

陕西关中野生商陆资源的ITS2和 $psbA-trnH$ 条形码序列研究

吕瑞华¹, 冯 昭¹, 马添翼¹, 吕蕊花¹, 张明英², 彭 亮², 高 静², 张 岗^{2*}

(1. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 为探讨DNA条形码在陕西关中野生商陆资源中的鉴定作用, 本研究采用通用引物ITS2和 $psbA-trnH$ 对29份商陆样品DNA进行PCR扩增和测序, 用Codon CodeA-aligner V3.0进行序列拼接和校对, 随后进行BLAST比对鉴定分析; 同时运用MEGA 6.0分析序列特征、K2P遗传距离及种内或种间变异, 并构建系统进化树, 评价两对引物对该区域商陆及其混伪品的鉴别能力。研究结果表明, ITS2和 $psbA-trnH$ 序列的PCR扩增和测序成功率均为100%; NJ系统进化树显示ITS2和 $psbA-trnH$ 序列均可明显将所有样本分别聚为商陆、垂序商陆并与其同属近源种鄂西商陆、日本商陆及两种混伪品各自聚为不同分支; ITS2序列在种间遗传距离上较 $psbA-trnH$ 有一定优势。ITS2和 $psbA-trnH$ 序列均可作为DNA条形码对商陆及其混伪品进行识别和鉴定, 为商陆资源品种现状与分布研究及合理开发利用提供理论依据。

关键词: 商陆; DNA条形码; ITS2; $psbA-trnH$; 分子鉴定

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)08-1951-06

Use of ITS2 and $psbA-trnH$ DNA barcode sequences of wild *Phytolacca* resources in Guanzhong area of Shaanxi Province

LÜ Rui-hua¹, FENG Zhao¹, MA Tian-yi¹, LÜ Rui-hua¹, ZHANG Ming-ying², PENG Liang², GAO Jing², ZHANG Gang^{2*}

(1. College of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. College of Pharmacy and Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

Abstract: In order to explore the use of DNA barcode in the identification of wild *Phytolacca* resources in the Shaanxi Guanzhong area, 29 DNA samples were amplified and sequenced by using the universal primers ITS2 and $psbA-trnH$. The sequences were spliced and proof-read by Codon CodeA aligner V3.0, followed by blast comparison and identification analysis; mega 6.0 was used to analyze sequence characteristics, Kimura 2-Parameter (K2P) was used to analyze distance and intraspecific or interspecific variation, and Neighbor-Joining trees were established to evaluate the ability of two pairs of candidate sequences to distinguish *Phytolacca* Radix from its adulterants. The results showed that the success rate of PCR amplification and sequencing of ITS2 and $psbA-trnH$ was 100%; the NJ tree showed that both ITS2 and $psbA-trnH$ sequences could separate *P. acinosa*, *P. americana*, other species of the same genus like *P. japonica*, *P. exiensis* and two adulterant species into a single clade; primer ITS2 had an advantage over $psbA-trnH$ in determining interspecific genetic distances. Therefore, both ITS2 and $psbA-trnH$

收稿日期: 2020-03-10; 修回日期: 2020-04-02.

基金项目: 陕西中医药大学科研培育项目 (2017PY32); 陕西中医药大学“秦药”品质评价及资源开发学科创新团队项目 (2019-QN01); 陕西中医药大学“思邈青年学者”项目 (141306200105); 2018年公共卫生服务补助奖金专项“全国中药资源普查项目”(财社[2018]43号); 陕西省高校青年杰出人才支持计划项目; 咸阳市中青年科技领军人才项目。

*通讯作者 Tel / Fax: 86-29-38185165, E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0278

sequences can be used for identification of *Phytolacca* and their adulterants, which provides a theoretical basis for the distribution of wild *Phytolacca* resources and their rational development and utilization.

Key words: *Phytolacca acinosa* Roxb.; DNA barcode; ITS2; *psbA-trnH*; molecular identification

中药商陆为商陆科商陆属商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb. 和垂序商陆 *P. americana* L. 的干燥根, 逐水消肿、通利二便、解毒散结^[1], 药用历史悠久。商陆属共 35 个种, 我国有包括《中国药典》的两种及日本商陆 *P. japonica* Makino 和多雄蕊商陆 *P. polyandra* Batalin 等 4 种, 广泛分布于除东北、内蒙古、青海、新疆及高海拔等地区外的其他地域^[2]。垂序商陆, 又名美洲商陆, 原产北美洲, 1935 年于杭州地区首次被发现^[3], 因其全株有毒且极具入侵竞争性, 已于 2016 年 12 月被我国列入中国自然生态系统外来入侵物种名单 (第四批)。2017 年 Xie 等^[4]报道湖北西部一新种, 命名为鄂西商陆 *P. exiensis* sp. nov.。由于植物在长期的自然选择如天然杂交、基因突变或人工选择如物种入侵、良种选育等过程中, 都可能导致遗传变异的累积和遗传多样性的丰富, 这也是物种不断进化的根本原因^[5]。而我国商陆野生资源近源物种偏少, 理清野生商陆资源品种现状、分布并阐明遗传多样性成为保护该资源的有效途径。

DNA 条形码技术是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来进行物种的分子鉴定^[6], 被《中国药典》2015 年版作为中药材分子鉴定法所收录, 补充了传统鉴别方法的不足。*rbcL*、*matK*、*psbA-trnH* 和 ITS/ITS2 是常用的植物 DNA 条形码, 2009 年国际条形码协会提出将 *matK* 和 *rbcL* 组合作为植物通用条形码序列^[7], 但该组合针对属内物种水平的分辨率较低。2011 年我国科学家对来自 42 个目 75 个科 141 个属 1757 个物种的 6286 个个体的 *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH* 和 ITS 序列进行研究, 发现 ITS2 和 *psbA-trnH* 在属和种水平的鉴定效率分别达到 99.8%、92.7% 和 95.4%、67.6%, 高于 *rbcL* 和 *matK*^[6,8]。ITS2 为核心、*psbA-trnH* 为补充的植物类药材 DNA 条形码鉴定体系得以建立^[9], 并且已在石斛、黄芪、银柴胡等中药材及其混伪品的鉴定中成功应用^[10-12]。

目前, 国内外对商陆的研究主要集中在化学成分、药理作用及工农业领域的应用等方面^[13,14]。课题组前期对商陆产地的本草考证揭示陕西关中地区的咸阳、凤翔府自古即为商陆的产地^[15,16]。本研究基于 DNA 条形码分子鉴定技术, 利用通用引物 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列对陕西关中地区野生商陆的 29 个样本进行鉴定分析, 结合 GenBank 数据库中的近源物种及混伪品序列构建系统进化树, 探讨两种 DNA 条形码在商陆中的

鉴定作用, 为商陆资源品种现状与分布研究及其合理开发利用提供科学依据。

材料与amp;方法

样品 本研究样本于 2019 年 8~9 月间在陕西关中地区采集, 分别来自西安、宝鸡、咸阳、渭南、杨凌四市一区。所有样品经西北农林科技大学生命科学院植物学教研室刘虎岐副教授鉴定为商陆科商陆属植物 *Phytolacca* L.。取其新鲜幼嫩叶片, 保存于陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心-80 °C 冰箱, 并根据其地理位置差异最终筛选出 29 份样品用于本研究, 见表 1。

仪器与试剂 高速微量冷冻离心机 (D3024R, 北京大龙); Mini 离心机 (LX-800, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司); PCR 仪 (JY-96G, 北京君意); 电泳仪 (JY600E, 北京君意); 涡旋混合器 (VORTEX KB-3, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 凝胶成像系统 (WSE-6100, ATTO); 超微量紫外可见分光光度计 (DS-11, 美国 DeNovix); 组织细胞破碎仪 (TP-24, 杰灵仪器制造天津有限公司)。

植物基因组提取试剂盒 (CW0531S, 北京康为世纪生物科技有限公司); PrimeSTAR® Max DNA 聚合酶 (TaKaRa); 琼脂糖 (Biowest Agarose, 西班牙); 核酸 Marker 和核酸染料购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; ITS2 和 *psbA-trnH* 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

DNA 提取和检测 基因组 DNA 的提取使用冷冻保存的叶片 100 mg 左右, 加入液氮充分研磨后, 严格按照植物基因组提取试剂盒操作步骤完成。DNA 纯度和浓度使用琼脂糖凝胶电泳法及超微量紫外可见分光光度计检测。

PCR 扩增及测序 本研究选用 DNA 条形码国际通用序列 ITS2 和 *psbA-trnH*。两对引物序列见表 2。PCR 反应体系为 50 μL, 包含 PrimeSTAR Max Premix (2×) 25 μL, DNA 模板 2 μL, 正反向引物各 2 μL, ddH₂O 19 μL。ITS2 和 *psbA-trnH* 序列的 PCR 扩增程序为 95 °C 预变性 5 min; 98 °C 模板变形 5 s, 58 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 s, 共计 32 个循环后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托上海生工公司进行双向测序。

数据处理 采用 Codon CodeA-ligner V3.0 对测序

Table 1 Source information and GenBank accession No. of wild *Phytolacca* L. samples

Specimen No.	Collection location	Longitude	Latitude	Altitude	GenBank accession No.	
					ITS2	<i>psbA-trnH</i>
1	Yabai Town, Zhouzhi County, Xi'an City	108.0419° E	34.0953° N	460 m	MT118138	MT130936
2	Tamiao Village, Zhuyu Town, Zhouzhi County, Xi'an City	108.0003° E	34.1116° N	700 m	MT118139	MT130937
7	Xizhai Village, Hengqu Town, Mei County, Baoji City	107.5935° E	34.0712° N	660 m	MT118140	MT130938
8	Chaoyang Village, Fengming Town, Qinshan County, Baoji City	107.6043° E	34.4475° N	672 m	MT118141	MT130939
9	Chaoyang Village, Fengming Town, Qishan County, Baoji City	107.6055° E	34.4477° N	675 m	MT118142	MT130940
10	Yanhe Village, Fengming Town, Qishan County, Baoji City	107.6002° E	34.4500° N	681 m	MT118143	MT130941
11	Banpopu Village, Liulin Town, Fengxiang County, Baoji City	107.2421° E	34.5716° N	957 m	MT118144	MT130942
13	Shangdengjia Village, Shuigou Town, Qianyang County, Baoji City	107.0460° E	34.7315° N	762 m	MT118145	MT130943
14	Zhaojiapo Village, Chengguan Town, Long County, Baoji City	106.8443° E	34.9039° N	917 m	MT118146	MT130944
16	Shiqiao Village, Jinhe Town, Jintai District, Baoji City	107.1422° E	34.4237° N	650 m	MT118147	MT130945
17	Yimenbu Village, Shennong Town, Weibin District, Baoji City	107.0547° E	34.1937° N	640 m	MT118148	MT130946
18	Cuixigou Village, Yangling District, Xianyang City	108.0753° E	34.3027° N	519 m	MT118149	MT130947
20	Yangling Vocational & Technical College	108.0649° E	34.2764° N	466 m	MT118150	MT130948
22	Tugou Village, Chengguan Town, Bin County, Xianyang City	107.9780° E	35.0674° N	846 m	MT118151	MT130949
23	Chengdong Village, Zhaoren Town, Changwu County, Xianyang City	107.8006° E	35.1981° N	1 181 m	MT118152	MT130950
24	Yufeng Village, Yongping Town, Yongshou County, Xianyang City	108.0437° E	34.8057° N	1 265 m	MT118153	MT130951
25	Hanjiabu Village, Qian County, Xianyang City	108.2284° E	34.5565° N	746 m	MT118154	MT130952
26	Yongfeng Village, Yongle Town, Jingyang County, Xianyang City	108.9372° E	34.5214° N	391 m	MT118155	MT130953
27	Sanglou Village, Xing Town, Pucheng County, Weinan City	109.4167° E	34.9136° N	456 m	MT118156	MT130954
28	Leizhuang Village, Chengguan Town, Chengcheng County, Weinan City	109.9353° E	35.1260° N	649 m	MT118157	MT130955
29	Nancai Village, Wangcun Town, Heyang County, Weinan City	110.0859° E	35.1956° N	707 m	MT118158	MT130956
31	Wengyukou Village, Huashan Town, Huayin County, Weinan City	110.0217° E	34.5240° N	420 m	MT118159	MT130957
32	Zhenjiang Village, Chishui Town, Hua County, Weinan City	109.6432° E	34.4925° N	352 m	MT118160	MT130958
33	Yaozhu Village, Yushan Town, Lantian County, Xi'an City	109.5162° E	34.2433° N	864 m	MT118161	MT130959
34	Yangzhuang Village, Yangzhuang Town, Chang'an District, Xi'an City	109.1449° E	34.0420° N	622 m	MT118162	MT130960
35	Taipingzhuang Village, Yuchan Town, Huyi District, Xi'an City	108.5576° E	34.1277° N	410 m	MT118163	MT130961
36	Taipingzhuang Village, Yuchan Town, Huyi District, Xi'an City	108.5576° E	34.1277° N	410 m	MT118164	MT130962
37	417 hospital, Lintong District, Xi'an City	109.1949° E	34.3645° N	477 m	MT118165	MT130963
38	Shaanxi University of Chinese Medicine, Qindu District, Xianyang City	108.7359° E	34.3175° N	381 m	MT118166	MT130964

Table 2 ITS2 and *psbA-trnH* primers' sequences

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')
ITS2	ITS2-F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT
	ITS2-R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA</i> -F	GTTATGCATGAACGTAAT GCTC
	<i>trnH</i> -R	CGCGCATGGTGGATTCAACATCC

峰图进行校正, 去除低质量序列及引物区。随后使用基于隐马尔可夫模型 (HMMER) 的注释方法将所有序列及所需的 GenBank 序列去除两端的 5.8S 和 28S 区段, 进而获得 ITS2 间隔区序列, 根据 GenBank 数据库中同科属物种 *psbA-trnH* 的注释, 去除序列两端的 *psbA* 和 *trnH* 基因, 获得完整的 *psbA-trnH* 基因间隔区序列。将获得序列分别在中药材 DNA 条形码鉴定系统 (<http://www.tcmbarcodes.cn>) 和 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行样品序列的 BLAST 比对分析。

使用 MEGA 6.0 对序列特征进行比对分析, 通过

不同的碱基组成确定其种内及种间关系, 用 Kimura 2-Parameter (K2P) 法将所有数据计算遗传距离, 推断样品间的亲缘关系, 并构建 Neighbor-joining 系统进化树, 各个分支的支持率使用 bootstrap 重复 1 000 次进行检验。

结果与分析

1 DNA 扩增及测序

29 份样品均来自商陆的新鲜幼嫩叶片, DNA 提取浓度为 33.85~223.67 ng·μL⁻¹。由图 1 可见, 两对 DNA 条形码候选序列 ITS2 和 *psbA-trnH* 的 PCR 产物条带清晰、单一, 表明特异性强、纯度高, 可直接用于双向测序, 且其 DNA 扩增和测序成功率均为 100.00% (表 3)。

2 NCBI 数据库和中药材 DNA 条形码鉴定系统比对分析

去除两端的 5.8S 和 28S 区段后, 获得的 ITS2 序列长度在 225~226 bp, GC 含量为 58.85%~60.89%; 去

Table 3 Sequence characteristics of ITS2 and *psbA-trnH*

Gene	Conserved site	Variation site	Parsimony informative site	Singleton site	K2P genetic distance		PCR amplification success rate	Sequencing success rate	Mutation rate
					Intraspecific	Interspecific			
ITS2	216	10	10	0	0	0.046	100.00%	100.00%	4.40%
<i>psbA-trnH</i>	508	12	12	0	0	0.027	100.00%	100.00%	2.30%

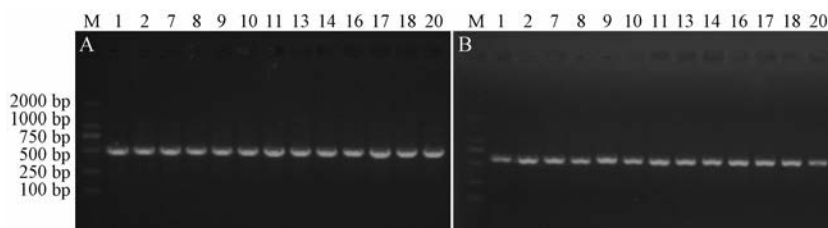


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of ITS2 (A) and *psbA-trnH* (B) PCR products of several samples

Table 4 BLAST analyses of ITS2 and *psbA-trnH* sequences against NCBI and TCM-barcode database

Gene	Specimen No.	Length	G+C content	NCBI			TCM-barcode		
				Identification result	Sequence similarity	Accession No.	Identification result	Sequence similarity	Accession No.
ITS2	1, 9, 10, 13, 16, 17, 18, 20, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 36, 37, 38	225 bp	60.89%	<i>P. americana</i>	100.00%	MH813183	<i>P. americana</i>	100.00%	YZY029-2
	2, 7, 8, 11, 14, 23, 24, 33, 34, 35	226 bp	58.85%	<i>P. acinosa</i>	100.00%	MH711096	<i>P. acinosa</i>	100.00%	SL02
<i>psbA-trnH</i>	1, 9, 10, 13, 16, 17, 18, 20, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 36, 37, 38	462 bp	24.68%	<i>P. americana</i>	100.00%	MH286315	<i>P. americana</i>	100.00%	S1841
	2, 7, 14, 23, 24, 33, 34, 35	490 bp	23.47%	<i>P. acinosa</i>	100.00%	MG595711	<i>P. acinosa</i>	99.40%	HAP00220
	8, 11	477 bp	23.27%	<i>P. exiensis</i>	96.65%	MG595709	<i>P. acinosa</i>	100.00%	SL01

除两端的 *psbA* 和 *trnH* 基因后, 获得的 *psbA-trnH* 序列长度在 462~490 bp, GC 含量为 23.27%~24.68% (表 4)。

将序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对: ITS2 序列分析结果中, 所有样品分为商陆 *P. acinosa* 和垂序商陆 *P. americana*; 而对 *psbA-trnH* 序列的 BLAST 结果中, 样品分 *P. acinosa*、*P. americana* 和 *P. exiensis* (8 号和 11 号); 同时利用中药材 DNA 条形码鉴定系统 (<http://www.tcmbarcode.cn>) 进行 BLAST 比对发现, ITS2 和 *psbA-trnH* 的比对结果一致, 都将样品分为 2 个种, *P. acinosa* 和 *P. americana* (表 4)。

将鉴定为 *P. exiensis* 的样本 8、11 与 *P. acinosa* 进行 *psbA-trnH* 序列比对分析, 以样本 8 (MT130939) 与样本 2 (MT130937, *P. acinosa*) 为例, 图 2 结果表明两个样本的 *psbA-trnH* 相似度为 87.75%, 存在不同位点碱基的转换、颠换、缺失等变异, 说明商陆和鄂西商陆的该序列有一定的保守性。

3 序列特征及遗传距离分析

对 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列的保守位点、变异率等特征参数汇总 (表 3)。K2P 遗传距离计算显示, *psbA-*

trnH 序列种间遗传距离为 0.027, 小于 ITS2 序列的种间遗传距离 0.046; *psbA-trnH* 序列的变异率为 2.30%, 小于 ITS2 序列的 4.40%, 说明 *psbA-trnH* 较 ITS2 序列保守, 两种候选序列种内遗传距离均为 0, 小于种间遗传距离, 存在明显的 barcoding gap。

4 系统进化树构建分析

采用 MEGA 6.0 对 29 个样品的序列与 NCBI 下载的同属不同种及两种常用混伪品的 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列 (表 5) 分别建立系统进化树。从图 3 可以看出, ITS2 和 *psbA-trnH* 序列均将所有样本明显聚成商陆 *P. acinosa*、垂序商陆 *P. americana*、鄂西商陆 (MG595708) 与日本商陆 (MG595704) 及两个混伪品等分支, 鄂西商陆、日本商陆所在分支与商陆亲缘关系较近。

讨论

传统的中药材鉴定方法主要包括基原、性状、显微、理化鉴定等, 这些方法与生物体的表现型有关, 易受环境等外部因素及鉴定人员的专业性和经验等影响。与 RFLP、RAPD 等其他分子标记技术相比, DNA

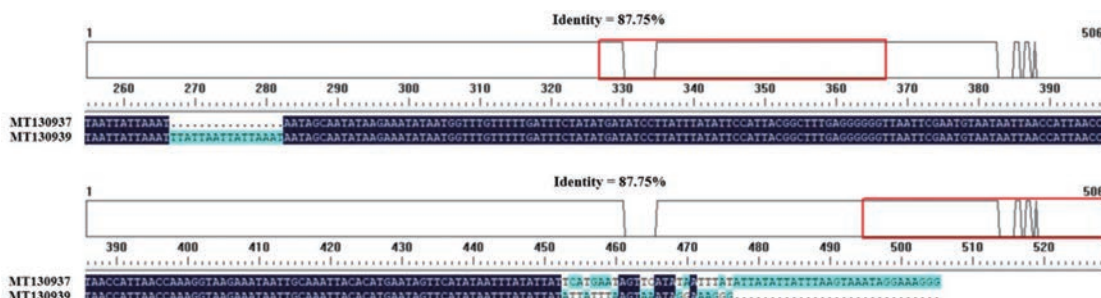
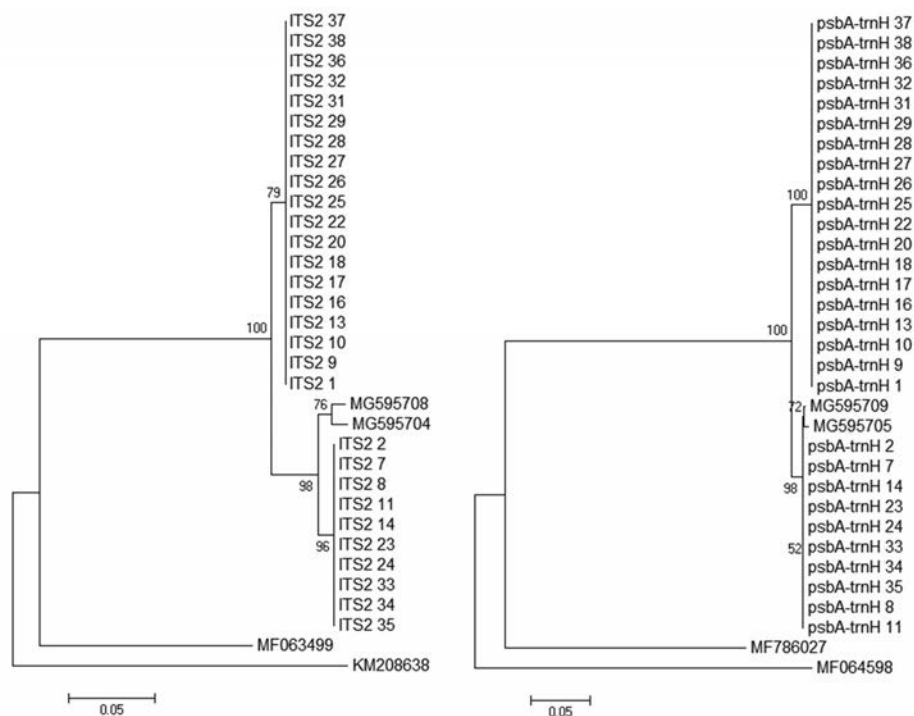


Figure 2 Similarity analysis of *psbA-trnH* sequences between *P. exiensis* and *P. acinosa*

Table 5 Sequence information for neighbor-joining tree

Latin name	Genus	GenBank accession No.	
		ITS2	<i>psbA-trnH</i>
<i>Phytolacca exiensis</i> sp. nov.	Phytolaccaceae <i>Phytolacca</i>	MG595708	MG595709
<i>Phytolacca japonica</i> Makino	Phytolaccaceae <i>Phytolacca</i>	MG595704	MG595705
<i>Anisodus tanguticus</i> (Maxim.) Pascher	Solanaceae <i>Anisodus</i>	KM208638	MF786027
<i>Gypsophila oldhamiana</i> Miq.	Caryophyllaceae <i>Gypsophila</i>	MF063499	MF064598

**Figure 3** Neighbor-joining trees of *Phytolacca* L. and adulterants based on ITS2 and *psbA-trnH* sequences

条形码鉴定技术不但能够批量鉴定、可重复性强,又不需要对形态鉴定的相关知识积累,且不受环境因素、样品形态及材料部位的影响,因此在中药材基原鉴定方面应用广泛^[17]。本研究运用 DNA 条形码技术对陕西关中地区野生商陆资源品质进行鉴别,探讨 ITS2 和 *psbA-trnH* 在商陆中的鉴别能力,为该资源品种鉴定与分类等研究提供依据。

29 个野生商陆样本的序列分析结果表明, ITS2 和 *psbA-trnH* 序列的 PCR 扩增和测序成功率均为 100%。K2P 种间明显大于种内且形成明显的间隔区 *barcoding gap*, 这是判断条形码是否理想的标准^[9]。Duan 等^[18]在紫丹参及其混伪品的研究中发现,根据 K2P 遗传距离分析,明显的 *barcoding gap* 可以将紫丹参和丹参显著区分开,因此 ITS2 序列可作为鉴别紫丹参基原植物及近源种的 DNA 条形码。Zheng 等^[19]在对川贝母及其近源种进行分子鉴定时,发现 *psbA-trnH* 序列的种内与种间距离分布重叠度远高于 ITS2 序列,因此 ITS2 适宜贝母物种鉴定及亲缘关系研究。本研究 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列的种间 K2P 遗传距离均明显大于种内,且形成显著

的间隔区 *barcoding gap*, 无重叠区域,因此 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列都符合 DNA 条形码候选序列的基本要求。

进化树分析表明 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列均能明显区分各样本,利用 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列构建的进化树均将在 NCBI 中 BLAST 鉴定为鄂西商陆的样本 8、11 与商陆聚为一支。本研究随后对所有样本特别是样本 8、11 与鄂西商陆作进一步形态对比,发现二者更接近商陆,而非鄂西商陆,而该物种仅在湖北西部的 3 个地点发现,产生原因和时间不详,基本无扩散可能^[4],推测生境因子可能诱导了类似变异,这种影响可能导致一些特殊的地理生态型产生^[20]。因此, ITS2 和 *psbA-trnH* 序列均可用于商陆及其混伪品的分子鉴别, ITS2 序列较 *psbA-trnH* 变异程度大,种间鉴别更有优势, *psbA-trnH* 能甄别种内变异,可能有利于从环境或遗传多样性角度研究。

南北朝陶弘景《名医别录》云:“如人形者,有神。生咸阳^[15]。”明代《本草品汇精要》记载“生咸阳川谷,今处处有之,多生人家园圃中,(道地)并州凤翔府^[16]。”表明咸阳、凤翔府为古时商陆的道地产区。另有研究

对全国 23 份野生商陆种源的水溶性浸出物、商陆皂苷甲含量进行测定,发现其中 4 个高成分含量的优质种源,有 3 个出自陕西^[21],说明陕西有着得天独厚的商陆优质资源。本研究表明关中地区商陆属除了入侵物种垂序商陆外,基本为一个本土物种,即商陆 *P. acinosa*,且少数个体发生变异。这种物种高度的保守型或许与关中地区被秦岭和黄土高原包围的地形有关,这种地形对物种的自然传播起到了天然的屏障作用,导致了该区域商陆资源较单一,偶尔发生变异可能与生境因子有关。

致谢: 西北农林科技大学陈耀锋教授和刘虎岐副教授在采样过程中给予帮助。

作者贡献: 第一作者吕瑞华完成相关实验及论文撰写工作,通讯作者张岗负责设计、指导实验及论文修改,冯昭、马添翼参与实验及数据分析,吕蕊花、高静参与样品采集及修改论文,张明英、彭亮参与数据分析及对论文的修改。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 324-325.
- [2] Editorial Committee of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences. Flora of China Volume 26 (中国植物志第 26 卷) [M]. Beijing: Beijing Science Press, 1996: 14-19.
- [3] Fu JP, Li CR, Xu JW, et al. Prevention and control of invaded plant *Phytolacca americana* in sandy coastal shelter forests [J]. Chin J Appl Ecol (应用生态学报), 2012, 23: 991-997.
- [4] Xie D, Qian D, Zhang MH, et al. *Phytolacca exiensis*, a new species of Phytolaccaceae from west of Hubei province, China [J]. Phytotaxa, 2017, 331: 224-232.
- [5] Xu Q, Jin TW, Shen WX. Discussion on sustainable development strategy for forest medicinal plants in China: a review from a biodiversity perspective [J]. World Forest Res (世界林业研究), 2018, 31: 81-85.
- [6] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS One, 2010, 5: e8613.
- [7] Group CPW. A DNA barcode for land plants [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106: 12794-12797.
- [8] Li DZ, Gao LM, Li HT, 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 U S A, 2011, 108: 19641-19646.
- [9] Chen SL. Standard DNA Barcodes of Chinese Materia Medica in Chinese Pharmacopoeia (中国药典中药材 DNA 条形码标准序列) [M]. Beijing: Beijing Science Press, 2015: 6-8.
- [10] Yao H, Song JY, Ma XY, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region [J]. Plant Med, 2009, 75: 667-669.
- [11] Liu YL, Geng YP, Wang F, et al. Identification of *Astragalus* and its adulterants based on ITS2 sequence and secondary structure [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 522-529.
- [12] Li J, Zhang R, Yu SP, et al. Identification of Chinese medicinal materials *Stellariae Radix* and its adulterants using DNA barcoding [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 937-943.
- [13] Zhu F, Yuan S, Zhang ZW, et al. Pokeweed antiviral protein (PAP) increases plant systemic resistance to Tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana* [J]. Eur J Plant Pathol, 2016, 146: 541-549.
- [14] Li FY, Tang KL, Cai CT, et al. *Phytolacca acinosa* Roxb. with *Arthrobacter echigonensis* MN1405 enhances heavy metal phytoremediation [J]. Int J Phytoremediat, 2016, 18: 956-965.
- [15] Tao HJ (Liang). Shang ZJ (proofread). Ming Yi Bie Lu [名医别录(辑校本)] [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986: 232.
- [16] Liu WT (Ming). Ben Cao Pin Hui Jing Yao (本草品汇精要) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982: 396.
- [17] Intharuksa A, Sasaki Y, Ando H, et al. The combination of ITS2 and *psbA-trnH* region is powerful DNA barcode markers for authentication of medicinal *Terminalia* plants from Thailand [J]. J Nat Med, 2020, 74: 282-293.
- [18] Duan BZ, Li W, Deng HX, et al. Identification of ethnic medicine *Salvia yunnanensis* and its closely related species based on DNA barcode technique [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 1204-1211.
- [19] Zheng H, Deng KY, Chen AQ, et al. Molecular identification and genetic relationship of *Fritillaria cirrhosa* and related species based on DNA barcode [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 2326-2334.
- [20] Lin S, Wu HY, Zhang HY, et al. Cluster analysis on *psbA-trnH* and ITS2 sequences of *Microcos paniculata* from different geographical populations [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 1403-1408.
- [21] Zhou KL, Lv WQ, Tang SL. Variation patterns of contents of water-soluble extractives and esculentoside A and selection of superior germplasm in *Phytolacca acinosa* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 44-50.