

基于叶绿体基因组种间高变区序列的黄精属药用植物分子鉴定

陈锦豪^{1#}, 程文萍^{1#}, 高静^{1,2}, 李依民^{1,2}, 张岗^{1,2}, 陈莹^{1,2}, 颜永刚^{1,2}, 张明英^{1,2*}

(1. 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 西安 712046; 2. 陕西中医药大学, 陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 西安 712046)

摘要: 黄精属 *Polygonatum* Mill. 是天门冬科 Asparagaceae 一个具有重要药用价值的草本植物类群, 高度的形态多样性、广泛的地理分布、复杂的物种形成过程以及缺乏高分辨率的分子标记, 导致属下种间划分鉴定长期存在争议。本研究以中国分布的黄精属 15 种代表药用植物来自 32 个居群共 166 个个体为对象, 以黄精属叶绿体全基因组 14 个种间高变区序列作为候选分子标记, 评估其种间、种内变异情况, 并分别基于建树法 (tree-based method) 和距离法 (pairwise genetic distance method, PWG-distance method) 分析评估各序列及其组合对黄精属药用植物的种间鉴定分辨率。结果显示, 除 *trnT-trnL* 外, 其余 13 条候选分子标记序列的 PCR 扩增和测序成功率良好; 序列独立、联合分析的种间、种内遗传距离间均存在不同程度的重叠, 其中, 序列联合分析的种间、种内遗传距离重叠程度显著小于独立分析。14 组序列独立分析基于建树法和距离法的物种鉴定分辨率分别为 6.67%~40% 和 20%~60%, 联合分析的物种鉴定分辨率分别提升至 40%~73.33% 和 46.67%~73.33%。其中, 组合序列 C0 和 C1 (建树法和距离法)、C2 和 C3 (建树法) 以及 C25 (距离法) 的物种鉴定分辨率均为最高, 达到 73.33%, 说明多序列联合分析能有效提高物种鉴定分辨率。此外, 序列 *psaJ-rpl33+rps16-trnQ-trnF-ndhJ-trnT-trnL-trnK-matK* 和 *atpF* 及组合序列 *psaJ-rpl33+rps16-trnQ+trnF-ndhJ+trnK-matK+atpF* 均具有相对较高的物种鉴定分辨率, 可作为黄精属药用植物种间鉴定的特异性高分辨率分子标记 (组合)。本研究将为黄精属药用植物种质资源保护利用和该属植物来源中药材的准确鉴定及规范黄精药材市场提供理论基础。

关键词: 黄精属; 种间鉴定; 分子标记; 药用植物; 序列变异

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1543-12

Molecular identification of medicinal *Polygonatum* species based on plastid divergence hotspot regions

CHEN Jin-hao^{1#}, CHENG Wen-ping^{1#}, GAO Jing^{1,2}, LI Yi-min^{1,2}, ZHANG Gang^{1,2}, CHEN Ying^{1,2},
YAN Yong-gang^{1,2}, ZHANG Ming-ying^{1,2*}

(1. College of Pharmacy and Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; 2. Key Laboratory for Research of "Qin Medicine" of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

Abstract: *Polygonatum* Mill. (Asparagaceae) is a pharmaceutically important genus with many species are of significant medicinal value. Taxonomy and interspecific identification of *Polygonatum* species have long been controversial due to their considerable morphological variation, wide geographic distribution, complex speciation

收稿日期: 2024-12-22; 修回日期: 2025-02-10.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82003898); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2022JM-458); 秦创原中医药产业创新聚集区项目 (L2024-QCY-ZYYJJQ-X77, L2024-QCY-ZYYJJQ-X74); 陕西省教育厅项目 (22JC028); 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).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-29-38185165, E-mail: zhangmy@sntcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1272

processes, and lacking of high-resolution molecular markers. To evaluate species discrimination power of 14 plastid divergence hotspot regions (candidate sequences) and their combinations in *Polygonatum*, a total of 166 individuals from 32 populations representing 15 medicinal *Polygonatum* species distributed in China were sampled for study. The interspecific and intraspecific genetic variation of each sequence and sequence combination were estimated, and tree-based and pairwise genetic distance (PWG-distance) methods were applied. The results indicated that except for *trnT-trnL*, the designed primers for all the other 13 candidate sequences showed good universality. Varying degrees of overlaps were detected between intraspecific and interspecific genetic distances in each of the 14 single candidate sequences and their combinations. Nonetheless, overlaps in the combined sequences were significantly lower than those in single sequences. Species resolution of the 14 single sequences were 6.67%–40% and 20%–60% based on tree-based and PWG-distance methods, separately. The combined sequences possessed higher species-resolving power with 40%–73.33% by tree-based method and 46.67%–73.33% by PWG-distance method, accordingly. Among them, the combined sequences C0 and C1 (in both tree-based and PWG-distance methods), C2 and C3 (in tree-based method), and C25 (in PWG-distance method) all showed the best resolution degree of 73.33%, indicating that combination of sequences could effectively improve species discrimination power. In addition, sequences *psaJ-rpl33*, *rps16-trnQ*, *trnF-ndhJ*, *trnT-trnL*, *trnK-matK* and *atpF* all exhibited relatively higher species-resolving degree, which could be used as specific molecular markers for the identification of medicinal *Polygonatum* species, and we propose the combination of *psaJ-rpl33+rps16-trnQ+trnF-ndhJ+trnK-matK+atpF* as the most ideal high-resolution molecular marker for discriminating the medicinal *Polygonatum*. This study will provide a basis for conservation and utilization of germplasm resources and accurate identification of medicinal *Polygonatum*, as well as standardizing the market for Polygonati Rhizoma.

Key words: *Polygonatum* Mill.; interspecific identification; molecular marker; medicinal species; sequence divergence

黄精属 *Polygonatum* Mill. 是天门冬科 Asparagaceae 黄精族 Polygonateae 中物种数量最多且具有重要药用价值的草本植物类群。全世界分布有黄精属植物约 78 种 (<https://powo.science.kew.org/>), 中国约 39 种, 其中 31 种在不同地区入药使用^[1,2], 是中药材的重要来源。药理学研究指出, 黄精属植物含多糖、甾体皂苷、黄酮、生物碱等多种活性成分, 具有抗肿瘤、抗衰老、抗菌、抗炎、抗病毒、调节免疫、降血糖血脂等作用^[3,4], 在中医临床和现代药物研发中应用广泛。中国药典 (2020 年版一部) 收录的中药材黄精 (*Polygonati Rhizoma*)、玉竹 (*Polygonati Odorati Rhizoma*) 分别来源于黄精属药用植物黄精 *P. sibiricum* Delar. ex Redoute、多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua 和滇黄精 *P. kingianum* Collett & Hemsl 及玉竹 *P. odoratum* (Mill.) Druce 的干燥根茎, 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾和养阴润燥、生津止渴等功效^[5]。同时, 作为重要的药食同源中药材, 黄精和玉竹也被广泛用于食品、保健品、化妆品等开发^[6]。

中药材基原物种的准确鉴定是保证用药安全和临床疗效的关键基础。研究表明, 黄精属不同植物所含主要药用活性成分和含量不尽相同^[7-9], 入药功效也有所差异^[3,4]。然而, 由于形态变异复杂多样, 地理分布广泛重叠, 种间及同种不同居群个体间常存在形态上的过渡类型, 导致种间划分和形态鉴定长期存在争

议^[10-12]。而黄精属植物多以根状茎入药, 生药性状的相似性更增加了药材基原准确鉴定的难度^[10,13]。黄精属内不同物种混用、误用、非正品基原替代黄精或玉竹使用, 甚至伪品入药现象时有发生^[2,10,13], 严重影响该属植物来源中药材的入药安全性和临床疗效。

DNA 条形码分子鉴定技术基于物种遗传信息 DNA 序列的独特性和稳定性从基因水平为药用植物及中药材基原的客观准确鉴定提供了有力补充^[14]。植物类群鉴定通用 DNA 条形码, 包括叶绿体基因 *matK*、*rbcL*、基因间区 *psbA-trnH* 和核基因间区 ITS、ITS2 等序列^[15-17]。此外, 一些高变异叶绿体基因及基因间区序列 (*rps16-trnQ*、*trnL-trnF*、*trnT-trnL*、*psbK-psbI*、*ycf1* 等) 也被广泛用于药用植物及其来源中药材的分子鉴定研究^[18-23]。然而, 黄精属植物在物种形成过程中经历了复杂的网状进化 (包括杂交和多倍化等)^[12] 和快速辐射分化^[24], 研究表明, 通用 DNA 条形码序列及常规叶绿体分子标记对黄精属物种鉴定的分辨率有限, 不能实现不同种间有效区分鉴别^[25]。其中, ITS 和 ITS2 序列在黄精属不同物种中的 PCR 扩增成功率低 (< 50%)^[13,26], *matK*、*rbcL* 及 *psbA-trnH* 等序列的种间变异信息位点不足, 物种鉴定分辨率仅分别为 29%~41.67%、5%~16.66% 和 8.33%~31%^[13,26,27]。此外, Meng 等^[11] 和 Zhao 等^[28] 分别利用叶绿体 *rbcL*、*trnK*、*psbA-trnH* 及 *trnC-petN* 序列和

atpB-rbcL、*matK-rbcL* 及 *rps16* 序列联合对黄精属的分子系统发育研究结果均未能有效解决其种间划分问题。

被子植物叶绿体基因组序列中常存在一些种间高变区 (divergence hotspot regions), 可以作为物种鉴定的潜在分子标记, 然而, 其种间鉴定分辨率需要进一步的实验分析进行验证^[19,29]。本项目前期基于二代高通量测序获得了黄精属 28 个物种来自不同分布地区共 58 个代表个体的叶绿体全基因组序列, 对其进行了种间、种内变异比较分析, 共筛选到 14 个种间高变区 (未发表数据)。在此基础上, 本研究拟以这 14 个种间高变区序列作为候选分子标记, 设计引物, 通过 PCR 扩增和测序获取目的序列, 进一步分析评估其对黄精属药用植物的种间鉴定分辨率, 以期挖掘适用于黄精属药用植物种间区分鉴定的特异性高分辨率分子标记, 为黄精属药用植物种质资源保护、利用及其来源中药材的准确鉴定和规范黄精药材市场提供理论依据。

材料与方法

实验材料 以《中国药用植物志》^[2]中收录的黄精

属 15 种代表药用植物为研究对象, 采集野生自然生长状态下的健康幼嫩叶片, 硅胶快速脱水干燥保存, 作为实验材料, 同时采集凭证标本。共采集得到来自 32 个居群共 166 份代表个体。凭证标本经陕西中医药大学中药标本馆王继涛高级实验师鉴定, 并保存于陕西中医药大学中药标本馆 (实验材料及标本信息见表 1)。

基因组 DNA 提取 利用改良的 CTAB 法^[30]提取基因组总 DNA, TE 缓冲液溶解, 并分别用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计 (KAIAO, K5800) 检测 DNA 溶液的质量与浓度, 检测合格的 DNA 溶液 -20 °C 保存备用。

引物设计、PCR 扩增、测序 以前期筛选的叶绿体全基因组 14 个种间高变区序列为模板, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物, 分别对 166 份实验材料进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应均为 50 μL 混合体系, 包括 2×SanTaq PCR Mix [with Blue Dye, B532061, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 25 μL, 正、反向引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 2 μL, 模板 DNA 5 μL 和 ddH₂O 16 μL。PCR 扩增反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性

Table 1 Voucher information of the studied samples

Species	Number of samples	Locality	Sample number	Voucher number
<i>P. acuminatifolium</i>	7	Baishan City, Jilin Province	ACbs1-ACbs7	1_L_2022_wuye_jl
<i>P. cirrhifolium</i>	16	Taibai County, Baoji City, Shaanxi Province	CItb1-CItb4	P_JY_001_tb
		Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture, Sichuan Province	CIab1-CIab10	2_L_2022_juanye_sc
		Xianyang City, Shaanxi Province	CIxy1, CIxy2	15_Y_2022_juanye
<i>P. curvistylum</i>	9	Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture, Sichuan Province	CUab1-CUab9	10_L_2022_chuiye_sc
<i>P. cyrtonema</i>	8	Yichang City, Hubei Province	CYyc1	9_L_2022_duohua_hb
		Guiyang City, Guizhou Province	CYgy1-CYgy5	12_ZMY_P_gz
		Guangzhou City, Guangdong Province	CYgz1, CYgz2	14_Y_2022_duohua_gd
<i>P. filipes</i>	19	Liancheng County, Longyan City, Fujian Province	FIjj1-FIjj9	3_L_2022_changgeng_gx
		Nanping City, Fujian Province	FIIn1-FIIn10	4_L_2022_changgeng_fj
<i>P. franchetii</i>	10	Bazhong City, Sichuan Province	FRbz1-FRbz10	7_L_2022_juyao_sc
<i>P. gracile</i>	4	Taibai County, Baoji City, Shaanxi Province	GRtb1-GRtb4	P_XGJ_001_tb
<i>P. involucratum</i>	2	Taibai County, Baoji City, Shaanxi Province	INtb1, INtb2	P_EBHJ_001_tb
<i>P. kingianum</i>	10	Shimian County, Ya'an City, Sichuan Province	KIsm1-KIsm10	5_L_2022_dian_sc
<i>P. macropodum</i>	3	Longhua County, Chengde City, Hebei Province	MAdl1-MAdl3	P_RH_01_cd
<i>P. megaphyllum</i>	2	Taibai County, Baoji City, Shaanxi Province	MEtb1, MEtb2	P_DBHJ_001_tb
<i>P. odoratum</i>	24	Mei County, Baoji City, Shaanxi Province	ODm1	21-009_mx
		Cuiji Mountain in Taibai County, Baoji City, Shaanxi Province	ODtb1-ODtb9	P_YZ_001_tbcjs
		Ecological Park in Taibai County, Shaanxi Province	ODsy1-ODsy4	P_YZ_001_tbsty
		Baishan City, Jilin Province	ODbs1-ODbs10	8_L_2022_yuzhu_jl
<i>P. sibiricum</i>	18	Longhua County, Chengde City, Hebei Province	SIlh1-SIlh8	P_huangjing_01_cd
		Zhenba County, Hanzhong City, Shaanxi Province	SIzb1, SIzb2	21-031_zb
		Cuiji Mountain in Taibai County, Baoji City, Shaanxi Province	SItb1, SItb2	P_HJ_001_tb
		Bald Mountain in Taibai County, Baoji City, Shaanxi Province	SIlIn1-SIlIn3	P_GTS_001_tb
		Xianyang City, Shaanxi Province	SIxy1-SIxy3	Y_2022_huangjing_01_xy
<i>P. verticillatum</i>	16	Zhenba County, Hanzhong City, Shaanxi Province	VEzb1-VEzb4	21-028_zb
		Mei County, Baoji City, Shaanxi Province	VEm1-VEm3	21-006_mx
		Bazhong City, Sichuan Province	VEbz1-VEbz9	P_LY_01_sc
<i>P. zanlanscianense</i>	18	Zhenba County, Hanzhong City, Shaanxi Province	ZAzb1	21-034_zb
		Mei County, Baoji City, Shaanxi Province	ZAm1, ZAm2	21-004_mx
		Taibai County, Baoji City, Shaanxi Province	ZAtb1-ZAtb5	P_HBHJ_001_tb
		Yichang City, Hubei Province	ZAyc1-ZAyc10	11_L_2022_hubei_hb

30 s, 51.3~59.5 °C退火 30 s, 72 °C延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C延伸 10 min; 反应结束后 4 °C保存 (引物信息及 PCR 反应退火温度见表 2)。PCR 扩增反应在 TTM 100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Singapore) 上完成。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增成功的产物进行 Sanger 测序。PCR 引物序列合成和测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

序列拼接及变异分析 利用 Sequencher v.4.6 对测序得到的原始数据进行序列拼接, 去除引物及两端的低质量序列, 并根据测序峰图对各个位点的碱基进行检查校正。在 Geneious v.8.0.2 中将得到的 14 组候选分子标记序列分别构建多序列矩阵, 利用 MAFFT 完成序列比对。利用 MEGA v.7.0 计算各组序列的变异位点 (variable site)、简约信息位点 (parsimony informative site) 含量和种间、种内 K2P (Kimura 2-parameter distance) 遗传距离, 评估种间、种内遗传距离间是否存在“Barcoding gap”。

物种鉴定分析 分别基于建树法 (tree-based method) 和距离法 (pairwise genetic distance method, PWG-distance method) 分析评估各组序列的物种鉴定分辨率。建树法即利用 MEGA 软件基于 K2P 距离和配对删除 (pair-deletion) 模型, 构建邻接系统发育树

(neighbor-joining tree, NJ tree), 系统树各分支节点的靴带支持率 (bootstrap values, BS) 通过进行 1 000 次自展重复分析计算得到。当同一物种内所有个体在系统树上聚为一个单系, 且支持率高于 50%, 则视为该物种被鉴定成功^[16,26]; 距离法即分别计算各组序列的种间、种内遗传距离, 当某物种与其他物种的最小种间遗传距离大于该物种种内所有个体间的最大遗传距离时, 视为该物种被鉴定成功^[15]。此外, 将 14 组序列分别进行组合, 同样基于建树法和距离法分析评估不同序列组合的物种鉴定成功率。序列组合方法为: 首先, 将所有 14 组序列比对后进行串联合并, 得到组合序列 C0; 其次, 由于序列 *trnT-trnL* 的 PCR 扩增成功率 (65.06%) 和最终有效序列获得率 (59.04%) 较低, 去除该序列, 并将其余 13 组序列根据其独立分析物种鉴定分辨率由高到低进行排序, 依次去除分辨率最低的序列 (若多条序列独立分析物种鉴定分辨率相同, 则每次去除其中 1 条), 并将剩余序列进行串联合并, 得到组合序列 C1、C2、C3……C32, 即最终共得到 33 组分子标记组合序列。序列组合时, 当某个体出现序列缺失情况 (如 2 条序列组合时, 某个体只有 1 条序列; 3 条序列组合时, 某个体只有 1 条或 2 条序列, 依次类推), 则将有序列缺失的个体在分析中去除。

Table 2 Information of the 14 sequences, designed primers and PCR amplification procedures

Sequence name	Primer name	Primer	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature/°C
<i>trnL-ccsA</i>	M1	M1-F	ACACGCTGCTCTTAGGAAGC	56.5
		M1-R	CCATACTGCTCCAGAAAGAATACC	
<i>trnV-trnM-atpE</i>	M13	M13-F	GCCTAGCATTGAATGGGCTGGGTA	59.5
		M13-R	TCTGATGGGTGGTTTCGCTAG	
<i>rpl14-rpl16</i>	M14	M14-F	CATTCAAAGGGTCTGAGGTTG	55.6
		M14-R	CGTCTCTGTAGTAGAGGTGGGATTA	
<i>ycf3</i>	M17	M17-F	TTATGAACTGACAGGAGCTGGTATT	57.2
<i>atpF</i>	M18	M18-F	CGTTCATTCGATACTCATCTGC	51.3
		M18-R	CCATAGCATTTCGTTATTCATTG	
<i>ccsA-ndhD</i>	M2	M2-F	GGTATTCTTTCTGGAGCAGTATGG	54.3
		M2-R	CTTTCGCTATCAGTTGACAAGG	
<i>trnF-ndhJ</i>	N10	N10-F	CGGGATAGCTCAGTTGGTAGA	55
		N10-R	GATGCCAGAAAGTTGGATGG	
<i>psaJ-rpl33</i>	N14	N14-F	GCGCCTGTGCTAACTACTCTAT	56
		N14-R	CGACCCGAACCTAAGAAGAC	
<i>rps11-rpl36-infA</i>	N15	N15-F	ACGTGAACCAATACGTCCATTC	56.6
		N15-R	GGATACTGCCGGGAGATAGAGT	
<i>trnK-matK</i>	N17	N17-F	CTACACTACTACACGGGCATTC	55.9
		N17-R	GGAACCTTCTTGAGCGAACAC	
<i>trnT-trnL</i>	N18	N18-F	TAAGCGGGCTCACATAACAG	51.8
		N18-R	GAAGGGTCGATATTCTTTCTT	
<i>ycf1</i>	N4	N4-F	GTGAGTAACGTATCAAAGCCACTT	53.2
		N4-R	ATGCGATGATGAGAATGAACAA	
<i>rps16-trnQ</i>	N7	N7-F	ATCAAGTACCAAGGGTTCACAA	55.8
		N7-R	CTCCGTCCAGATCGTCTC	
<i>rps15-ycf1</i>	Y2	Y2-F	GACTCCCGAATACCTAATTGACC	54.5
		Y2-R	TCCCGGAATTGGAATGTTGT	

结果

1 PCR扩增、测序及序列特征

PCR扩增、测序结果及序列特征见表3。除 *trnT-trnL* 外,其余13组序列的PCR扩增和测序成功率分别为92.17%~100%和99.35%~100%,最终有效序列得率为91.57%~100%。14组序列比对后的长度为348~744 bp,变异位点和简约信息位点含量分别为2.43%~8.52%和1.55%~5.03%。其中,序列 *rps16-trnQ* 和 *trnF-ndhJ* 的长度均大于700 bp,同时 *rps16-trnQ* 序列的简约信息位点数量亦为最多。

14条候选分子标记序列独立、联合分析的种间、种内遗传距离见表4。独立分析的种内最小遗传距离均为0,最大遗传距离为0.002 02~0.010 7,平均为0.000 57~0.002 68;种间最小遗传距离为0~0.001 8,最大遗传距离为0.007 90~0.035 97,平均为0.003 12~0.020 11。其中, *rps16-trnQ* 独立分析的种间最小遗传距离最大, *ycf3* 的种内最大遗传距离和种间最小遗传距离均为最小。33组组合序列的种内最小遗传距离亦均为0,最大遗传距离为0.002 96~0.004 17,平均为0.000 80~0.001 37;种间最小遗传距离为0.001 12~0.002 53,最大遗传距离为0.013 42~0.022 55,平均为0.008 44~0.011 89。其中,组合序列C25的种内最大遗传距离最小,C28的种内最大遗传距离和种间最小遗传距离均为最大,C31和C32的种间最小遗传距离相同且均为最小。

Barcoding gap分析结果显示,序列独立、联合分析的种间、种内遗传距离均存在一定程度重叠,两者均未检测到明显的Barcoding gap(图1)。其中,序列联合分析的种间、种内遗传距离重叠程度显著小于独立分析, *rps16-trnQ*、*trnF-ndhJ*、*trnT-trnL* 及组合序列C25、C27、

C29、C24和C30等的种间、种内遗传距离重叠的范围较小, *ycf1*、*ycf3*和C28、C31等的种间、种内遗传距离重叠的范围相对较多。

2 分子鉴定分析

2.1 基于建树法的物种鉴定分析 14条候选分子标记序列基于建树法分析的物种鉴定分辨率为6.67%~40%,分别有1~6个物种可被不同的序列独立鉴别(表3,图2)。其中, *psaJ-rpl33* 序列的物种鉴定分辨率最高,为40%,黄精、距药黄精 *P. franchetii* Hua、细根茎黄精 *P. gracile* P. Y. Li、热河黄精 *P. macropodium* Turcz.、垂叶黄精 *P. curvistylum* Hua和二苞黄精 *P. involucratum* (Franch. & Sav.) Maxim.6个物种的种内不同个体均能够以>50%的支持率各自聚类为单系,被成功鉴定; *rps16-trnQ*、*trnF-ndhJ* 和 *trnT-trnL* 的分辨率次之,分别可成功鉴定5个物种; *trnK-matK*、*ccsA-ndhD* 和 *atpF* 可分别成功鉴定3个物种; *trnL-ccsA*、*ycf3* 和 *ycf1* 的分辨率最低,均仅6.67%,垂叶黄精、细根茎黄精和滇黄精依次分别被成功鉴别。

序列联合分析基于建树法的物种鉴定分辨率为40%~73.33%。其中,组合序列C0、C1、C2、C3的物种鉴定分辨率最高,均为73.33%,除卷叶黄精 *P. cirrhifolium* (Wall.) Royle、玉竹、轮叶黄精 *P. verticillatum* (L.) All. 和湖北黄精 *P. zanlanscianense* Pamp. 之外,其余11个物种内的不同个体均以>50%的支持率各自聚类为单系,被成功鉴定(图3A)。C4、C7的分辨率均为66.67%,可成功鉴别10个物种;C6、C8、C11、C12、C15、C18、C19、C20和C25(图3B),C5、C9、C10、C13、C14、C16、C17、C21、C22、C23、C24和C27,以及C26、C29、C30、C31和C32的物种鉴定分辨率依次分别为60%、53.33%、46.67%,可分别成功鉴别9、8及7个物种;C28

Table 3 Results of PCR amplification, sequencing, and characteristics and species discriminatory power of the 14 sequences based on tree-based and pairwise genetic distance (PWG-distance) method

Primer name	PCR amplification success rate (%) / number of samples	Sequencing success rate (%) / number of sequences	Sequence receiving rate / %	Aligned sequence length / bp	Variable sites (bp) / rate	Parsimony informative sites (bp) / rate	Number of identified species / discriminatory power (%)	
							Tree-based method	PWG-distance method
<i>trnL-ccsA</i>	100/166	100/166	100	575	14/2.43%	13/2.26%	1/6.67	4/26.67
<i>trnV-trnM-atpE</i>	99.4/165	100/165	99.4	681	25/3.67%	16/2.35%	2/13.33	6/40
<i>rpl14-rpl16</i>	95.78/159	99.37/158	95.18	481	41/8.52%	23/4.78%	2/13.33	5/33.33
<i>ycf3</i>	100/166	100/166	100	387	11/2.84%	6/1.55%	1/6.67	3/20
<i>atpF</i>	100/166	100/166	100	600	16/2.67%	16/2.67%	3/20	8/53.33
<i>ccsA-ndhD</i>	100/166	100/166	100	457	25/5.74%	23/5.03%	3/20	5/33.33
<i>trnF-ndhJ</i>	99.4/165	100/165	99.4	709	27/3.81%	22/3.10%	5/33.33	8/53.33
<i>psaJ-rpl33</i>	98.8/164	100/164	98.8	535	29/5.42%	25/4.67%	6/40	7/46.67
<i>rps11-rpl36-infA</i>	100/166	100/166	100	348	17/4.89%	13/3.74%	2/13.33	5/33.33
<i>trnK-matK</i>	100/166	100/166	100	646	23/3.56%	18/2.79%	3/20	8/53.33
<i>trnT-trnL</i>	65.06/108	90.47/98	59.04	662	45/6.80%	27/4.08%	5/33.33	7/46.67
<i>ycf1</i>	92.17/153	99.35/152	91.57	503	27/5.37%	21/4.17%	1/6.67	4/26.67
<i>rps16-trnQ</i>	96.99/161	100/161	96.99	744	31/4.17%	28/3.76%	5/33.33	9/60
<i>rps15-ycf1</i>	98.8/164	100/164	98.8	697	25/3.59%	20/2.87%	2/13.33	6/40

Table 4 Interspecific and intraspecific K2P distance of the 14 sequences and their combinations. ^aNames of the 14 single sequences were represented by using their primer names

Sequence ^a	Intraspecific distance			Interspecific distance		
	Minimum	Maximum	Average	Minimum	Maximum	Average
M1	0	0.003 70	0.000 99	0	0.012 47	0.006 07
M13	0	0.002 60	0.000 73	0	0.013 29	0.006 70
M14	0	0.008 36	0.002 34	0	0.023 29	0.010 05
M17	0	0.002 02	0.000 57	0	0.007 90	0.003 12
M18	0	0.002 70	0.000 73	0.000 48	0.015 73	0.007 41
M2	0	0.010 70	0.002 68	0	0.035 97	0.020 11
N10	0	0.002 71	0.000 80	0.000 18	0.018 01	0.009 09
N14	0	0.004 95	0.000 81	0	0.021 07	0.010 11
N15	0	0.003 98	0.001 04	0	0.020 39	0.008 30
N17	0	0.003 27	0.000 62	0	0.010 10	0.005 76
N18	0	0.007 16	0.002 18	0.000 61	0.016 87	0.010 02
N4	0	0.005 39	0.001 70	0	0.018 57	0.007 31
N7	0	0.005 29	0.001 71	0.001 80	0.030 39	0.010 98
Y2	0	0.004 82	0.001 44	0.000 88	0.016 28	0.008 50
C0	0	0.003 45	0.000 84	0.001 91	0.013 78	0.008 57
C1	0	0.003 05	0.000 98	0.001 96	0.013 42	0.008 46
C2	0	0.002 99	0.001 01	0.001 81	0.013 85	0.008 68
C3	0	0.003 22	0.001 01	0.001 92	0.013 88	0.008 77
C4	0	0.003 16	0.001 00	0.002 12	0.013 89	0.008 57
C5	0	0.003 24	0.001 03	0.002 15	0.014 42	0.008 92
C6	0	0.003 36	0.001 03	0.002 05	0.014 24	0.008 82
C7	0	0.003 18	0.001 04	0.001 76	0.014 39	0.009 03
C8	0	0.003 46	0.001 07	0.002 00	0.014 85	0.009 22
C9	0	0.003 61	0.001 17	0.002 24	0.015 26	0.009 55
C10	0	0.003 32	0.001 02	0.002 06	0.014 97	0.009 18
C11	0	0.003 74	0.001 07	0.001 93	0.014 85	0.009 31
C12	0	0.003 59	0.001 08	0.002 02	0.015 14	0.009 29
C13	0	0.003 56	0.001 10	0.002 41	0.015 65	0.009 56
C14	0	0.003 92	0.001 17	0.002 27	0.015 32	0.009 73
C15	0	0.003 76	0.001 20	0.002 07	0.015 64	0.009 66
C16	0	0.003 31	0.001 02	0.002 00	0.015 06	0.009 27
C17	0	0.003 34	0.001 04	0.002 15	0.015 40	0.009 26
C18	0	0.003 91	0.001 09	0.002 04	0.015 27	0.009 41
C19	0	0.003 42	0.001 03	0.002 19	0.015 58	0.009 37
C20	0	0.004 13	0.001 20	0.002 11	0.015 72	0.009 87
C21	0	0.003 61	0.001 13	0.002 23	0.016 01	0.009 68
C22	0	0.003 43	0.001 09	0.002 41	0.016 07	0.009 74
C23	0	0.003 57	0.001 12	0.002 31	0.016 65	0.009 91
C24	0	0.003 63	0.001 24	0.002 53	0.018 95	0.010 91
C25	0	0.002 96	0.000 91	0.001 94	0.015 44	0.008 44
C26	0	0.003 99	0.001 20	0.002 03	0.018 16	0.010 44
C27	0	0.003 14	0.000 96	0.001 89	0.016 21	0.008 69
C28	0	0.004 17	0.001 37	0.002 16	0.022 55	0.011 89
C29	0	0.003 08	0.000 99	0.002 10	0.017 09	0.009 21
C30	0	0.003 36	0.001 08	0.002 00	0.019 00	0.009 85
C31	0	0.003 41	0.000 80	0.001 12	0.017 94	0.009 52
C32	0	0.003 72	0.001 30	0.001 12	0.020 09	0.010 25

分辨率最低,为40%,可鉴别6个物种。

2.2 基于距离法的物种鉴定分析 14条候选分子标记序列基于距离法分析的物种鉴定分辨率为20%~60%,分别有3~9个物种可被成功鉴别(表3)。其中,序列P. megaphyllum P. Y. Li、距药黄精、二苞黄精、五叶黄精 *P. acuminatifolium* Kom.、热河黄精、长梗黄精 *P. filipes* Merr. ex C. Jeffrey

& McEwan 和湖北黄精共9个物种的种内最大遗传距离均小于其与其他物种间的最小遗传距离而被成功鉴别。*TrnF-ndhJ*、*trnK-matK* 和 *atpF* 分辨率次之,均为53.33%,可成功鉴定8个物种;*psaJ-rpl33* 和 *trnT-trnL*, *trnV-trnM-atpE* 和 *rps15-ycf1*, *rpl14-rpl16*、*ccsA-ndhD* 和 *rps11-rpl36-infA*, 以及 *trnL-ccsA* 和 *ycf1* 的物种鉴定分辨率依次分别为46.67%、40%、33.33%和26.67%,分别有7、6、5和4个物种可被成功鉴别;*ycf3* 的分辨最

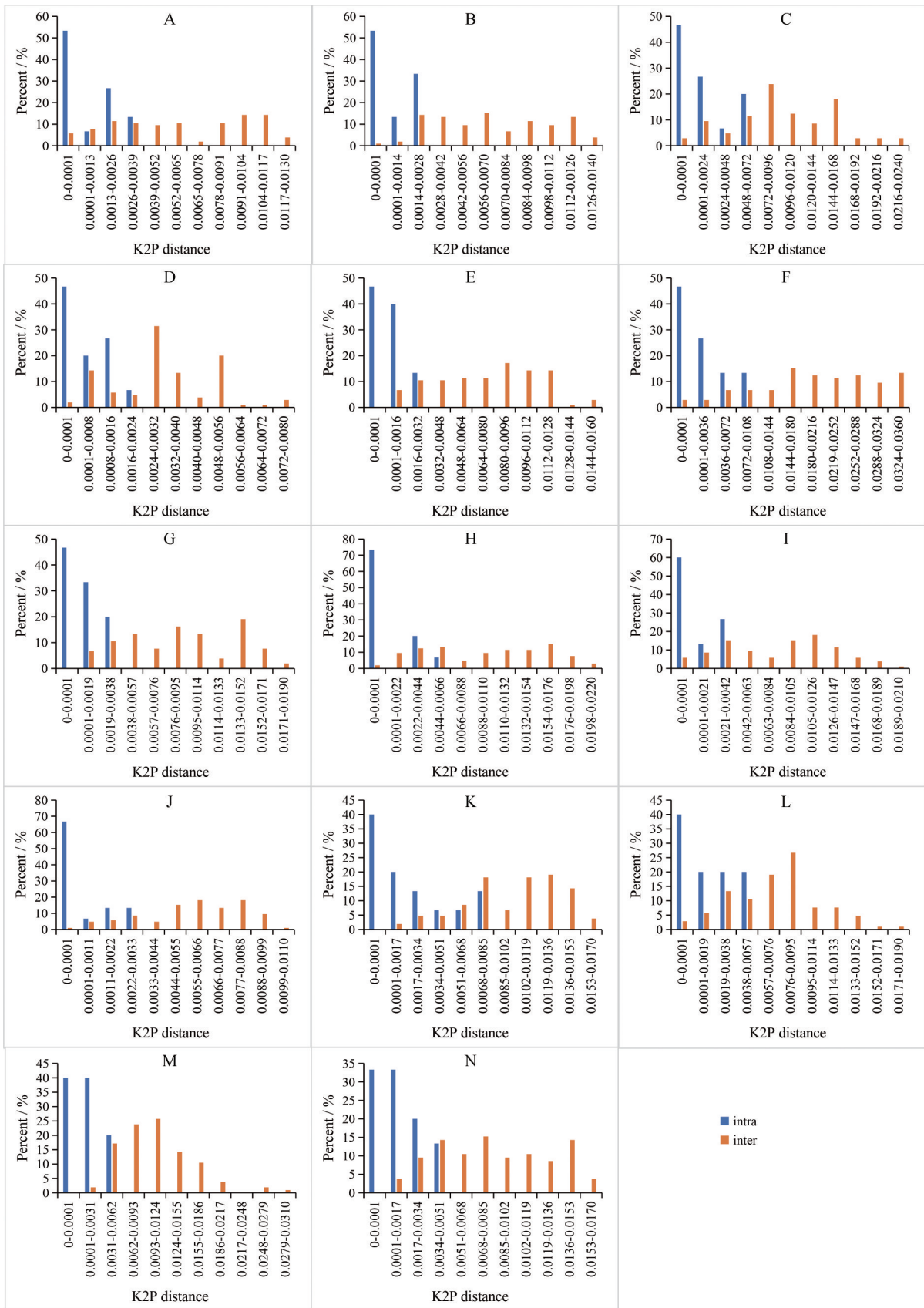


Figure 1 Percentage distribution of interspecific and intraspecific K2P distance of the 14 single candidate sequences. A: *trnL-ccsA*; B: *trnV-trnM-atpE*; C: *rpl14-rpl16*; D: *ycf3*; E: *atpF*; F: *ccsA-ndhD*; G: *trnF-ndhJ*; H: *psaJ-rpl33*; I: *rps11-rpl36-infA*; J: *trnK-matK*; K: *trnT-trnL*; L: *ycf1*; M: *rps16-trnQ*; N: *rps15-ycf1*

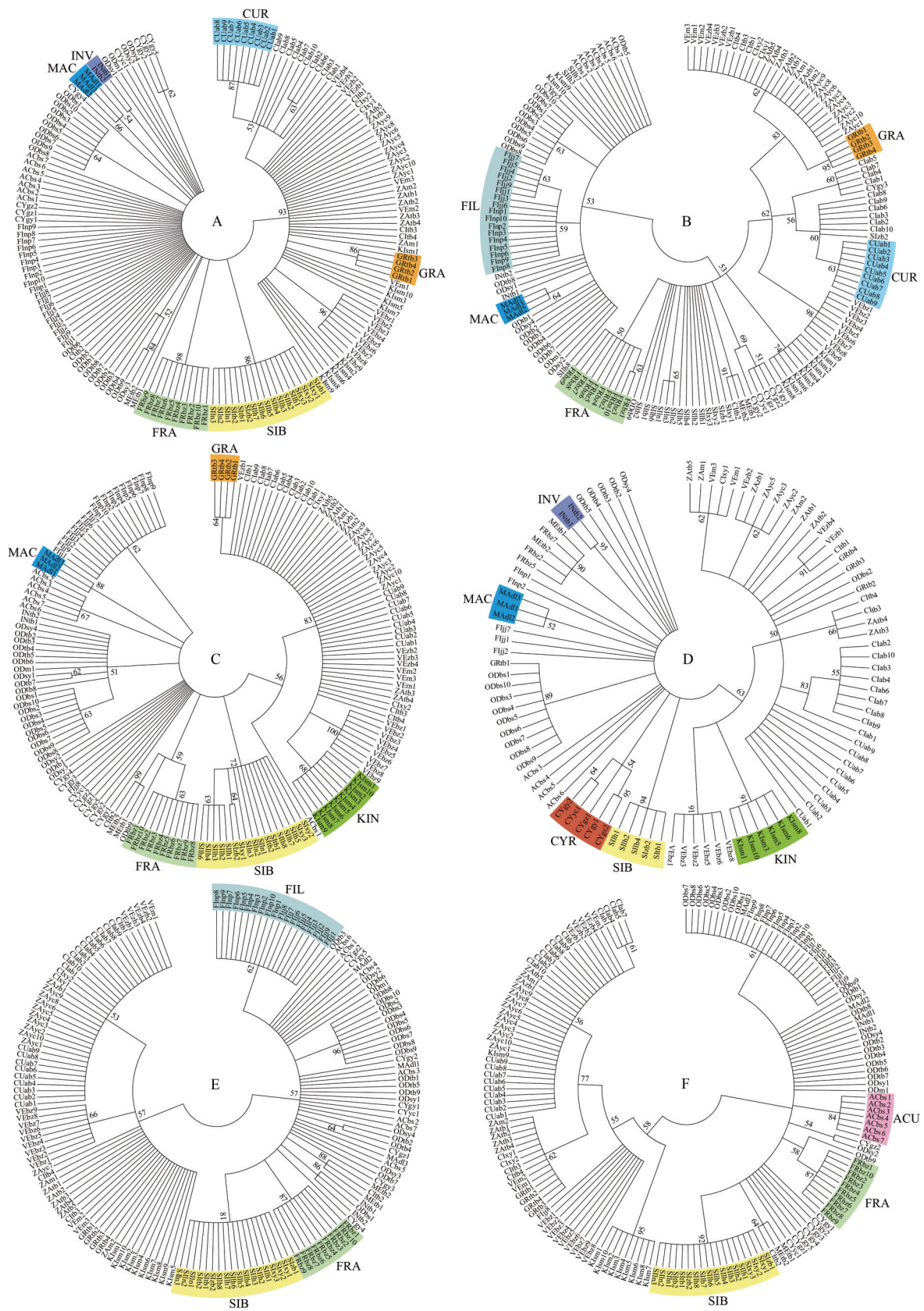


Figure 2 Neighbor-joining trees inferred utilizing each of the six high species-resolving power sequences. A: *psaJ-rpl33*; B: *rps16-trnQ*; C: *trnK-matK*; D: *trnT-trnL*; E: *trnF-ndhJ*; F: *atpF*. CUR: *P. curvistylum*; GRA: *P. gracile*; SIB: *P. sibiricum*; FRA: *P. franchetii*; MAC: *P. macropodum*; INV: *P. involucreatum*; FIL: *P. filipes*; KIN: *P. kingianum*; ACU: *P. acuminatifolium*; CYR: *P. cyrtonema*. Numbers along branches are bootstrap values

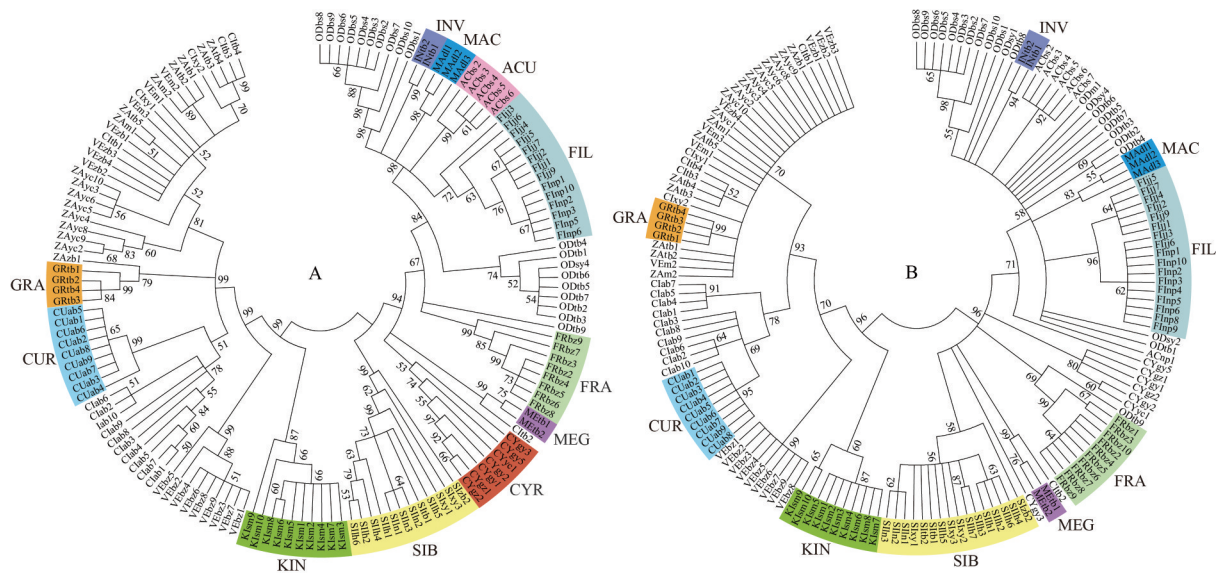


Figure 3 Neighbor-joining trees inferred utilizing the combined sequence datasets. A: C1; B: C25. MEG: *P. megaphyllum*. Numbers along branches are bootstrap values

低, 为20%, 仅可成功鉴别3个物种。

33组组合序列基于距离法的物种鉴定分析结果显示, C0、C1和C25的物种鉴定分辨率最高, 均为73.33%, 其中, C0和C1均可鉴别除卷叶黄精、玉竹、轮叶黄精和湖北黄精之外的其余11个物种, 与建树法分析结果一致; C25可鉴别除卷叶黄精、玉竹、轮叶黄精、多花黄精之外的其余11个物种。C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C10、C12、C16、C17、C19、C23、C29和C32的分辨率次之, 均为66.67%, 可成功鉴定10个物种; C9、C11、C13、C14、C15、C18、C20、C21、C22、C24、C26、C27、C30和C31的物种鉴定分辨率均为60%, 可成功鉴定9个物种; C28的分辨率最低, 为46.67%, 可有效鉴别7个物种。

讨论

引物通用性是评价物种鉴定分子标记的一个重要指标^[15,16]。本研究对黄精属植物叶绿体全基因组14个种间高变区设计引物, 通过PCR扩增、测序及分子鉴定分析, 综合评估其对黄精属药用植物种间鉴定效率。结果显示, 除N18 (*trnT-trnL*) 的PCR扩增成功率相对较低(65.06%)之外, 其余13对引物的PCR扩增和测序成功率分别为92.17%~100%和99.35%~100%, 其中M1 (*trnL-ccsA*)、M17 (*ycf3*)、M18 (*atpF*)、N15 (*rps11-rpl36-infA*)、M2 (*ccsA-ndhD*) 和N17 (*trnK-matK*) 的PCR扩增和测序成功率均为100%。说明除*trnT-trnL*外, 其余13条序列的引物在黄精属植物中均具有良好的通用性。

Cong等^[31]对中药材黄精基原物种的分子鉴定分

析结果指出叶绿体基因间区序列*rpl20-rps12*可以区分黄精、多花黄精、滇黄精, 但其是否可以有效鉴别黄精属其他物种, 还有待进一步研究。本研究对包括中药材黄精3个基原物种在内的黄精属15个药用物种的分子鉴定分析结果显示, *trnT-trnL*序列独立分析能鉴别包括黄精、多花黄精、滇黄精在内的8个物种; *atpF*能鉴别包括黄精、多花黄精在内的8个物种; *trnF-ndhJ*及*trnK-matK*序列独立分析均能鉴定包括黄精、滇黄精在内的8个物种; 组合序列C0、C1、C2、C3能鉴定包括黄精、多花黄精、滇黄精在内的11个物种。这些分子标记序列及其组合将为中药材黄精基原物种及其混伪品的准确鉴别提供理论依据。

Yan等^[32]对黄精属药用植物叶绿体全基因组序列变异分析结果指出, *trnK-matK*、*trnS*、*trnT-psbD*、*psaJ-rpl33*、*rpl32-trnL*和*ndhG-ndhI*等6条序列均呈现出较高的种间变异, 其中, *psaJ-rpl33*能够有效区分湖北黄精与黄精属其他物种, 可以作为黄精属种间鉴定的分子标记。Long等^[25]对黄精属7个药用物种23份样品的分子鉴定分析结果指出, *trnK-matK*序列的种间鉴定效率较高, 能够有效区分黄精、滇黄精、玉竹、点花黄精*P. punctatum* Royle ex Kunth和湖北黄精, 可作为黄精属药用植物鉴定的DNA条形码。本研究对黄精属15个药用物种来自32个居群共166个代表个体的分子鉴定分析结果表明, *psaJ-rpl33*序列独立分析能够有效鉴别黄精、距药黄精、细根茎黄精、热河黄精、垂叶黄精和二苞黄精6个物种(建树法)或黄精、距药黄精、细根茎黄精、热河黄精、垂叶黄精、二苞黄精和大苞黄精7个物种(距离法); *trnK-matK*独立分析可有效鉴别黄

精、距药黄精和长梗黄精 3 个物种(建树法)或黄精、距药黄精、长梗黄精、垂叶黄精、细根茎黄精、大苞黄精、二苞黄精和滇黄精 8 个物种(距离法)。因此,支持将 *psaJ-rpl33* 和 *trnK-matK* 序列作为黄精属药用植物种间区分鉴别的有效分子标记。

Wang 等^[33]对黄精属植物叶绿体全基因组比较分析指出 *rps16-trnQ*、*trnT-trnL* 等 8 条基因间区序列具有较高的种间变异,可作为黄精属植物种间鉴定的潜在分子标记。本研究分析结果亦表明 *rps16-trnQ* 和 *trnT-trnL* 序列均含有较多的变异位点(31 个,占比 4.17% 和 45 个,占比 6.80%)及简约信息位点(28 个,占比 3.76% 和 27 个,占比 4.08%),两者独立分析基于建树法的物种鉴定分辨率均为 33.33%,基于距离法的分辨率分别为 60% 和 46.67%。其中, *rps16-trnQ* 独立分析可有效鉴别距药黄精、细根茎黄精、热河黄精、垂叶黄精和长梗黄精 5 个物种(建树法)或垂叶黄精、细根茎黄精、大苞黄精、距药黄精、二苞黄精、五叶黄精、热河黄精、长梗黄精和湖北黄精 9 个物种(距离法); *trnT-trnL* 可鉴别黄精、热河黄精、滇黄精、二苞黄精和多花黄精 5 个物种(建树法)或垂叶黄精、大苞黄精、二苞黄精、五叶黄精、滇黄精、热河黄精和黄精 7 个物种(距离法)。进一步支持将 *rps16-trnQ*、*trnT-trnL* 作为黄精属药用植物种间鉴定的有效分子标记这一结论^[33]。然而,由于 *trnT-trnL* 的引物 PCR 扩增成功率相对较低,有效序列得率仅为 59.04%,因而最终用于分子鉴定分析的个体数相对较少。在后续研究中,还需进一步优化 PCR 反应条件或者设计通用性更高的引物,以提高 PCR 扩增成功率和有效序列得率,并在此基础上进一步评估其物种鉴定分辨率。

此外,序列 *atpF*、*trnF-ndhJ* 的 PCR 扩增成功率分别为 100% 和 99.4%,测序成功率均为 100%。距离法分析结果显示, *atpF*、*trnF-ndhJ* 均具有相对较高的物种鉴定分辨率,其中, *atpF* 独立分析可有效鉴别垂叶黄精、细根茎黄精、大苞黄精、距药黄精、二苞黄精、五叶黄精、黄精和多花黄精 8 个物种, *trnF-ndhJ* 可鉴别垂叶黄精、细根茎黄精、大苞黄精、距药黄精、二苞黄精、滇黄精、热河黄精、黄精 8 个物种。说明 *atpF*、*trnF-ndhJ* 亦可作为黄精属药用植物种间鉴定的有效分子标记序列。

组合序列 C0、C1、C2 和 C3 基于建树法及 C0、C1 和 C25 基于距离法分析的物种鉴定成功率均为最高,达 73.33%,均可同时有效鉴别 11 个物种。同时, C2 和 C3 基于距离法的物种鉴定分辨率亦相对较高,均为 66.7%,可成功鉴别 10 个物种; C25 基于建树法的物种鉴定分辨率为 60%,可成功鉴别 9 个物种。说明多序列联合包含更多的物种演化信息位点,能够有效提高

物种鉴定分辨率。因此,对于未知物种样品,若单一序列鉴定分辨率不足,可考虑多序列联合分析。此外,组合序列 C0、C1、C2 和 C3 依次分别包含 14、13 和 12 条候选分子标记,组合序列总长度分别为 8 025、7 363、6 788 和 6 976 bp,而 C25 仅包含 *psaJ-rpl33*、*rps16-trnQ*、*trnF-ndhJ*、*trnK-matK* 和 *atpF* 共 5 条序列,组合序列总长度为 3 234 bp,且具有最小的种内最大遗传距离,同时其种间、种内遗传距离重叠程度最低。因此,本研究推荐将组合序列 C25 (即 *psaJ-rpl33+rps16-trnQ+trnF-ndhJ+trnK-matK+atpF*) 作为黄精属药用植物种间鉴定的特异性高分辨率分子标记组合。

由于性状较为相似,湖北黄精、卷叶黄精等黄精属多个物种的根状茎常作为黄精入药使用^[34]。湖北黄精在形态上介于黄精和卷叶黄精之间,以小花较多、花小、花梗基部具有约与小花等长的膜质苞片而与卷叶黄精相区别,而湖北黄精与黄精的主要区别在于花较小、花柱较短、根状茎呈连珠状或姜状。然而,这 3 个物种在地理分布上广泛重叠,同时存在形态过渡类型^[35],导致其种间区分鉴定存在较多问题。本研究结果显示,14 组候选分子标记序列中, *atpF*、*ccsA-ndhD*、*trnF-ndhJ*、*psaJ-rpl33*、*rps11-rpl36-infA*、*trnK-matK* 和 *trnT-trnL* 以及组合序列 C0、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23、C24、C25、C26 和 C31 基于建树法和距离法均能有效将黄精与同属其他物种区别;同时, *rps16-trnQ* 及组合序列 C25、C27、C29、C30、C31、C32 基于距离法均可将湖北黄精与同属其他物种区分鉴别。此外,Floden 等^[36]、Xia 等^[37]及 Wang 等^[27]等基于叶绿体全基因组序列对黄精属的系统发育及分子鉴定相关研究曾指出卷叶黄精、轮叶黄精、多花黄精和玉竹等多个物种均为非单系种,这些物种的地理分布范围相对较广,种下形态变异丰富,且可能存在杂交等物种形成过程^[24,36],后续研究尚需进一步结合形态性状、地理分布、核基因序列等多方面证据综合探讨其物种界定问题。

作者贡献: 共同第一作者陈锦豪和程文萍负责实验、数据分析及论文初稿撰写;通讯作者张明英负责实验设计、数据分析和论文指导;高静、李依民、陈莹参与实验及数据分析;张岗参与实验设计及论文指导;颜永刚参与实验材料采集。所有作者参与论文修改。

利益冲突: 本文所有的作者之间不存在利益冲突。

References

- [1] Chen XQ, Tamura MN. Liliaceae in Flora of China: Vol 24 [M]. Beijing/Saint Louis: Science Press/Missouri Botanical Garden

- Press, 2000: 225-235.
- [2] Zhang SR. *Polygonatum* Mill. in Medicinal Flora of China: Vol 11 (中国药用植物志: 第十一卷) [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2014: 288-289.
- [3] Zhao X, Li J. Chemical constituents of the genus *Polygonatum* and their role in medicinal treatment [J]. Nat Prod Commun, 2015, 10: 683-688.
- [4] Zhao J, Wang YZ, Yang WZ, et al. Research progress in chemical constituents in plants of *Polygonatum* and their pharmacological effects [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 1989-2008.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 86-320.
- [6] Zhao P, Zhao CC, Li X, et al. The genus *Polygonatum*: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 214: 274-291.
- [7] Zhang K. Comparative Study on Chemical Components of Plant from *Polygonatum* (黄精属植物化学成分的比较研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2022.
- [8] Zhao P. Studies on the Pharmacophylogenetic Relationships and Polysaccharides in the Genus *Polygonatum* (黄精属药用植物亲缘关系及多糖的研究) [D]. Tianjin: Tianjin University, 2021.
- [9] Wang SQ, Li WN, Zhang XF, et al. Metabolomics study of different germplasm resources for three *Polygonatum* species using UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 826902.
- [10] Lin L, Lin SQ. Cluster analysis of *Polygonatum* medicinal plants [J]. J Chin Med Mater (中药材), 1994, 71: 12-18.
- [11] Meng Y, Nie ZL, Deng T, et al. Phylogenetics and evolution of phylloxy in the Solomon's seal genus *Polygonatum* (Asparagaceae: Polygonateae) [J]. Bot J Linn Soc, 2014, 176: 435-451.
- [12] Zhao LH, Zhou SD, He XJ, et al. A cytotoxic analysis of Chinese *Polygonatum* (Asparagaceae) species [J]. Nord J Bot, 2014, 32: 441-451.
- [13] Yang P, Zhou H, Xin TY, et al. Identification study of DNA barcode sequences in the medicinal plants of *Polygonatum* [J]. World Chin Med (世界中医药), 2015, 10: 1173-1176.
- [14] Chen SL, Pang XH, Luo K, et al. DNA barcoding of biological resources [J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2013, 25: 451-459.
- [15] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106: 12794-12797.
- [16] China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, et al. 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.
- [17] 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.
- [18] Cai YM, Dai JP, Zheng YX, et al. Screening of DNA barcoding sequences for molecular identification of *Uncaria* genus [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 1828-1837.
- [19] Li RJ, Wu LW, Xin TY, et al. Analysis of chloroplast genomes and development of specific DNA barcodes for identifying the original species of *Rhei Radix et Rhizoma* [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2022, 57: 1495-1505.
- [20] Wang YS, Jin YX, Liu KJ, et al. Species identification of *Ligustrum lucidum* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 2940-2948.
- [21] Dong WP, Xu C, Li CH, et al. *Ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants [J]. Sci Rep, 2015, 5: 8348.
- [22] 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 (药理学报), 2015, 50: 783-787.
- [23] Shi NX, Wen GS, Zhao MF. Application of DNA molecular identification technology in *Polygonatum* Mill. [J]. J Plant Genet Resour (植物遗传资源学报), 2021, 22: 1209-1218.
- [24] Wang JJ, Yang YP, Sun H, et al. The biogeographic South-North divide of *Polygonatum* (Asparagaceae Tribe Polygonateae) within Eastern Asia and its recent dispersals in the Northern Hemisphere [J]. PLoS One, 2016, 11: e0166134.
- [25] Long BH, Jang XH, Song R, et al. Application of DNA barcodes in identification and genetic diversity analysis of medicinal plants of the genus *Polygonatum* [J]. Plant Sci J (植物科学学报), 2022, 40: 533-543.
- [26] Zhang MY, Li YM, Cheng WP, et al. Molecular authentication of medicinal *Polygonatum* species utilizing the universal DNA barcode sequences [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2023, 54: 235-244.
- [27] Wang SY, Zhou N, Shi NX, et al. Testing and using complete plastomes for authentication of medicinal *Polygonatum* species (Asparagaceae) [J]. Ind Crops Prod, 2023, 197: 116557.
- [28] Zhao LH, Zhou SD, He XJ. A phylogenetic study of Chinese *Polygonatum* (Polygonateae, Asparagaceae) [J]. Nord J Bot, 2019. DOI: 10.1111/njb.02019.
- [29] Dong WP, Liu J, Yu J, et al. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding [J]. PLoS One, 2012, 7: e35071.
- [30] Li JL, Wang S, Yu J, et al. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2013, 48: 72-78.
- [31] Cong Y, Li L, Zhang JX, et al. Molecular identification of *Polygonati Rhizoma* from different plant origins based on chloroplast DNA sequence [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2021, 23: 2072-2076.
- [32] Yan MX, Dong SJ, Gong QY, et al. Comparative chloroplast genome analysis of four *Polygonatum* species insights into DNA barcoding, evolution, and phylogeny [J]. Sci Rep, 2023, 13: 16495.
- [33] Wang J, Qian J, Jiang Y, et al. Comparative analysis of chloroplast genome and new insights into phylogenetic relationships of

- Polygonatum* and tribe Polygonateae [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 882189.
- [34] Chen SL, Li YL. *Illustrated Handbook of Chinese Medicinal Plants (中国药用植物原色图鉴)* [M]. Vol 4. Fuzhou: Fujian Science & Technology Publishing House, 2016: 1925.
- [35] Editorial Board of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences. *Liliaceae in Flora Reipublicae Sinicae (中国植物志)* [M]. Vol 15. Beijing: Science Press, 1978: 52-80.
- [36] Floden A, Schilling EE. Using phylogenomics to reconstruct phylogenetic relationships within tribe Polygonateae (Asparagaceae), with a special focus on *Polygonatum* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2018, 129: 202-213.
- [37] Xia MQ, Liu Y, Liu JJ, et al. Out of the Himalaya-Hengduan Mountains: phylogenomics, biogeography and diversification of *Polygonatum* Mill. (Asparagaceae) in the Northern Hemisphere [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2022, 169: 107431.