacancy was treated as deletion, the ratio of the mutation site in the total length was 14.3%, 7.8% and 8.7%, respectively. Phylogenetic analysis showed that 9 species of *Dioscorea* derived from the 31 provenances were divided into four groups. Among them, *Dioscorea bulbifera* L. belonged to the cluster of Sect. Opsophyton Uline. *Dioscorea melanophyma* Prain et Burkill and *Dioscorea henryi* (Prain et Burkill) C. T. Ting belonged to the cluster of Sect. Lasiophyton Uline. *Dioscorea subcalva* Prain et Burkill and *Dioscorea nitens* Prain et Burkill belonged to the cluster of Sect. Shannicorea Prain et Burkill. *Dioscorea glabra* Roxb., *Dioscorea cirrhosa* Lour., *Dioscorea japonica* Thunb. and *Dioscorea opposita* Thunb. belonged to the cluster of Sect. Enantiophyllum Uline. The results show that *matK*, *rbcL* and *psbA-trnH* have obvious guidance for systematic classification of *Dioscorea*.

Key words: *Dioscorea*; DNA barcode; *matK*; *rbcL*; *psbA-trnH*

薯蓣科植物中,我国仅有薯蓣属 (*Dioscorea*) 属植物共有 25 种以及 1 变种、1 引种^[3],大多可作 1 个属,共 52 种,分为 8 个组^[1-2]。贵州分布的薯蓣 为民族药材入药,主要用于脾虚泄泻、消渴、带下、风

收稿日期:2017-05-08

基金项目:国家中医药管理局项目

作者简介:魏怡冰(1994-),女,河北赵县人,在读硕士研究生,研究方向:中药与民族药品品质鉴定。

E-mail:1530112096@qq.com

* 通讯作者:魏升华(1965-),男,贵州黔西人,教授,主要从事药用植物资源、引种驯化、中药材生产与民族医药开发等教学和科研。E-mail:weishenghua6512@126.com

湿性关节炎、胃痛、跌打损伤、无名肿毒等症。但近年来研究发现,原有的薯蓣属植物分类与分子鉴别试验结果吻合度不高,对药用的准确性造成了一定影响^[4-5]。

分子鉴定方法是指用于动植物进化关系及系统学研究的 DNA 序列、分子标记和指纹图谱等各种分析技术的总称。该方法于 20 世纪 90 年代中期开始用于药用植物的鉴定,例如 Cheung 等^[6]、曹晖等^[7]先后采用 AP-PCR、RAPD 等方法鉴定人参、苦地胆等中药材。近年来,针对传统分子遗传标记技术遇到的瓶颈问题,有学者利用 DNA 条形码的技术优势,将其成功应用于鹿茸、赤芍和威灵仙等中药材及其混伪品的鉴别中^[8-10]。Guo 等^[11]利用 DNA 条形码 *psbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 3 个片段对唇形科药用植物黄芩及其 3 种混伪品进行了鉴别;Sui 等^[12]也利用 DNA 条形码的这 3 个片段对 6 种清风藤属植物和 7 种市场混淆品进行鉴定。而薯蓣属植物药用易

混淆,以常规鉴别方法难以准确区分其种类,因此,为保证薯蓣属植物的用药准确性,选用 *rbcL*、*matK* 及 *psbA-trnH* 序列,对薯蓣属 9 个种 31 份样本进行分子鉴定,分析薯蓣属植物 9 个种之间的亲缘关系,为薯蓣属植物的系统分类研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

野外采集薯蓣属植株活体,引种至贵阳中医学院种质圃,经魏升华副教授鉴定,凭证标本保存于贵阳中医学院生药教研室标本室,其样本具体信息如表 1 所示。共 31 份样本,均为生长状况良好的植株中部健康叶片,去掉主脉后用 70% 乙醇擦去叶面灰尘,用于总 DNA 的提取。

1.2 试剂

Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒、*Taq* PCR Master Mix、4S Green Plus 染料、DNA Marker 等均购

表 1 9 个种 31 份薯蓣属植物来源

编号	种名	采集地	采集日期/ (年-月-日)
GY	光叶薯蓣 (<i>Dioscorea glabra</i> Roxb.)	大方县天生桥	2016-09-18
SL	薯蓣 (<i>Dioscorea cirrhosa</i> Lour.)	贵阳中医学院苗圃	2016-10-11
HZY	黑珠芽薯蓣 (<i>Dioscorea melanophyma</i> Prain et Burkill)	紫云县板当镇	2016-09-25
GS-1	高山薯蓣 [<i>Dioscorea henryi</i> (Prain et Burkill) C. T. Ting]	平坝县高峰山	2016-09-12
GS-2		紫云县板当镇	2016-09-25
GS-3		贵阳市花溪区平桥	2016-09-22
GS-4		贵阳中医学院苗圃	2016-08-30
GL-1	光亮薯蓣 (<i>Dioscorea nitens</i> Prain et Burkill)	平坝县高峰山	2016-09-12
GL-2		平坝县高峰山	2016-09-12
GL-3		平坝县高峰山	2016-09-12
RB-1	日本薯蓣 (<i>Dioscorea japonica</i> Thunb.)	贵阳中医学院苗圃	2016-08-18
RB-2		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25
RB-3		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25
RB-4		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25
MJ-1	毛胶薯蓣 (<i>Dioscorea subcalva</i> Prain et Burkill)	贵阳市花溪区思雅	2016-09-04
MJ-2		紫云县板当镇	2016-09-25
MJ-3		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25
MJ-4		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25
MJ-5		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25
HD-1	黄独 (<i>Dioscorea bulbifera</i> L.)	贵阳中医学院 A3 苗圃	2016-08-29
HD-2		贵阳中医学院 A3 苗圃	2016-08-29
HD-3		贵阳中医学院 A3 苗圃	2016-08-29
HD-4		贵阳中医学院苗圃	2016-10-28
HD-5		紫云县板当镇	2016-09-25
SY-1	薯蓣 (<i>Dioscorea opposita</i> Thunb.)	贵阳中医学院苗圃	2016-08-30
SY-2		贵阳中医学院苗圃	2016-08-30
SY-3		贵阳中医学院苗圃	2016-08-30
SY-4		贵阳市花溪区思雅	2016-09-04
SY-5		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25
SY-6		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25
SY-7		施秉县双井镇龙塘村	2016-09-25

自生工生物工程(上海)股份有限公司,引物(表 2)合成及序列测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 2 试验所用引物

位点	引物	序列(5'-3')	退火温度/℃
<i>matK</i>	MF	ATTTGCGATCTATTCAAT	52
	MR	TGAGATTCGGCAGGTCATT	
<i>rbcL</i>	m3	TATCTTAGCGCCATTCCGAGTA	54
	m4	CGCGGATAATTCATTACCTTC	
<i>psbA-trnH</i>	F1	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	56
	R1	CGCGCATGGTGGATTACAAAATC	

1.3 试验方法

1.3.1 总 DNA 提取 总 DNA 的提取按照生工生物工程(上海)股份有限公司的 Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒操作说明书进行,提取所得基因组 DNA 在 -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增 对 9 种薯蓣属植物共计 31 份样本的 *matK*、*rbcL* 及 *psbA-trnH* 片段分别进行 PCR 扩增,PCR 扩增反应在 ProFlex PCR System 上进行。反应体系为 50 μL,其中包括:2 μL DNA 模板、正向和反向引物各 2 μL、*Taq* PCR Master Mix 24 μL,以 ddH₂O 补齐。PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 4 min;95 ℃ 变性 30 s,适度退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个热循环;72 ℃ 后延伸 2 min。取 2 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,经 4S Green Plus 染色,用凝胶图像分析系统观察并拍照。PCR 产物经电泳检测后,送样至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序引物为 PCR 引物。

1.3.3 数据分析 得到测序结果后,将所有序列用 Muscle 3.6 软件进行排序,然后利用 Gblock 0.91b 软件进行序列保守区的选择并将两端切平。利用 Mega 4.0 对处理好的序列构建 Maximum Parsimony (MP) 树,设置 Close-neighbor-interchange (CNI) 水平为 3,Random Addition trees 为 10。获取 50% 一致性系统进化树(50% Majority rule consensus tree),进行靴带法(Bootstrap analysis)检测,抽样次数为 1 000。根据靴带支持率(BS)评估各分支可靠性。BS ≤ 50 为不支持;BS 介于 51 ~ 75 为低支持,BS 介于 76 ~ 85 为中度支持;BS ≥ 86 为高支持或强烈支持。

2 结果与分析

2.1 *matK*、*rbcL* 及 *psbA-trnH* 片段扩增

测序后所得的各片段长度及碱基含量如表 3 所示,薯蓣属植物 9 个种 31 份样本的 3 条基因片段

matK、*psbA-trnH*、*rbcL* 长度分别为 1 076 ~ 1 144 bp、361 ~ 382 bp、1 160 ~ 1 209 bp。序列经比对,排序后两端切平,31 份材料中 3 条基因片段的序列总长度在 2 628 ~ 2 710 bp,(G + C)含量在 38.24% ~ 39.38%。

表 3 *matK*、*rbcL* 及 *psbA-trnH* 3 条片段扩增结果

编号	<i>matK</i> 长度/bp	<i>psbA-trnH</i> 长度/bp	<i>rbcL</i> 长度/bp	总长度/bp	(G + C)/%
HZY	1 140	363	1 172	2 675	38.47
SL	1 125	369	1 176	2 670	39.18
GY	1 104	364	1 177	2 645	38.71
GS-1	1 124	373	1 177	2 674	39.38
GS-2	1 118	363	1 173	2 654	38.24
GS-3	1 144	370	1 170	2 684	38.49
GS-4	1 120	373	1 178	2 671	38.60
GL-1	1 110	363	1 160	2 633	38.28
GL-2	1 136	373	1 176	2 685	38.73
GL-3	1 141	367	1 177	2 685	38.70
RB-1	1 111	370	1 181	2 662	38.43
RB-2	1 115	361	1 173	2 649	38.51
RB-3	1 128	373	1 209	2 710	38.60
RB-4	1 100	371	1 174	2 645	38.56
SY-1	1 088	372	1 179	2 639	38.65
SY-2	1 097	362	1 169	2 628	38.39
SY-3	1 094	374	1 177	2 645	38.83
SY-4	1 080	373	1 180	2 633	38.85
SY-5	1 080	373	1 183	2 636	38.62
SY-6	1 076	372	1 180	2 628	38.77
SY-7	1 077	363	1 188	2 628	38.47
MJ-1	1 080	372	1 182	2 634	38.65
MJ-2	1 112	374	1 182	2 668	38.64
MJ-3	1 109	373	1 184	2 666	38.75
MJ-4	1 133	373	1 184	2 690	38.51
MJ-5	1 097	363	1 186	2 646	39.08
HD-1	1 115	379	1 181	2 675	38.80
HD-2	1 092	382	1 183	2 657	38.84
HD-3	1 128	369	1 178	2 675	38.84
HD-4	1 103	369	1 183	2 655	38.61
HD-5	1 118	378	1 168	2 664	38.55

2.2 *matK*、*psbA-trnH*、*rbcL* 片段的序列分析

31 份材料的片段扩增中,*matK* 序列排序后两端切平,当空位始终做缺失处理时,序列长 1 032 bp,含变异位点 148 个,占序列总长度的 14.3%;*psbA-trnH* 序列排序后两端切平,当空位始终做缺失处理时,序列长 361 bp,含变异位点 28 个,占序列总长度的 7.8%;*rbcL* 序列排序后两端切平,当空位始终做缺失处理时,序列长 1 103 bp,含变异位点 96 个,占序列总长度的 8.7%。

2.3 基于 *matK*、*psbA-trnH*、*rbcL* 联合片段的系统发育分析

从图 1 可以看出,基于对 *matK*、*psbA-trnH*、*rbcL* 联合片段的 MP 分析,来自 9 个种 31 份样本的

- ogy, 1994, 42(1):67-69.
- [7] 曹晖, 毕培曦. 中药材苦地胆的 DNA 指纹鉴定[J]. 中药材, 1996, 19(12):608-612.
- [8] 张蓉, 刘春生, 黄璐琦, 等. 鹿茸饮片的 DNA 条形码鉴别研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(4):263-266.
- [9] 孙稚颖, 宋经元, 姚辉, 等. 基于 ITS2 条形码的中药材赤芍及其易混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2011, 13(2):407-411.
- [10] 曾旭, 李莉, 业宁, 等. 基于 ITS2 条形码的中药材威灵仙与其易混伪品的鉴定[J]. 环球中医药, 2011, 4(4):264-269.
- [11] Guo X, Wang X, Su W, *et al.* DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(8):1198-1203.
- [12] Sui X Y, Huang Y, Tan Y, *et al.* Molecular authentication of the ethnomedicinal plant *Sabiapar viflora* and its adulterants by DNA barcoding technique[J]. Planta Med, 2011, 77(5):492-496.
- [13] 刘宇婧, 刘越, 黄耀江, 等. 植物 DNA 条形码技术的发展及应用[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(1):74-82.
- [14] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23):8369-8374.
- [15] 李保进. 叶籽银杏 *matK* 和 ITS 序列分析及系统发育研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [16] Wolfe K H, Li W H, Sharp P M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(24):9054-9058.
- [17] 宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展[J]. 生物多样性, 2008, 16(5):417-425.
- [18] 张彬. 当归属药用植物及药材的 DNA 条形码鉴别研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2012.
- ~~~~~
- (上接第 102 页)
- [21] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5):335-336.
- [22] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16):2194-2200.
- [23] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10):996-998.
- [24] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16):5261-5267.
- [25] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7):5069-5072.
- [26] 张志东, 顾美英, 王玮, 等. 基于高通量测序的辐射污染区细菌群落特征分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6):1218-1226.
- [27] 童文君, 张礼, 薛庆云, 等. 不同产地美花石斛内生细菌分离及促生潜力比较[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(1):16-23.
- [28] Petrini O, Fisher P J. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*[J]. Trans Br Mycol Soc, 1988, 91(2):233-238.
- [29] 周小凤. 铁皮石斛内生细菌分布规律的研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2014.
- [30] 卢占慧, 周如军, 袁月, 等. 人参内生拮抗细菌分离、鉴定及其对人参菌核病抑菌作用研究[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(3):5-10.
- [31] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(32):12115-12120.
- [32] 胡楷, 吴庆书. 单细胞生物进化研究的进步[J]. 遗传, 2002, 24(1):104-110.