

## 线粒体 *nad1/b-c* 及 *nad5/d-e* 在秦艽组植物中物种鉴定意义的评价

陆佳妮<sup>1</sup>, 赵志礼<sup>1\*</sup>, 倪梁红<sup>1</sup>, 嘎 务<sup>2</sup>, 米 玛<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 西藏藏医学院, 西藏 拉萨 850000)

**摘要:** 龙胆科龙胆属 *Gentiana* 秦艽组 Sect. *Cruciata* 多种植物作为中药秦艽及藏药解吉 (ཇུམ་ཇི་ཇི་) 的基原, 具有重要的药用价值。在课题组前期品种整理及遗传背景分析基础上, 本文分别测定秦艽组 10 种 23 个居群 69 份样品以及外类群椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* 3 份样品的线粒体 *nad1* 基因第 2 内含子区 (*nad1/b-c*) 以及 *nad5* 基因第 4 内含子区 (*nad5/d-e*) 部分序列, 对其在秦艽组植物的分子系统发育分析及物种鉴定中的意义进行评价。结果显示: *nad1/b-c* 具一粗壮秦艽 *G. robusta* King ex Hook. f. 稳定变异位点; 同时, 对粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 及西藏秦艽 *G. tibetica* King ex Hook. f. 有一定物种分辨率; *nad5/d-e* 序列相似度高, 仅大叶秦艽 *G. macrophylla* Pall.、黄管秦艽 *G. officinalis* H. Smith 及管花秦艽 *G. siphonantha* Maxim. ex Kusnez. 存在种内不同基因型。进而基于粗壮秦艽 *G. robusta* King ex Hook. f. *nad1/b-c* 物种分子标记, 设计一特异鉴定引物, 建立粗壮秦艽特异性引物-PCR 鉴定方法。本工作可为协同进化不完全、遗传背景复杂多样的中藏药高山基原植物 DNA 条形码的构建提供新思路。

**关键词:** 线粒体 DNA; *nad1* 基因; *b-c* 内含子; 龙胆属; 秦艽组; DNA 条形码

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0166-07

## The identification of Sect. *Cruciata* (*Gentiana*) species using mtDNA *nad1/b-c* and *nad5/d-e* fragments

LU Jia-ni<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-li<sup>1\*</sup>, NI Liang-hong<sup>1</sup>, GAAWE Dorje<sup>2</sup>, MI Ma<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Tibetan Traditional Medical College, Lhasa 850000, China)

**Abstract:** *Gentiana* section *Cruciata* (Gentianaceae) is a medicinally important section of herbs, including Chinese traditional medicine *Gentianae Macrophyllae Radix* and Tibetan herb *Jieji*. Here, we assess the taxonomic significance using mtDNA *nad1/b-c* and *nad5/d-e* sequence data. A total of 144 *nad1/b-c* and *nad5/d-e* sequences from 11 species within Gentianaceae were obtained, including 138 sequences from 10 species within *Gentiana* section *Cruciata* and 6 sequences from *Halenia elliptica* (outgroup). The results showed that mtDNA *nad1/b-c* has species-level resolution within the section of *Cruciata*, i.e. the variable in the position 45 “C” could be used as a stable marker locus to distinguish *G. robusta* from other taxa; the variable in the position 352 and 353 “GA” could distinguish *G. crassicaulis* and *G. tibetica* from other taxa within the section. Intraspecies genotype variability was detected in *nad1/b-c* sequences of *G. officinalis* and *G. siphonantha*, respectively. These genotypes could be used as potential DNA barcode. In addition, intraspecies genotype variability was detected in *nad5/d-e* sequences of *G. macrophylla*, *G. officinalis* and *G. siphonantha*, respectively. Based on the stable marker locus, a species-specific PCR protocol was developed using the primer PF to identifying *G. robusta* in the section. This study could expand the understanding of the diversity of mtDNA *nad1/b-c* and *nad5/d-e* in the genus *Gentiana*, and provide the essence for the species

收稿日期: 2018-08-07; 修回日期: 2018-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81503354); 国家自然科学基金项目 (81173654).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322202, E-mail: zhilzhao@sohu.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0716

identification within *Gentiana* section *Cruciata*.

**Key words:** mtDNA; *nad1* gene; intron 2; *Gentiana*; Sect. *Cruciata*; DNA barcoding

龙胆科龙胆属 *Gentiana* 秦艽组 Sect. *Cruciata* 植物具有重要的药用价值, 其中大叶秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.、小秦艽 *G. dahurica* Fisch. 及粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 作为中药秦艽的基原植物, 根入药, 祛风湿, 清湿热, 止痹痛, 退虚热<sup>[1]</sup>。传统藏药解吉 (ཉེན་ལྷོ།), 其来源亦为该组多种植物, 花、根入药, 散风祛湿, 清热利胆<sup>[2,3]</sup>。秦艽组植物主要分布于青藏高原<sup>[4]</sup>, 生存环境严酷多变。这些高山植物对环境胁迫采用了高超的适应策略, 经历了不断发展进化的过程, 具备了丰富多样的形态及基因特征。

课题组前期开展了秦艽组药用植物的分类学鉴定等基础性工作。在野外考察中注意到, 该组植物种下变异幅度较大, 一些居群个体显现种间过渡形态情况; 一些近缘种的鉴定较难把握。确定了藏药解吉基原植物之一的粗壮秦艽 *Gentiana robusta* King ex Hook. f. 为一自然杂交物种, 其母系来源可能是中药秦艽的基原植物之一——麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.<sup>[5]</sup>。同时, 注意到一些物种 ITS 区在基因组内存在明显多样性 (协同进化不完全)。国内学者的研究工作亦显示: 同域分布的近缘种间存在自然杂交现象<sup>[6,7]</sup>。因此, 深入开展该组植物的品种整理工作及其遗传背景分析, 准确把握其种间间断、种内形态变异幅度及遗传标记的多态性等, 进而构建高效的 DNA 条形码, 具有重要的科学意义。

植物 DNA 条形码序列常来自于核基因组及叶绿体基因组, 通常认为线粒体基因较为保守, 在中药 DNA 分子鉴定中的作用有限。事实上, 线粒体基因组在不同类群 (如科、属、种) 间的进化速率是不相同的, 对其系统学意义及其物种鉴定意义的评价应视具体情况而具体分析<sup>[8]</sup>。植物 mtDNA *nad1* 基因由 5 个外显子构成 (*nad1/A-E*), 编码线粒体呼吸传递链复合体 I (NADH-泛醌氧化还原酶) 的 *nad1* 亚基, 是一个结构较为稳定的线粒体基因。其第 2 内含子 (*nad1/b-c*) 序列在植物系统发育研究及中药基原植物物种鉴定中, 显示出应有的价值<sup>[9,10]</sup>; 而 *nad5* 基因编码该复合体的第 5 个亚基。

基于课题组前期工作<sup>[11-14]</sup>, 本文分别测定了 *nad1* 基因外显子 B 和 C 之间的第 2 内含子区 (intron 2) 以及 *nad5* 基因外显子 D 和 E 之间的第 4 内含子区 (intron 4) 部分序列, 对其在秦艽组植物的分子系统发育分析及

物种鉴定中的意义进行初步评价, 以期为致同进化不完全、遗传背景复杂多样的中藏药高山基原植物 DNA 条形码的构建提供新思路。

## 材料与方 法

**材料** 在西藏、云南、甘肃、四川、青海等省区广泛取样, 每个居群平行取 3 株样品。获得龙胆属秦艽组 10 种 23 个居群 69 份标本; 采集龙胆科花锚属植物椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* D. Don 作为外类群 (3 份标本)。压制花果期标本, 同时取新鲜叶片经硅胶快速干燥, 备用。凭证标本经赵志礼教授鉴定, 存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室, 见表 1。

**总 DNA 提取** 取上述硅胶快速干燥的植物叶片, 在液氮中研磨成粉末, 采用改良的 CTAB 法<sup>[15]</sup>提取总 DNA。

**PCR 扩增和测序** 对 11 种 24 个居群所有 72 份样品的线粒体 *nad1/b-c* 及 *nad5/d-e* 片段分别进行扩增, 引物及 PCR 反应条件参考相关文献<sup>[9,16]</sup>。扩增产物经电泳检测后, 送上海生工生物有限公司纯化并测序 (ABI 3730XL 型测序仪)。

**序列数据分析** 测得的序列经 Clustal W 软件对位排列, 并进行手动校正; 去除两端模糊不清的位点 (所有序列均上传至 GenBank)。应用 MEGA 7 软件<sup>[17]</sup>进行遗传距离及系统学等分析。

**特异性引物-PCR 鉴定方法** 在 *nad1/b-c* 序列数据分析基础上, 发现一稳定的粗壮秦艽 *G. robusta* King ex Hook. f. 物种鉴定分子标记, 据此设计特异性上游引物 PF: 5'-GCTTCTTATCTAGAGAGGGGGGAC-3'; 下游引物 *nad1/3*<sup>[9]</sup>: 5'-GGAGCTCGATTAGTTTCTGC-3'。步骤: ① *nad1/b-c* 片段扩增; ② 反应产物电泳, 割胶纯化; ③ 稀释纯化产物作为模板, 特异性引物-PCR 鉴定, 实验条件: 94 °C, 4 min; 35× (94 °C, 45 s; 63.7 °C, 45 s; 72 °C, 2 min); 72 °C, 10 min; ④ 电泳检测。

## 结 果

### 1 序列的获得

共获得 144 条目的片段序列, 包括 72 条 *nad1/b-c* 片段及 72 条 *nad5/d-e* 片段。全部序列上传至 GenBank, 并获得对应的登录号 (表 2)。

### 2 线粒体 *nad1/b-c* 序列分析

获得的 11 种 24 个居群所有 72 份样品的线粒体

Table 1 Samples and voucher specimens

Species	Voucher specimen	Locality	Species	Voucher specimen	Locality
<i>G. crassicaulis</i>	Ni L. H. et al XZ201214-4	Dingqing, Tibet	<i>G. dahurica</i>	Ni L. H. et al GS201304-1	Hezuo, Gansu
	Ni L. H. et al XZ201214-5	Dingqing, Tibet		Ni L. H. et al GS201304-2	Hezuo, Gansu
	Ni L. H. et al XZ201214-6	Dingqing, Tibet		Ni L. H. et al GS201304-3	Hezuo, Gansu
	Ni L. H. et al GS201301-1	Maqu, Gansu	<i>G. robusta</i>	Li Q. F.2010002A	Langkazi, Tibet
	Ni L. H. et al GS201301-2	Maqu, Gansu		Li Q. F.2010002B	Langkazi, Tibet
	Ni L. H. et al GS201301-3	Maqu, Gansu		Li Q. F.2010002C	Langkazi, Tibet
	Ni L. H. YN201301-1	Lijiang, Yunnan		Ni L. H. et al XZ201202-1	Gongbujiangda, Tibet
	Ni L. H. YN201301-2	Lijiang, Yunnan		Ni L. H. et al XZ201202-2	Gongbujiangda, Tibet
Ni L. H. YN201301-3	Lijiang, Yunnan	Ni L. H. et al XZ201202-3	Gongbujiangda, Tibet		
<i>G. lhassica</i>	Ni L. H. et al XZ201303-1	Mt. Mila, Tibet	Ni L. H. et al XZ201209-1	Gongbujiangda, Tibet	
	Ni L. H. et al XZ201303-2	Mt. Mila, Tibet	Ni L. H. et al XZ201209-2	Gongbujiangda, Tibet	
	Ni L. H. et al XZ201303-3	Mt. Mila, Tibet	Ni L. H. et al XZ201209-3	Gongbujiangda, Tibet	
	Ni L. H. et al XZ201304-1	Mt. Mila, Tibet	Ni L. H. et al XZ201211-1	Lhasa, Tibet	
	Ni L. H. et al XZ201304-2	Mt. Mila, Tibet	Ni L. H. et al XZ201211-2	Lhasa, Tibet	
	Ni L. H. et al XZ201304-3	Mt. Mila, Tibet	Ni L. H. et al XZ201211-3	Lhasa, Tibet	
<i>G. macrophylla</i>	Zhao Z. L.2010TS001-1	Tianshui, Gansu	Ni L. H. et al XZ201301-1	Mozhugongka, Tibet	
	Zhao Z. L.2010TS001-2	Tianshui, Gansu	Ni L. H. et al XZ201301-2	Mozhugongka, Tibet	
	Zhao Z. L.2010TS001-3	Tianshui, Gansu	Ni L. H. et al XZ201301-3	Mozhugongka, Tibet	
	Ni L. H. et al XZ201308-1	Linzhi, Tibet	Ni L. H. et al XZ201318-1	Lhasa, Tibet	
	Ni L. H. et al XZ201308-2	Linzhi, Tibet	Ni L. H. et al XZ201318-2	Lhasa, Tibet	
	Ni L. H. et al XZ201308-3	Linzhi, Tibet	Ni L. H. et al XZ201318-3	Lhasa, Tibet	
<i>G. officinalis</i>	Zhao Z. L.2010LZ002-1	Yuzhong, Gansu	<i>G. siphonantha</i>	Ni L. H. et al QH201302-1	Zeku, Qinghai
	Zhao Z. L.2010LZ002-2	Yuzhong, Gansu		Ni L. H. et al QH201302-2	Zeku, Qinghai
	Zhao Z. L.2010LZ002-3	Yuzhong, Gansu		Ni L. H. et al QH201302-3	Zeku, Qinghai
	Garangjia2010SC008-1	Ruoergai, Sichuan	<i>G. straminea</i>	Ni L. H. et al XZ201216-1	Dingqing, Tibet
	Garangjia2010SC008-2	Ruoergai, Sichuan		Ni L. H. et al XZ201216-2	Dingqing, Tibet
	Garangjia2010SC008-3	Ruoergai, Sichuan		Ni L. H. et al XZ201216-7	Dingqing, Tibet
	Ni L. H. et al QH201306-1	Henan, Qinghai	<i>G. tibetica</i>	Ni L. H. et al XZ201306-1	Linzhi, Tibet
	Ni L. H. et al QH201306-2	Henan, Qinghai		Ni L. H. et al XZ201306-2	Linzhi, Tibet
	Ni L. H. et al QH201306-3	Henan, Qinghai		Ni L. H. et al XZ201306-3	Linzhi, Tibet
	Ni L. H. et al QH201307-1	Henan, Qinghai	<i>G. waltonii</i>	Ni L. H. et al XZ201302-1	Mozhugongka, Tibet
	Ni L. H. et al QH201307-2	Henan, Qinghai		Ni L. H. et al XZ201302-2	Mozhugongka, Tibet
	Ni L. H. et al QH201307-3	Henan, Qinghai		Ni L. H. et al XZ201302-3	Mozhugongka, Tibet
	Ni L. H. et al QH201404-1	Maqin, Qinghai	<i>Halenia elliptica</i> (outgroup)	Ni L. H. et al XZ201315-1	Linzhi, Tibet
	Ni L. H. et al QH201404-2	Maqin, Qinghai		Ni L. H. et al XZ201315-2	Linzhi, Tibet
Ni L. H. et al QH201404-3	Maqin, Qinghai	Ni L. H. et al XZ201315-3		Linzhi, Tibet	

*nad1/b-c* 序列, 经对齐、手动校正后, 序列长度: 秦艽组 10 种均为 573 bp, 而外类群椭圆叶花锚长 601 bp (有 4 个插入, 长度分别为: 8 bp、2 bp、13 bp、5 bp)。黄管秦艽 *Gentiana officinalis* H. Smith 及管花秦艽 *G. siphonantha* Maxim. ex Kusnez. 存在种内不同基因型, 即黄管秦艽 383 位点存在“A/T”2 种基因型, 两者比例为 14:1。管花秦艽在 388 位点存在“A/G”2 种基因型, 两者比例为 2:1。除此之外, 其他物种内各样品间序列完全一致。

进一步分析显示: 粗壮秦艽 *G. robusta* King ex Hook. f. 所有 6 个居群 18 个样品的序列在第 45 位点均为“C”, 而秦艽组其余 9 个种均为“T”; 该位点有望作为粗壮秦艽的特异 DNA 分子标记。粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 及西藏秦艽 *G. tibetica* King ex Hook. f. 的第 352 和 353 位点均为“GA”, 而秦艽组其余 8 个种均为“TC”; 该位点与其他片段相组合,

有望作为粗茎秦艽及西藏秦艽的特异 DNA 分子标记; 黄管秦艽 383 位点及管花秦艽 388 位点的种内变异, 可作为相应物种鉴定的候选分子标记 (表 3)。

### 3 线粒体 *nad5/d-e* 序列分析

获得的 11 种 24 个居群所有 72 份样品的线粒体 *nad5/d-e* 序列, 经对齐、手动校正后, 序列长度: 秦艽组 10 种均为 915 bp, 而外类群椭圆叶花锚长 885 bp (有 3 个插入, 长度分别为: 28 bp、6 bp、1 bp; 有 1 个 5 bp 缺失)。就秦艽组 10 种植物而言, 序列相似度高, 仅大叶秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、黄管秦艽 *G. officinalis* H. Smith 及管花秦艽 *G. siphonantha* Maxim. ex Kusnez. 存在种内不同基因型, 即大叶秦艽 229 位点存在“T/G”2 种基因型, 两者比例为 5:1; 黄管秦艽 229 位点存在“T/G”2 种基因型, 两者比例为 1:2; 管花秦艽在 258 位点存在“T/C”2 种基因型, 两者比例为 2:1。除此之外, 其他物种内各样品间及各物种间序列完全一致 (表 3)。

**Table 2** GenBank accession numbers

Species	Voucher specimen	<i>nad1/b-c</i>	<i>nad5/d-e</i>	Species	Voucher specimen	<i>nad1/b-c</i>	<i>nad5/d-e</i>
<i>G. crassicaulis</i>	XZ201214-4	KP795279	KR184732	<i>G. dahurica</i>	GS201304-1	KP795285	KR184738
	XZ201214-5	KP795280	KR184733		GS201304-2	KP795286	KR184739
	XZ201214-6	KP795281	KR184734		GS201304-3	KP795287	KR184740
	GS201301-1	KP795276	KR184729	<i>G. robusta</i>	2010002A	KP795315	KR184768
	GS201301-2	KP795277	KR184730		2010002B	KP795316	KR184769
	GS201301-3	KP795278	KR184731		2010002C	KP795317	KR184770
	YN201301-1	KP795282	KR184735		XZ201202-1	KP795318	KR184771
	YN201301-2	KP795283	KR184736		XZ201202-2	KP795319	KR184772
	YN201301-3	KP795284	KR184737		XZ201202-3	KP795320	KR184773
	<i>G. lhassica</i>	XZ201303-1	KP795288		KR184741	XZ201209-1	KP795321
XZ201303-2		KP795289	KR184742	XZ201209-2	KP795322	KR184775	
XZ201303-3		KP795290	KR184743	XZ201209-3	KP795323	KR184776	
XZ201304-1		KP795291	KR184744	XZ201211-1	KP795324	KR184777	
XZ201304-2		KP795292	KR184745	XZ201211-2	KP795325	KR184778	
XZ201304-3		KP795293	KR184746	XZ201211-3	KP795326	KR184779	
<i>G. macrophylla</i>	2010TS001-1	KP795294	KR184747	XZ201301-1	KP795327	KR184780	
	2010TS001-2	KP795295	KR184748	XZ201301-2	KP795328	KR184781	
	2010TS001-3	KP795296	KR184749	XZ201301-3	KP795329	KR184782	
	XZ201308-1	KP795297	KR184750	XZ201318-1	KP795330	KR184783	
	XZ201308-2	KP795298	KR184751	XZ201318-2	KP795331	KR184784	
	XZ201308-3	KP795299	KR184752	XZ201318-3	KP795332	KR184785	
<i>G. officinalis</i>	2010LZ002-1	KP795300	KR184753	<i>G. siphonantha</i>	QH201302-1	KP795333	KR184786
	2010LZ002-2	KP795301	KR184754		QH201302-2	KP795334	KR184787
	2010LZ002-3	KP795302	KR184755		QH201302-3	KP795335	KR184788
	2010SC008-1	KP795303	KR184756	<i>G. straminea</i>	XZ201216-1	KP795336	KR184789
	2010SC008-2	KP795304	KR184757		XZ201216-2	KP795337	KR184790
	2010SC008-3	KP795305	KR184758		XZ201216-7	KP795338	KR184791
	QH201306-1	KP795306	KR184759	<i>G. tibetica</i>	XZ201306-1	KP795339	KR184792
	QH201306-2	KP795307	KR184760		XZ201306-2	KP795340	KR184793
	QH201306-3	KP795308	KR184761		XZ201306-3	KP795341	KR184794
	QH201307-1	KP795309	KR184762	<i>G. waltonii</i>	XZ201302-1	KP795342	KR184795
	QH201307-2	KP795310	KR184763		XZ201302-2	KP795343	KR184796
	QH201307-3	KP795311	KR184764		XZ201302-3	KP795344	KR184797
	QH201404-1	KP795312	KR184765	<i>Halenia elliptica</i> (outgroup)	XZ201315-1	KP795345	KR184798
	QH201404-2	KP795313	KR184766		XZ201315-2	KP795346	KR184799
	QH201404-3	KP795314	KR184767		XZ201315-3	KP795347	KR184800

**Table 3** Variable sites in *nad1/b-c* and *nad5/d-e* within Sect. *Cruciata*

Species	<i>nad1/b-c</i> (bp)				Species	<i>nad5/d-e</i> (bp)	
	45	352-353	383	388		229	258
<i>G. macrophylla</i>	T	TC	A	A	<i>G. macrophylla</i>	T/G	T
<i>G. robusta</i>	C	TC	A	A	<i>G. robusta</i>	T	T
<i>G. tibetica</i>	T	GA	A	A	<i>G. tibetica</i>	T	T
<i>G. crassicaulis</i>	T	GA	A	A	<i>G. crassicaulis</i>	T	T
<i>G. officinalis</i>	T	TC	A/T	A	<i>G. officinalis</i>	T/G	T
<i>G. lhassica</i>	T	TC	A	A	<i>G. lhassica</i>	T	T
<i>G. siphonantha</i>	T	TC	A	A/G	<i>G. siphonantha</i>	T	T/C
<i>G. dahurica</i>	T	TC	A	A	<i>G. dahurica</i>	T	T
<i>G. straminea</i>	T	TC	A	A	<i>G. straminea</i>	T	T
<i>G. waltonii</i>	T	TC	A	A	<i>G. waltonii</i>	T	T

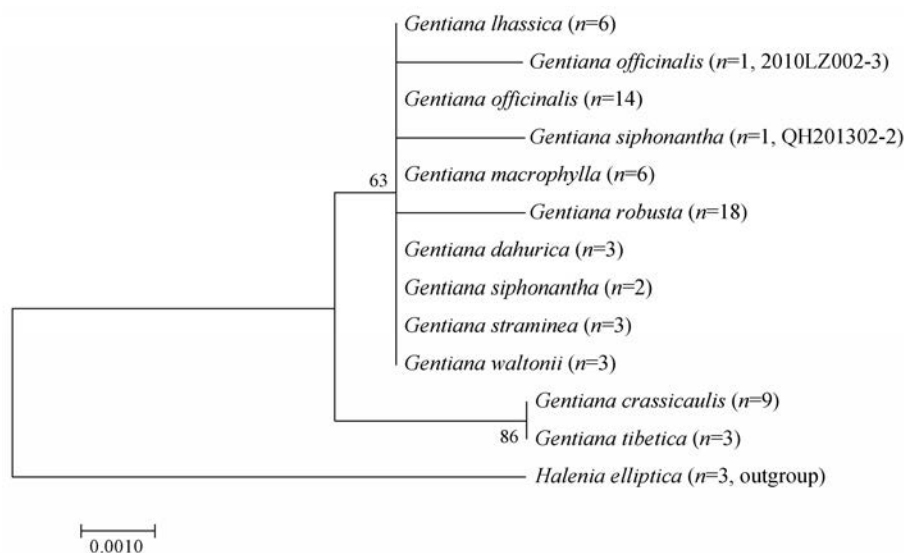
**4 *nad1/b-c* 片段物种鉴定意义的评价**

基于线粒体 *nad1/b-c* 序列, 以椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* D. Don 为外类群, Kimura 2-parameter 模型, 构

建 NJ 系统树, bootstrap 检验, 重复 1 000 次 (MEGA7)。结果显示, 基因树的分子系统学关系与经典分类学观点相一致: 外类群花锚属 *Halenia* 的椭圆叶花锚首先单独区分开; 在龙胆属 *Gentiana* 一大支中, 粗茎秦艽与西藏秦艽共聚为一支, 另一支中, 粗壮秦艽所有 18 个样品聚为次一小支, 而其他物种包括黄管秦艽及管花秦艽的不同基因型的物种分子间断不清晰 (图 1)。

**5 粗壮秦艽特异性引物-PCR 鉴定**

所有 6 个居群 18 个粗壮秦艽样品在 700 bp 处均出现一亮带, 其 9 个近缘种共 35 个样品则不显示条带。此处条带为粗壮秦艽特有, 割胶测序结果亦证实其序列正是特异性上游引物 PF 的目的条带。可依据该处条带的有无鉴定出粗壮秦艽及近缘物种。同时, 该特异性引物-PCR 鉴定图谱中, 1 200 bp 左右亦出现一非特异性条带, 初步推断该片段可能为 *nad1/b-c* 序列。

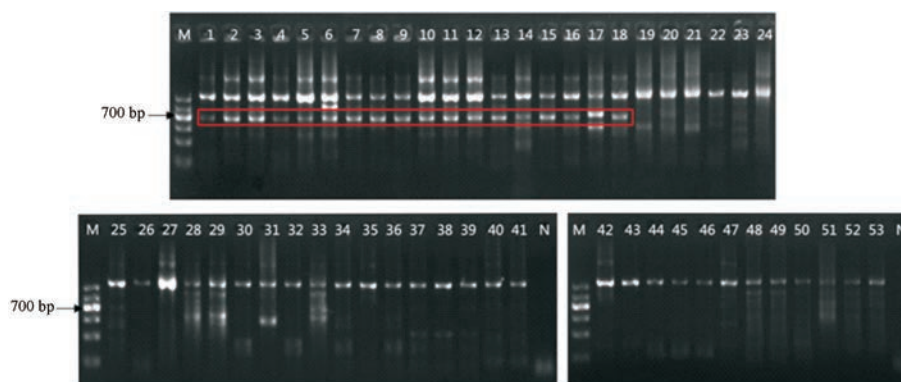


**Figure 1** NJ phylogenetic tree based on mtDNA *nad1/b-c* within Sect. Cruciata. *Halenia elliptica* was set as an outgroup. Numbers above or below the nodes are bootstrap support values

由于在构建粗壮秦艽特异性引物-PCR 鉴定方法时, 注意到直接用样品总 DNA 作为模板, 特异性 PCR 结果不理想。因此, 先用一对通用引物 *nad1/2*、*nad1/3* 进行预扩增, 获得长度约为 1 200 bp 的 *nad1/b-c* 序列。将该产物割胶, 分离纯化。以此为模板, 应用特异性上游引物 PF 及下游通用引物 *nad1/3* 再次进行 PCR 扩增, 最终获得粗壮秦艽特异性引物-PCR 鉴定图谱。第二步 PCR 时, 上游引物 PF 及下游通用引物 *nad1/3* 进行特异性 PCR 反应, 扩增出双链目的片段, 同时, 反应过程中, 下游引物 *nad1/3* 亦可能作为单一引物, 扩增出 *nad1/b-c* 单链产物, 因此出现 1 200 bp 左右的非特异性产物。为进一步验证推断, 将该产物割胶, 分离纯化。测序结果显示, 该片段确为 *nad1/b-c* 序列 (图 2)。

## 讨论

近年来, 核基因组的 ITS 区, 叶绿体基因组 *matK*、*rbcL*、*rpoC1*、*trnL* (UAA) intron、*psbA-trnH*、*atpB-rbcL*、*trnS* (GCU)-*trnG* (UCC)、*rpl20-rps12*、*trnL* (UAA)-*trnF* (GAA) 等片段及其组合越来越多地应用于植物的系统发育重建研究、中药基原植物遗传多样性分析及品种鉴定中<sup>[12,14,18,19]</sup>; 一些药用植物如人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 等全基因组序列的测定, 为更加广泛筛选 DNA 分子标记, 探讨活性物质的生物合成途径等提供基础资料<sup>[20]</sup>。一般认为, 被子植物中线粒体基因的进化速率要比核基因慢 5 倍, 与哺乳动物线粒体基因比核基因进化至少快 5 倍形成巨大的反差<sup>[9]</sup>。就植物线粒体基因组片段而言, 尽管一些研究表明, 其中有些片段含有一定的系统发育信息, 而且较为稳定, 但相关研



**Figure 2** PCR profile of different Sect. Cruciata species amplified using developed primer PF. Bands (c. 700 bp) in the box show the species-specific band amplified only in *G. robusta*. Lane M: GM333 DNA ladder. 1–18: *G. robusta*; 19–22: *G. lhasica*; 23–29: *G. officinalis*; 30–33: *G. macrophylla*; 34–36: *G. dahurica*; 37–39: *G. straminea*; 40–44: *G. crassicaulis*; 45–47: *G. siphonantha*; 48–50: *G. tibetica*; 51–53: *G. waltonii*. N: Negative control

究报道仍然有限。目前,《中国药典》已收载基于动物线粒体基因组片段的药材蕲蛇及乌梢蛇等 DNA 鉴定方法<sup>[1]</sup>,但植物来源中药材的 DNA 鉴定方法,需要更深入的基础研究工作。

本文在野外考察基础上,采集龙胆科龙胆属 *Gentiana* 秦艽组 Sect. *Cruciata* 10 种 23 个居群 69 份样品以及外类群椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* 3 份样品,分别测定线粒体 *nad1* 基因第 2 内含子区 (*nad1/b-c*) 以及 *nad5* 基因第 4 内含子区 (*nad5/d-e*) 部分序列。结果显示,基于线粒体 *nad1/b-c* 序列构建的基因树,其“属”一级的分子系统学关系与经典分类学观点相一致:同时,对粗壮秦艽 *G. robusta* King ex Hook. f. 具有物种分辨率;对粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 及西藏秦艽 *G. tibetica* King ex Hook. f. 具有“类群”分辨率。而 *nad5/d-e* 分子系统学意义有限,检测到的大叶秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、黄管秦艽 *G. officinalis* H. Smith 及管花秦艽 *G. siphonantha* Maxim. ex Kusnez. 存在的种内不同基因型,有望作为相关物种的潜在分子标记。

粗壮秦艽作为一自然杂交物种,协同进化 (concerted evolution) 不完全,遗传背景复杂,应用核基因组及叶绿体基因组片段构建 DNA 条形码有其局限性。而本文检测到的一 *nad1/b-c* 物种分子标记,具有稳定性强等特点,显示植物线粒体基因组片段可能携带特有的分子系统学信息。另外,*nad1/b-c* 中的一分子标记,可将粗茎秦艽及西藏秦艽与同组的其他 8 种植物区别开,该片段可作为粗茎秦艽及西藏秦艽物种 DNA 条形码候选序列之一。

基于发现的粗壮秦艽 *G. robusta* King ex Hook. f. *nad1/b-c* 物种分子标记,设计一特异鉴定引物 PF,优化 PCR 反应条件,建立粗壮秦艽特异性引物-PCR 鉴定方法。该反应退火温度 63.7 °C,所有 6 个居群 18 个粗壮秦艽样品在 700 bp 处均出现一特异条带,而 9 个近缘种共 35 个样品均不显示此条带。至于 1 200 bp 左右均出现的一非特异性条带,经测序分析,该片段为 *nad1/b-c* 序列。由于与目的片段长度差距较大,两条带彼此有明显隔离,不影响实际鉴定结果的判断。为进一步考察该方法的稳定性与专属性,2014~2015 年在西藏墨竹工卡县日多乡、西藏拉萨夺底沟及西藏山南错那县县城附近另采集粗壮秦艽 3 居群,9 份样品,同时采集全萼秦艽 2 居群 6 份样品,长梗秦艽 2 居群 6 份样品,如法 PCR 扩增,电泳检测。结果显示,仅粗壮秦艽 3 居群 9 份样品在 700 bp 处均出现一特异条带。本文建立的粗壮秦艽特异引物鉴定方法可为相关药材的鉴定提供基础资料。

相较于核基因和叶绿体基因而言,虽然线粒体基因在植物的系统发育重建研究、中药基原植物遗传多样性分析及品种鉴定中少有应用;但只要筛选合适的序列片段,线粒体基因仍能提供新的证据<sup>[9,21]</sup>。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 78-79, 270-271, 372-373.
- [2] Zhao ZL, Gaawe D, Wang ZT. Identification of medicinal plants used as Tibetan Traditional Medicine Jie-Ji [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132: 122-126.
- [3] Yang YC. Tibetan Medicine (藏药志) [M]. Xining: Qinghai People Press, 1991: 9-12
- [4] Ho TN. Flora Reipublicae Popularis Sinicae vol. 62 (中国植物志, 62 卷) [M]. Beijing: Science Press, 1988: 59-75.
- [5] Xiong B, Zhao ZL, Ni LH, et al. DNA-based identification of *Gentiana robusta* and related species [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 4680-4685.
- [6] Li XJ, Wang LY, Yang HL, et al. Confirmation of natural hybrids between *Gentiana straminea* and *G. siphonantha* (Gentianaceae) based on molecular evidence [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 2007, 29: 91-97.
- [7] Hu QJ, Peng HC, Bi H, et al. Genetic homogenization of the nuclear ITS loci across two morphologically distinct gentians in their overlapping distributions in the Qinghai-Tibet Plateau [J]. Sci Rep, 2016, 6: 34244.
- [8] Lu JN, Zhao ZL, Ni LH, et al. Identification of medicinal plants based on mitochondrial DNA sequences [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 1791-1796.
- [9] Guo YL, Ge S. The utility of mitochondrial *nad 1* intron in phylogenetic study of Oryzae with reference to the systematic position of *Porteresia* [J]. Acta Phytotax Sin (植物分类学报), 2004, 42: 333-344.
- [10] Zhang T, Wang ZT, Xu LS, et al. Application of mitochondrial *nad 1* intron 2 sequences to molecular identification of some species of *Dendrobium* Sw. [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36: 1059-1062.
- [11] Ni LH, Zhao ZL. A morphometric comparison of three closely related species of *Gentiana* (Gentianaceae), endemic to the region of the Qinghai-Tibet Plateau [J]. Botany, 2018, 96: 209-215.
- [12] Ni LH, Zhao ZL, Xu HX, et al. Chloroplast genome structures in *Gentiana* (Gentianaceae), based on three medicinal alpine plants used in Tibetan herbal medicine [J]. Curr Genet, 2017, 63: 241-252.
- [13] Ni LH, Zhao ZL, Xu HX, et al. The complete chloroplast genome of *Gentiana straminea* (Gentianaceae), an endemic species to the Sino-Himalayan subregion [J]. Gene, 2016, 577:

- 281-288.
- [14] Ni LH, Zhao ZL, Xiong B, et al. A strategy for identifying six species of Sect. *Cruciata* (*Gentiana*) in Gansu using DNA barcode sequences [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2016, 51: 821-827.
- [15] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [16] Duminil J, Pemonge MH, Petit RJ. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA [J]. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2: 428-430.
- [17] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33:1870-1874.
- [18] Wei SJ, Zhao ZL, Ni LH, et al. Taxonomic identification of Tibetan herb Bawo Sebo and its chloroplast genome structure [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 1009-1015.
- [19] Yao H, Yang P, Zhou H, et al. Identification of medicinal plant *Dendrobium* based on the chloroplast *psbK-psbI* intergenic spacer [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2015, 50: 783-787.
- [20] Xu J, Chu Y, Liao BS, et al. *Panax ginseng* genome examination for ginsenoside biosynthesis [J]. *GigaScience*, 2017, 6: 1-15.
- [21] Geng LX, Zheng R, Ren J, et al. Application of new type combined fragments: nrDNA ITS+*nad* 1-intron 2 for identification of *Dendrobium* species of Fengdous [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2015, 50: 1060-1067.