

# 武夷山及周边地区黄精植物 ISSR 分子标记鉴定及 HPLC 指纹图谱研究

杨青<sup>1</sup>, 高华春<sup>2</sup>, 陈红丽<sup>2</sup>, 陈全成<sup>2</sup>, 徐鲜钧<sup>1</sup>

(1.武夷山生物研究所, 福建 武夷山 354300; 2.厦门大学药学院, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 采用 ISSR 分子标记鉴定方法及 HPLC 色谱方法对武夷山及周边地区 5 份黄精植物样本进行 DNA 分子标记鉴定及指纹图谱分析, 并通过聚类分析软件分别探讨其遗传相关聚类图谱。ISSR 分子标记法能较好地 对 5 份黄精植物样本进行区分, HPLC 指纹图谱分析同样表明 5 份黄精样本化学成分存在一定的差别。DNA 分子标记及 HPLC 指纹图谱分析的遗传相关聚类分析结果相似, 表明武夷山及周边地区的野生黄精种质资源存在明显的差别。

**关键词:** 黄精; ISSR 分子标记; HPLC 指纹图谱

Doi: 10.3969/j.issn.1009-7791.2017.01.005

中图分类号: Q949.95

文献标识码: A

文章编号: 1009-7791(2017)01-0025-05

## Identification of *Polygonatum* from Wuyishan and Its Surrounding Areas by ISSR Molecular Markers and Their HPLC Fingerprints

YANG Qing<sup>1</sup>, GAO Hua-chun<sup>2</sup>, CHEN Hong-li<sup>2</sup>, CHEN Quan-cheng<sup>2</sup>, XU Xian-jun<sup>1</sup>

(1.Wuyishan Institute of Biology, Wuyishan 354300, Fujian China; 2.School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian China)

**Abstract:** The purpose of this project was to identify and analyze the genetic relationships of 5 kinds of *Polygonatum* in Wuyishan and its surrounding areas. Using ISSR marker and HPLC molecular identification method for chromatographic methods analysis of DNA markers for identification and fingerprinting of 5 *Polygonatum* samples, the genetic correlation map of *Polygonatum* was studied by cluster analysis software. ISSR molecular marker method could be used to distinguish *Polygonatum* of Wuyishan and its surrounding areas. HPLC fingerprint analysis also showed that there were some differences in the composition of Wuyishan and its surrounding distribution. The results of genetic correlation cluster analysis were similar by ISSR and HPLC. There were obvious differences in the germplasm resources of Wuyishan and its surrounding areas from the DNA molecular markers and HPLC fingerprinting analysis results.

**Key words:** *Polygonatum*; ISSR molecular marker; HPLC fingerprint

中国药典收载的黄精为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum*、黄精 *P. sibiricum* 或多花黄精 *P. cyrtonema* 的干燥根茎, 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾等功效<sup>[1]</sup>。在我国民间, 其他黄精植物如长梗黄精 *P. filipes*、湖北黄精 *P. zanlanscianense* 等十几种也常被当作黄精使用<sup>[2]</sup>。黄精种质资源多样, 依靠形态特征的种质鉴别准确性不高, 因此分子标记技术被应用于黄精属植物的亲缘关系研究<sup>[3-4]</sup>。ISSR(Inter-Simple Sequence Repeats)分子标记方法是以单一引物为主要引物, 以植物基因组为模板, 通

收稿日期: 2016-12-30; 修回日期: 2017-02-16

基金项目: 福建省科技厅自然科学基金重点项目(2013Y0018); 福建省科技厅自然科学基金青年项目(2015J01065)

作者简介: 杨青, 硕士, 高级农艺师, 从事生物多样性及生物资源开发利用研究。E-mail: yq\_wys@126.com

过 PCR 分子克隆技术, 鉴别基因组之间的多态性<sup>[5]</sup>。具有多态性水平高、可重复性好、DNA 用量少、耗时少、成本低等优点, 是从分子水平鉴定植物品种及研究种质资源、遗传多样性的方法<sup>[6]</sup>。通过高效液相色谱技术(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)采集指纹图谱是一种广泛用于中药质量控制的方法<sup>[7]</sup>。高效液相色谱能直观地显示中药的化学信息, 可用于中药化学分类研究<sup>[8]</sup>。本研究通过采集建立 4 个地区 5 份野生黄精属植物样本的 DNA 分子标记图谱和 HPLC 指纹图谱, 并根据图谱特征分析物种间的亲缘关系和种质间差异, 为武夷山及周边地区黄精属药用植物质量控制提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

黄精药材根茎分别采自福建省武夷山、清流县及安徽省黄山、江西省井冈山等地(表 1)。经鉴定为长梗黄精 *Polygonatum filipes* 及多花黄精 *P. cyrtonema*。

主要仪器包括 PCR 仪、凝胶电泳仪、凝胶成像分析系统(Tannon, 上海)、岛津液相色谱仪(LC-20AT, 日本岛津)、旋转蒸发仪、离心机等。

### 1.2 方 法

1.2.1 ISSR DNA 分子标记实验 将采集的 5 个新鲜样品块根组织, 用液氮研磨至细粉存于-80 °C 待用<sup>[9]</sup>。DNA 提取采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根)方法。

设计引物 5 组(表 2)<sup>[10]</sup>。聚合酶链式反应(PCR)体系及程序<sup>[11]</sup>: 25  $\mu$ L 体系, DNA 模板 1  $\mu$ L, 引物 1  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs 2  $\mu$ L, 酶 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.3  $\mu$ L。聚合酶链式反应(PCR)程序<sup>[12]</sup>: 94 °C 预变性 5 min, 随后循环扩增 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 30 次循环; 72 °C 10 min, 16 °C 10 min。

取 PCR 扩增产物 25  $\mu$ L, 用 1%琼脂糖凝胶电泳。缓冲液是 1 $\times$ TAE, 进胶电压 120 V, 电泳电压 85 V, 电泳时间 2 h。取出凝胶, 在 Tannon GIS1000 凝胶电泳成像分析系统上分析<sup>[13]</sup>。

1.2.2 HPLC 指纹图谱分析 样品制备: 黄精样品经 60 °C 烘箱干燥后, 粉碎成 50 目大小, 取 5 g 药材粉末, 加入 50 mL 75%乙醇于 60 °C、40 KHz 超声提取 30 min, 重复提取 2 次, 过滤并合并乙醇提取液, 减压回收乙醇, 得到棕色粘稠状乙醇提取物各约 300 mg。将乙醇提取物用水溶剂稀释后加载于 C18 反相固相萃取柱中, 用水洗至洗脱液无色, 再用 80%乙腈溶液洗脱, 浓缩后取干燥固体 5 mg, 用色谱甲醇配制成 5 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 溶液, 0.2  $\mu$ m 孔径滤膜过滤后备用。

色谱条件: Thermo DBS-HYPERSIL C18 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 以乙腈(A)和水(B)为流动相, 采用二元梯度洗脱, 梯度程序为 5%乙腈 0~5 min、5%~35%乙腈 5~55 min、35%~90%乙腈 55~65 min。流速 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 20  $\mu$ L<sup>[14]</sup>。

1.2.3 统计分析 凝胶成像扫描记录结果, 将琼脂糖凝胶上出现 DNA 片段的记为 1, 不出现记为 0; 液相色谱图中出现指纹峰的标记为 1, 不出现的记为 0。以上数据用 NTSYS 软件体系作聚类分析, 构建遗传相关聚类图谱<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ISSR 分子标记鉴定分析

实验表明, 1 号引物(AT)8G 没有得到扩增谱带, 而其他 4 条引物共扩增得到 34 条可重复的谱带, 其中多态性条带 21 条, 占扩增总数的 61.8%。在 2 号引物的 PCR 扩增产物中, 福建清流县、福建武夷

表 1 供试植物样品

Table 1 Sample of plants

植物名称	来源
长梗黄精 <i>Polygonatum filipes</i>	福建清流
长梗黄精	福建武夷山
长梗黄精	安徽黄山
多花黄精 <i>P. cyrtonema</i>	江西井冈山
多花黄精	福建武夷山

表 2 供试引物

Table 2 Test primer

引物编号	序列
1	(AT)8G
2	(CA)8G
3	(GT)8YG, Y = (C, T)
4	(TC)8RG, R = (A, G)
5	(GAA)8

山和安徽黄山采集的长梗黄精出现的条带较相似, 说明不同产地的长梗黄精有较高的同源性; 武夷山和井冈山采集的多花黄精产生的条带较相似, 也说明两个产地的多花黄精存在较高的同源性(图 1)。但多花黄精与长梗黄精在 2 号引物中条带差异较大, 表明二者之间同源性相对较远。井冈山多花黄精比武夷山多花黄精多一条约 1000 bp 的基因片断, 该谱带可用于区别这两个产地的多花黄精。3 号引物中, 几个不同产地和种类的黄精均出现约 200 bp 的相同谱带。4 号和 5 号引物扩增出的谱带相对较少, 除了黄山长梗黄精有多条谱带外, 其他样品条带单一, 清流县黄精在 4 号引物中没有扩增谱带, 武夷山多花黄精在 5 号引物中没有得到扩增谱带。5 号引物扩增的谱带在武夷山长梗黄精中仅一条较明显, 而黄山长梗黄精的谱带明显多于武夷山长梗黄精, 因此该引物 PCR 扩增谱带可用于这两个地区长梗黄精的判别。

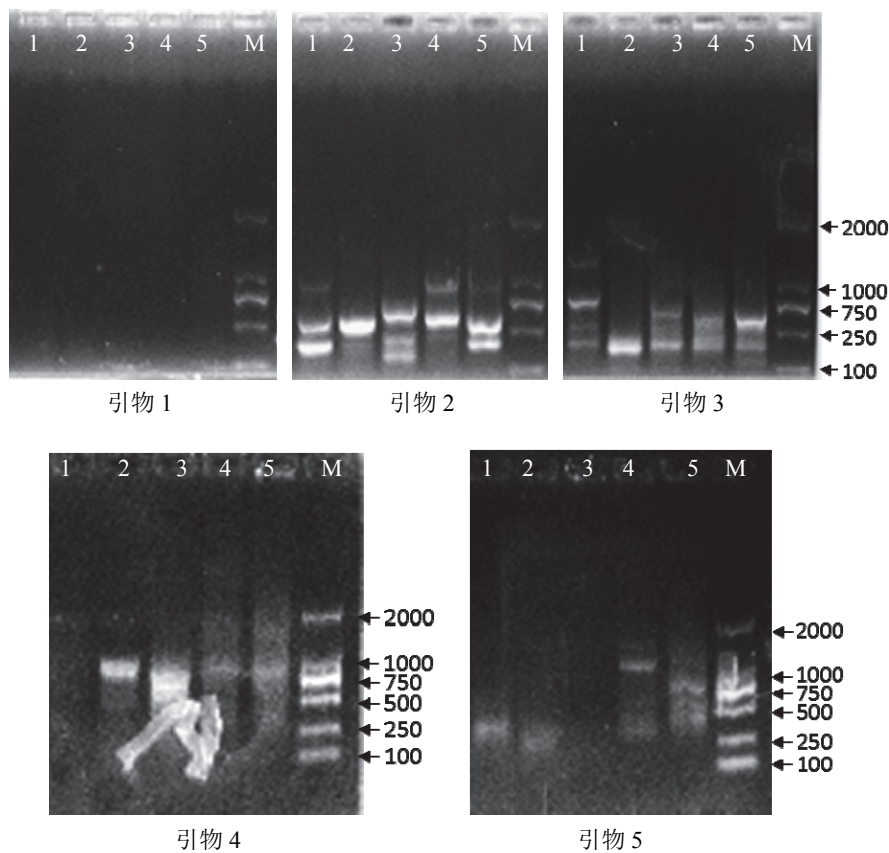


图 1 不同产地黄精的 ISSR 标记

Fig. 1 ISSR molecular markers of *Polygonatum* from different habitats

M. Marker; 1.福建清流长梗黄精; 2.福建武夷山长梗黄精; 3.福建武夷山多花黄精; 4.江西井冈山多花黄精; 5.安徽黄山长梗黄精

## 2.2 HPLC 指纹图谱分析

通过实验比较, 摸索出黄精指纹图谱研究的 HPLC 色谱条件, 建立武夷山及周边地区黄精植物的 HPLC 指纹图谱, 分析 4 个产地 5 份不同黄精植物样品的成分差异。福建清流县的长梗黄精 HPLC 指纹图谱中共观察到 16 个指纹峰; 福建武夷山长梗黄精的 HPLC 指纹图谱中观察到 20 个指纹峰; 安徽黄山长梗黄精的 HPLC 指纹图谱中有 25 个指纹峰; 福建武夷山多花黄精的 HPLC 指纹图谱中有 17 个指纹峰; 江西井冈山多花黄精的 HPLC 指纹图谱中观察到 12 个指纹峰(图 2)。比较 5 份不同黄精植物样品的指纹图谱发现, 有 3 个指纹峰为 5 份黄精样品的共有峰; 从图 2 还可明显看出, 不同产地的长梗黄精存在较多的共有指纹峰, 而多花黄精的指纹图谱中存在多个长梗黄精中没有出现的指纹峰。

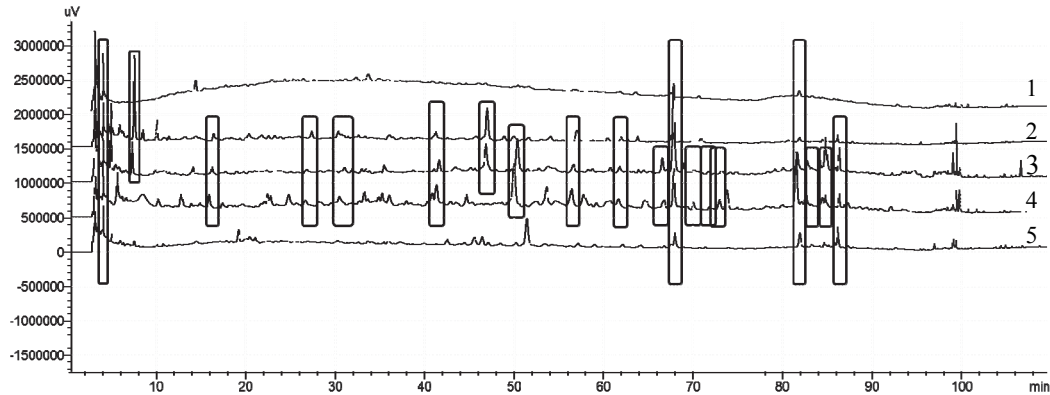


图 2 不同产地黄精指纹图谱对比  
 Fig. 2 Fingerprint comparison of *Polygonatum* from different areas

1.江西井冈山多花黄精; 2.福建清流长梗黄精; 3.福建武夷山长梗黄精; 4.安徽黄山长梗黄精; 5.福建武夷山多花黄精

### 2.3 聚类分析

采用 NTSYSpc 软件对 5 份样品进行聚类分析, 相关性系数为  $r=0.833$ , 聚类结果较好(图 3)。其中以武夷山长梗黄精与黄山长梗黄精关系最近, 长梗黄精与多花黄精关系相对较远。以上分析表明, ISSR 分子标记法能较好地地对武夷山及周边分布的黄精进行区分。

进一步采用 NTSYSpc 软件对 5 份样品的 HPLC 指纹图谱化学成分特征进行聚类分析, 聚类结果与 ISSR 分子标记的聚类分析相似(图 4)。其中武夷山长梗黄精与黄山长梗黄精的指纹峰较接近, 它们与清流县产的长梗黄精指纹峰存在一定的差别, 而两份不同产地的多花黄精指纹峰也较接近, 长梗黄精与多花黄精之间的指纹峰差别更为明显。

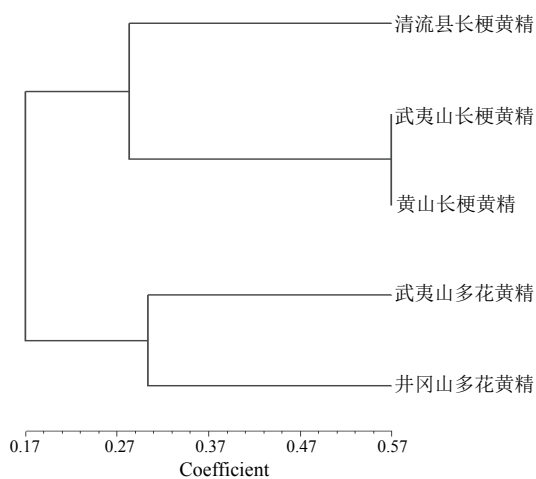


图 3 不同产地黄精的 ISSR 聚类分析  
 Fig. 3 ISSR cluster analysis of *Polygonatum* from different areas

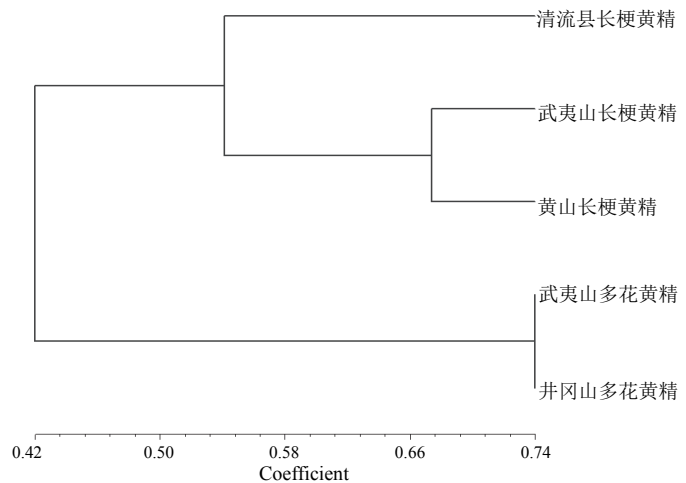


图 4 不同产地黄精的 HPLC 指纹峰聚类分析图谱  
 Fig. 4 HPLC fingerprint peak cluster analysis of *Polygonatum* from different areas

## 3 结论

本研究分别对武夷山及周边地区采集的 5 份野生黄精样品进行 DNA 分子标记及 HPLC 指纹图谱分析, 并通过聚类分析探讨其亲缘关系。实验表明, DNA 分子标记和植物化学成分的 HPLC 指纹图谱技术对 5 份黄精植物样品的亲缘关系分析结果一致。

多花黄精与长梗黄精同源性相对较远;相对于种间的同源性,不同产地的同种黄精的同源性更高,武夷山和井冈山的多花黄精存在较高的同源性,武夷山与黄山的长梗黄精也有较高的同源性。但清流采集的长梗黄精与武夷山、黄山的长梗黄精同源性相对较远,尽管在地理上清流与武夷山更近。实地野外调查也发现,清流长梗黄精与周边地区(如建宁)采集的长梗黄精在形态上有较大的区别,甚至清流县内不同地区采集的长梗黄精形态差异较大,说明清流长梗黄精可能与周边其他地区的黄精植物种质有一定差异。

### 参考文献:

- [1] 中国药典委员会主编. 黄精,中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 307.
- [2] Tamura M N, Schwarzbach A E, Kruse S, Reski R. Biosystemic studies on the genus *Polygonatum*(Convallariaceae)IV. molecular phylogenetic analysis based on the restriction site mapping of the chloroplast gene *trnK*[J]. Feddes Repertorium, 1997,108: 159—168.
- [3] 吴世安,吕海亮,杨继,饶广远,尤瑞麟,葛颂,钟扬. 叶绿体 DNA 片段的 RFLP 分析在黄精族系统学研究中的应用[J]. 植物分类学报, 2000,38(2): 97—110.
- [4] 周晔,王润玲,唐铖,安适之,姚智. ISSR 法鉴定中药黄精与卷叶黄精[J]. 天津医科大学学报, 2006,12(2): 178—180.
- [5] 何正文,刘运生,陈立华,曹美鸿,夏家辉. 正交设计直观分析法优化条件(PCR)[J]. 湖南医科大学学报, 1998,23(4): 403—404.
- [6] 李房英,黄彦晶,吴少华. 三角梅 ISSR 体系的建立与优化[J]. 生物技术通报, 2010(7): 142—145.
- [7] 周守标,张小平. 安徽省黄精属(*Polygonatum*)植物的分支分析[J]. 广西植物, 2000,20(4): 329—331.
- [8] 林萍,张含国,谢运海. 正交设计落叶松 ISSR-PCR 反应体系[J]. 生物技术, 2005,15(5): 34—36.
- [9] 胡甦,王永清,陶炼. 三角紫叶酢浆草 ISSR 体系的建立与优化[J]. 草业学报, 2011,20(5): 142—150.
- [10] Monika S, Jakub S, Kornelia P. Comparison of three *Polygonatum* species from Poland based on DNA markers[J]. Annales Botanici Fennici, 2006,43: 379—388.
- [11] 张红梅,邵元华,龙甜甜,项艳,王进,汤锋. 多花黄精 ISSR 反应体系的建立及正交优化设计[J]. 安徽农业大学学报, 2012,39(3): 412—416.
- [12] 赵欣,刘晓蕾,兰晓继,刘峰,梁宗锁. 黄精的高效液相色谱指纹图谱[J]. 西北农业学报, 2011,20(2): 114—119.
- [13] 焦劼,陈黎明,孙瑞泽,刘峰,马存德,梁宗锁. 不同产地黄精主要化学成分比较及主成分分析[J]. 中药材, 2016,39(3): 519—522.
- [14] 侯小平,何新新,苏薇薇. 中药指纹图谱质量控制技术[J]. 中药材, 2001,24(5): 370.
- [15] 张文生,叶正良,岳洪水,宋晓涛. 丹参药材指纹图谱研究[J]. 中药材, 2001,24(7): 478.