

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.005

王洁, 杨旭, 杨志玲. 不同产区厚朴 nrDNA ITS 序列分析及亲缘关系鉴定[J]. 广西植物, 2013, 33(1): 35–41

Wang J, Yang X, Yang ZL. nrDNA ITS sequences analysis and genetic relationship identification of *Magnolia officinalis* from different geographical regions[J]. *Guihaia*, 2013, 33(1): 35–41

不同产区厚朴 nrDNA ITS 序列分析及亲缘关系鉴定

王洁, 杨旭, 杨志玲*

(中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 以陕西、四川、浙江、重庆、福建、广西主产区的 11 个种源厚朴为材料, 采用 PCR 直接测序法, 测定不同产区厚朴的核糖体 DNA ITS 区序列, 并结合 GeneBank 中相关植物的 ITS 序列(以同属近缘物种辛夷为外类群), 应用 Kimura-2 遗传距离与 NJ 系统树分析法对不同产区厚朴的亲缘关系进行分析。结果表明: 11 个产区厚朴的 ITS 全序列长度介于 593~600 bp, 其中, ITS1 长度为 214~217 bp, G+C 含量为 54.42%~55.35%, ITS2 长度为 215~219 bp, G+C 含量为 59.82%~60.95%; ITS 序列共有 36 个变异位点, 均出现在 ITS1(7 个)和 ITS2(29 个)序列中, 虽然位点变异与部分叶形变化出现吻合, 但无必然联系; 序列间遗传分化距离为 0.000~0.02792, 11 个产区厚朴构成 3 个分支, 显示出产区间厚朴的亲缘关系, 其中陕西洋县(SXYX)、陕西西乡(SXXX)、福建武夷山(FJWYS)及四川彭州(SCPZ)四个产区 ITS 序列完全一致。nrDNA ITS 序列分析可作为厚朴不同产区亲缘关系鉴定的手段。

关键词: nrDNA ITS 序列; 厚朴; 系统聚类; 亲缘关系

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)01-0035-07

NrDNA ITS sequences analysis and genetic relationship identification of *Magnolia officinalis* from different geographical regions

WANG Jie, YANG Xu, YANG Zhi-Ling*

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China)

Abstract: *Magnolia officinalis* of 11 main locality of growth (such as Shanxi, Sichuan, Zhejiang, Chongqing, Fujian and Guangxi and so on) were used in this paper to find the divergence of nrDNA ITS (internal transcribed spacer) sequences for *M. officinalis* distributed in different areas and to provide references for the identification of the genetic relationship between different geographical regions. Their ITS sequences with direct sequencing were determined and their relationship was analyzed using Kimura-2 genetic distance and NJ (neighbor-joining) phylogenetic tree. Meanwhile, *M. liliiflora* was used as the out-group. The results showed that the whole length of ITS sequences of *M. officinalis* was 593–600 bp, in which the length of ITS1 and ITS2 were 214–217 bp and 215–219 bp, respectively. The contents of G+C were 54.42%–55.35% and 59.82%–60.95%, respectively. The length of 5.8S was 164 bp. A total of 36 variable sites (ITS1, 7; ITS2, 29) were examined in ITS sequences, and 5.8S sequence was highly conserved. The sites of variation consistent with changes of partial leaf shape, but they had not necessary linkage.

* 收稿日期: 2012-05-31 修回日期: 2012-07-02

基金项目: 国家科技部公益性林业专项(200704022)

作者简介: 王洁(1986-), 女, 山东桓台人, 硕士, 主要从事药用植物, (E-mail) wo153215@126.com。

* 通讯作者: 杨志玲, 博士, (E-mail) zlyang0002@126.com。

The genetic differentiation distance between sequences ranged from 0.000 to 0.02792. *M. officinalis* of 11 main producing regions constituted three branches, which indicated the genetic relationship of *M. officinalis* between different producing areas, in which, Yangxian(SXYX), Xixiang(SXXX), Wuyishan(FJWYS) and Pengzhou(SCPZ) ITS sequences were the same. Therefore, nrDNA ITS sequence analysis could be applied to the identification of genetic relationship for *M. officinalis* in different producing areas.

Key words: nrDNA ITS sequences; *Magnolia officinalis*; hierarchical clustering; genetic relationship

厚朴(*Magnolia officinalis*)属木兰科(Magnoliaceae)木兰属(*Magnolia*)落叶乔木,为国家二级濒危保护植物(傅立国,1991)。其树皮、根皮、花、果均可入药,具有温中理气,燥湿健脾,消痰化食之功效(Forrest,1995),是我国著名中药材。以往,厚朴药材多来源于野生资源,受其濒危现状的影响,目前所用厚朴药材几乎都来源于栽培(黄文华等,2005)。栽培厚朴不但缓解了厚朴药材匮乏局面,也为其现代化生产提供了来源保障,从根本上促进了厚朴资源的持续利用。随着中药生产体系的建立和 GAP 认证的进行,栽培厚朴的现实问题亦凸显,如盲目引种、种源来源不明等,但却少此类问题的研究报道。对栽培厚朴来源及引种关系进行鉴定和区分,已成为现在亟待解决的问题。

核糖体 DNA 内部转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)序列进化较快,且与植物生活型成相关性,ITS 标记技术从诞生之初就备受人们的关注和推崇(Ainounce *et al.*,1997),在植物资源鉴定(Yang *et al.*,2007;林珊等,2007)、系统发育(Yamaji *et al.*,2007)、遗传多样性检测(Baraket *et al.*,2009)等研究领域发挥了重要作用。近年来,已广泛用于种间或种内遗传多样性和系统发育关系分析,如严寒静等(2008)便测定了 10 个种源何首乌(*Fallopia multiflor*)的核糖体 DNA ITS 区序列,结果支持将田阳何首乌作为何首乌的一个变种——棱枝何首乌;王晓玲等(2008)对海南 7 个主要普通野生稻(*Oryza rufipogon*)核糖体基因(nrDNA)的内转录间隔区(ITS)全序列信息进行比较分析,为鉴别不同居群的普通野生稻提供了分子依据;林珊等(2007)则通过分析不同来源莲(*Nelumbo nucifer*)的 ITS 序列,为莲的分子鉴别提供依据。而对于厚朴却少此类问题的研究报道。郭宝林等(2000)和苏应娟等(2002)曾分别对厚朴的道地性及伪品、混淆品进行了鉴定分析,但均未涉及产区间(或种源间)厚朴差异鉴别,也未涉及厚朴 ITS 序列分析。本研究对不同产区的 11 个厚朴材料进行 nrDNA ITS 序列测定与分析,从分子水平比较不同

产区厚朴的差异,为产区间厚朴的亲缘关系及种质资源道地性的鉴定提供相关参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

用于厚朴 ITS 序列分析的 11 组样品来自四川、陕西和浙江等 6 省、直辖市主要产区(表 1)栽培种群。于 2011 年 5~6 月,从树龄 20~40 a,生长状况较一致的厚朴植株上采集,每个种群中分别选择 5 个单株进行采集,保证样本个体间距大于 50 m,以最大限度排除亲缘性。各样品均以新鲜叶片作为材料,采集后立即用硅胶干燥,带回实验室置于-70℃低温冰箱保存备用。凭证标本存于中国林业科学研究院亚热带林业研究所国家林业局重点实验室。

1.2 DNA 的提取

采用改进的 SDS-CTAB 结合法,提取基因组 DNA。利用紫外可见分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度,1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,-4℃保存备用。

1.3 nrDNA ITS 序列扩增及纯化测序

ITS 片段采用整段扩增(包括 ITS1、5.8S、ITS2),扩增引物为 Wendel *et al.*(1995)设计的通用引物 Pa(5' GGAAGTAAAAGTCGTAA-CAAGG-3')和 Pb(5' TCCTCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'),由上海生工生物工程技术有限公司合成。为保证序列的准确性,进行了双向测序。ITS 扩增反应体系为 50 μL,包括 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂,0.2 μmol·L⁻¹ 引物,0.05 U·μL⁻¹ Taq 酶,0.2 mmol·L⁻¹ dNTP,3 ng·μL⁻¹ 模板 DNA,1×Buffer;扩增程序:95℃预变性 5 min,94℃变性 60s,64℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,共 38 个循环,然后 72℃延伸 8 min。PCR 产物经纯化试剂盒(美国 Axygen)纯化后直接用于测序(测序反应由上海生工生物工程技术有限公司完成,测序仪器为 ABI 3730 DNA 测序仪)。

1.4 序列分析

通过序列拼接软件 CExpress 对正反测序序列进行拼接,并手工校对错误碱基;以 Clustal X 软件 (Thompson *et al.*, 1997) 完成拼接后 DNA 序列比对和排序;使用分子软件 Mega (version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007) 分析碱基组成、GC 含量及 DNA 序列差异百分率和转换 (或颠换) 数,并以

Kimura-2 参数计算不同产区厚朴 ITS 序列差异, NJ 法构建系统发生树,系统树各分支的置信度用自举检验法 (bootstrap test) 检验,共进行 1 000 次循环,以评价各分支的系统学意义与可靠性。

以辛夷 (*M. liliiflora*) 为外类群 (GeneBank 注册号: EU593548), 分析和确定厚朴 nr DNA ITS 序列中 ITS1、ITS2 及 5.8S rDNA 范围。每个产地厚

表 1 供试厚朴样品来源及产地特征

Table 1 Characteristics on each location and the samples of *Magnolia officinalis*

样品编号 Code	产地 Location	叶形 Shape of leaf	纬度 Latitude (N)	经度 Longitude (E)	海拔 (m) Altitude	凭证 Voucher
SCDY	四川大邑	凹叶	30°38'	103°34'	567	DY-1
SCPZ	四川彭州	尖叶	30°59'	103°55'	614	PZ-2
CQFJ	重庆奉节	尖叶	31° 01'	109°27'	282	FY-2
GXLS	广西龙胜	凹叶	24°47'	110°00'	338	LS-4
FJWYS	福建武夷山	尖叶	27°45'	118°02'	322	WYS-3
FJPC	福建浦城	中间型	27°54'	118°33'	270	PC-2
ZJSC	浙江遂昌	中间型	28°35'	119°15'	397	SC-1
ZJJN	浙江景宁	凹叶	27°57'	119°33'	315	JN-2
SXXX	陕西西乡	尖叶	32°57'	107° 42'	506	XX-3
SXYX	陕西洋县	尖叶	33°11'	107°36'	466	YX-1
SXCG	陕西城固	中间型	33° 06'	107°22'	568	CG-3

表 2 ITS1 和 ITS2 片段长度及 GC 含量

Table 2 Lengths and GC content of ITS1 and ITS2 sequences

样品编号 Code	ITS1		ITS2	
	Length	GC content (%)	Length	GC content (%)
SCDY	215	54.42	217	59.91
SCPZ	214	55.14	215	60.47
CQFJ	214	55.14	218	60.09
GXLS	215	54.88	215	60.47
FJWYS	214	55.14	215	60.47
FJPC	214	55.14	216	60.65
ZJSC	217	55.30	219	59.82
ZJJN	215	54.88	216	60.65
SXXX	214	55.14	215	60.47
SXYX	214	55.14	215	60.47
SXCG	215	55.35	219	61.19

注: 样品编号同表 1。

Note: Codes of samples are the same to Table 1.

朴样品至少进行 3 次测序,并将 3 次结果进行相互验证。

2 结果与分析

2.1 nrDNA ITS 序列长度及碱基频率

厚朴 nrDNA ITS 全序列长度为 593~600 bp (不考虑 Gap),其中 5.8S rDNA 编码区极为保守,所测 11 个产区样品均无变异位点,片段长度为 164

bp;而 ITS1 和 ITS2 序列表现出产地差异,长度为 214~217 bp 和 215~219 bp。

不同序列中碱基频率及含量见表 2。由表 2 可以看出,不同产地厚朴 ITS1 和 ITS2 碱基含量呈现差别,ITS1 中 GC 含量为 54.42%~55.35%,ITS2 中 GC 含量为 59.82%~60.95%。与之相比,5.8S rDNA 编码区碱基组成无差异,GC 含量均为 46.95%。

2.2 ITS 序列变异位点

对 11 个产区厚朴 ITS 序列进行排列比对 (图 1),Gap 做缺失处理,发现 11 组厚朴样本 ITS 序列共有 36 个变异位点,并出现 A-T、G-A、G-T、G-C 碱基替换和碱基插入等几种变异类型。所有的变异位点和变异类型均发生在 ITS1 和 ITS2 序列。其中,ITS1 序列变异位点为 7 个,简约信息位点 1 个,分别占 ITS1 序列长度的 (排序长度为 219 bp) 3.20%和 0.46%;ITS2 变异位点 29 个,5 个为信息位点,分别占 ITS2 序列长度的 (排序长度为 226 bp) 12.83%和 2.21%。总体来看,ITS2 序列所包含的信息含量明显高于 ITS1 序列。

2.3 不同产区厚朴 ITS 序列异同

统计分析表明,厚朴 ITS 全序列除洋县 (SXYX)、西乡 (SXXX)、武夷山 (FJWYS) 以及彭州 (SCPZ) 四个产区样本完全一致外,其它样本 ITS1

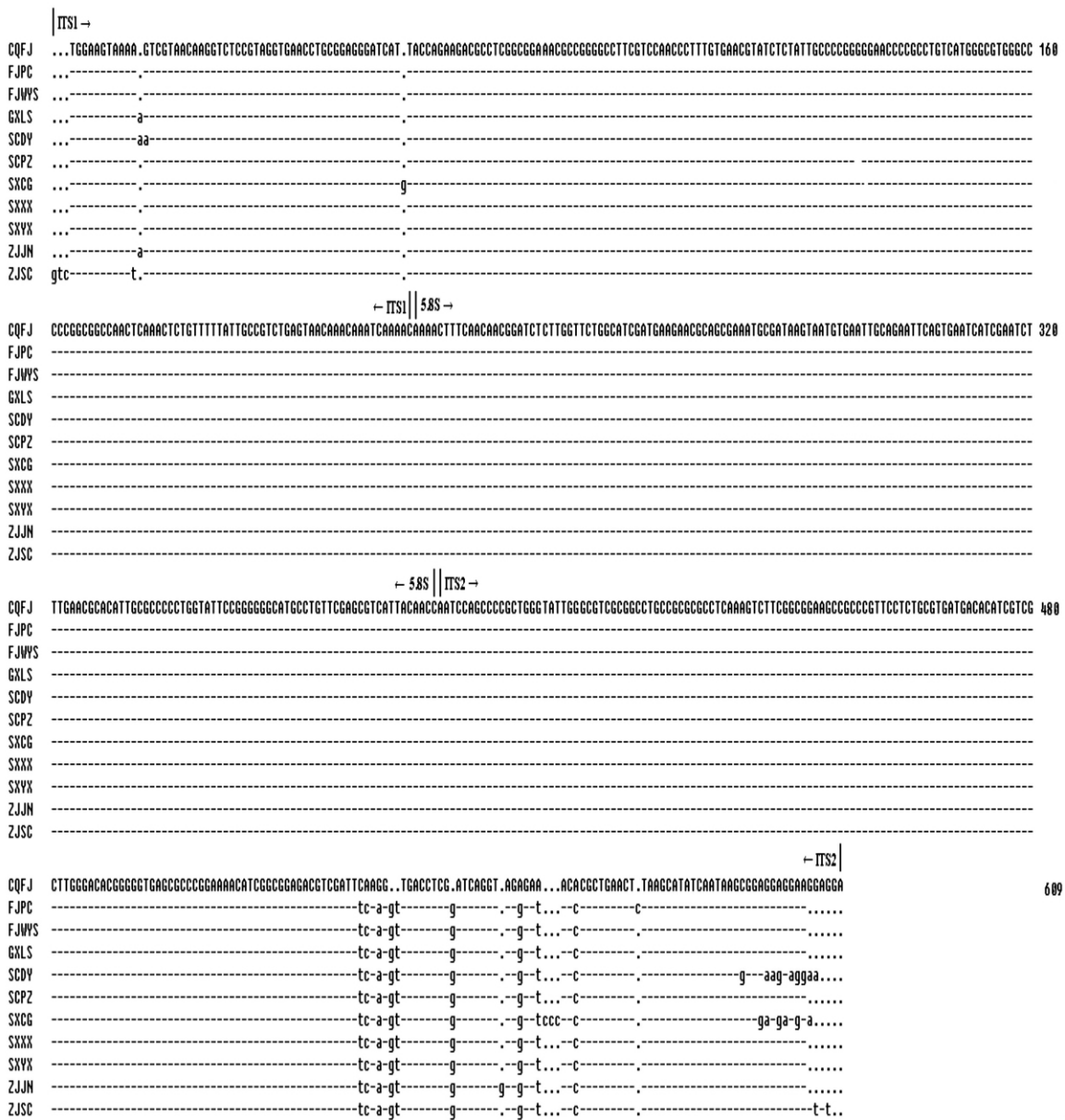


图 1 11 个产区厚朴 ITS 序列排列
 Fig. 1 ITS sequences of 11 *M. officinalis* samples

和 ITS2 序列都存在差别(图 1)。ITS1 序列中,遂昌(ZJSC)厚朴与其它厚朴差异最大,不但出现 GCT 三个碱基的插入(1~3 bp, Gap 做缺失处理,下同),而且还有一个 A-T 碱基(14 bp)的替换;大邑厚朴(SCDY)则有一个 A 碱基(15 bp)的插入和一个 G-A(16 bp)碱基的替换;景宁(ZJJN)和龙胜(GXLS)厚朴均在 15 bp 处存在 1 个 A 碱基的插入,而城固(SXCG)厚朴在 58 bp 处存在一个 G 碱基的插入,其余样本 ITS1 序列无差异。除 A 碱基插入外,其它碱基变异均可作为差异组的识别特征。ITS2 序列中,各厚朴样本差异较大,具体见表 3。

2.4 ITS 序列与叶形的关系

以厚朴采集时叶片的形状作为外观形态变异指标,发现 SXXX, SXYY, FJWYS, SCPZ 四个厚朴样本叶形也完全一致,均为尖叶;而在 15 bp 处具 A 碱基插入的厚朴样本(SCDY, GXLS, ZJJN)叶形也相似,为凹叶。

2.5 不同产地厚朴遗传距离及系统树构建

通过序列对比,利用 MEGA4.0 软件基于 Kimura-2 参数分析不同产地厚朴间的遗传距离(表 4),可看出 SXXX, SXYY, FJWYS, SCPZ 这 4 个厚朴材料间的遗传距离为零,暗示其存在亲缘关系,可

以说这 4 个产地间存在引种关系或来源相同；遂昌厚朴(ZJSC)与其它材料间的遗传距离都较远，介于 2.096%~2.792%；除此之外，剩余材料间的遗传距

离介于 0~2.792%之间，且不表现同一省份材料具有较近遗传距离，也反映出厚朴全国引种栽培的现状。不同产区间厚朴 ITS 序列的相似性变化趋势

表 3 不同产地厚朴 ITS 序列变异
Table 3 Variation of ITS sequences in different *M. officinalis* samples

位点 Locus	样本编号 Code								变异类型/信息位点 Type/parsimony-informative site	
	SCDY	CQFJ	GXLS	FJPC	ZJSC	ZJJN	CP	SXCG		
ITS1	1	—	—	—	—	G	—	—	—	IN/SN
	2	—	—	—	—	T	—	—	—	IN/SN
	3	—	—	—	—	C	—	—	—	IN/SN
	14	A	A	A	A	T	A	A	A	RE/SN
	15	A	—	A	—	—	A	—	—	RE/IL
	16	A	G	G	G	G	G	G	G	RE/SN
	58	—	—	—	—	—	—	—	G	IN/SN
ITS2	531	T	C	T	T	T	T	T	T	RE/SN
	532	C	A	C	C	C	C	C	C	RE/SN
	534	A	G	A	A	A	A	A	A	RE/SN
	536	G	—	G	G	G	G	G	G	MI/SN
	537	T	—	T	T	T	T	T	T	MI/SN
	546	G	—	G	G	G	G	G	G	MI/SN
	554	—	—	—	—	—	G	—	—	IN/SN
	557	G	A	G	G	G	G	G	G	RE/SN
	560	T	A	T	T	T	T	T	T	RE/SN
	561	—	—	—	—	—	—	—	C	IN/SN
	562	—	—	—	—	—	—	—	C	IN/SN
	563	—	—	—	—	—	—	—	C	IN/SN
	566	C	A	C	C	C	C	C	C	RE/SN
	576	—	—	—	C	—	—	—	—	IN/SN
	593	G	C	C	C	C	C	C	C	RE/SN
	596	A	A	A	A	A	A	A	G	RE/SN
	597	A	G	G	G	G	G	G	A	RE/IL
	598	A	G	G	G	G	G	G	G	RE/SN
	599	G	A	A	A	A	A	A	G	RE/IL
	600	G	G	G	G	G	G	G	A	RE/SN
	601	A	G	G	G	G	G	G	G	RE/SN
	602	G	A	A	A	A	A	A	G	RE/IL
	603	G	A	A	A	A	A	A	A	RE/SN
604	A	G	—	—	G	—	—	A	RE, MI/IL	
605	A	G	—	—	T	—	—	—	RE, MI/SN	
606	—	A	—	—	A	—	—	—	IN/IL	
607	—	G	—	—	T	—	—	—	IN/SN	
608	—	G	—	—	—	—	—	—	IN/SN	
609	—	A	—	—	—	—	—	—	IN/SN	

注：CP, ITS 序列完全相同的样本并为一组(包括 SXXX, SXYX, FJWYS, SCPZ); IN, 碱基插入; RE, 碱基替换; MI, 碱基缺失; SN, 单碱基变异, 非信息位点; IL, 简约信息位点。

Note: CP, the identical sequences of ITS for a group (combine SXXX, SXYX, FJWYS, SCPZ); IN, insert base; RE, replace base; MI, missing base; SN, the variation of single base, no information site; IL, parsimony-informative site.

与遗传距离变化趋势相符(表 4)。

基于遗传距离构建 11 组厚朴样本的系统发生树(图 2), 从图 2 可见, 11 个厚朴样本被分为 3 支。其中, 遂昌厚朴(ZJSC)分化最明显, 单独聚为一支

(I); 龙胜(GXLS)和景宁(ZJJN)厚朴先聚在一起(其自展支持率为 76%), 然后与大邑(SCDY)(100%)、城固(SXCG)(100%)厚朴聚在一起组成分支 II; 剩余样本组成分支 III(100%)。从支持率来

表 4 基于 Kimura-2 参数不同产区厚朴 ITS 序列间差异性和相似性 (%)

Table 4 ITS sequence genetic distance and similarity of *M. officinalis* estimated with Kimura-2-parameter methods

编号 No.	SXCG	SCDY	CQFJ	ZJJN	GXLS	SCPZ	FJPC	ZJSC	SXXX	SXCG	SCDY
SXCG		99.891	98.554	99.885	99.893	98.632	98.639	97.408	98.632	98.632	98.632
SCDY	0.109		98.123	99.946	99.988	98.241	98.401	97.442	98.241	98.241	98.241
CQFJ	1.446	1.877		98.129	98.168	99.914	99.909	97.904	99.914	99.914	99.914
ZJJN	0.115	0.054	1.871		99.944	98.169	98.204	97.386	98.169	98.169	98.169
GXLS	0.107	0.012	1.832	0.056		98.206	98.48	97.208	98.206	98.206	98.206
SCPZ	1.368	1.759	0.086	1.831	1.794		99.965	97.703	100.00	100.00	100.00
FJPC	1.361	1.599	0.091	1.796	1.521	0.035		97.601	99.965	99.965	99.965
ZJSC	2.592	2.558	2.096	2.614	2.792	2.297	2.399		97.703	97.703	97.703
FJWYS	1.368	1.759	0.086	1.831	1.794	0.000	0.035	2.297		100.00	100.00
SXXX	1.368	1.759	0.086	1.831	1.794	0.000	0.035	2.297	0.000		100.00
SXYX	1.368	1.759	0.086	1.831	1.794	0.000	0.035	2.297	0.000	0.000	

注: 样品编号同表 1。 Note: Codes of samples are the same to Table 1.

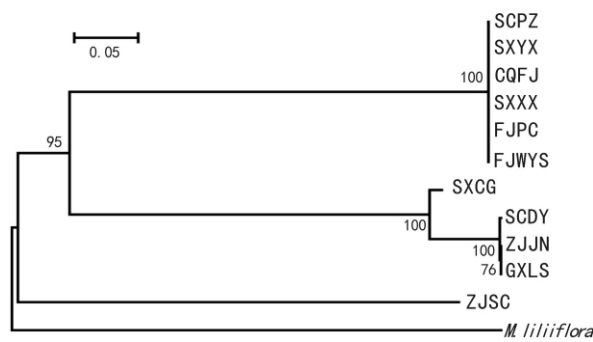


图 2 11 个厚朴样本 ITS 序列的 NJ 系统树

Fig. 2 NJ system tree based on ITS sequences for 11 *M. officinalis* samples

看, II 和 III 均为高度稳定分支, 支持率为 100%。

3 结论与讨论

3.1 nrDNAITS 序列对于不同产区厚朴的鉴别

rDNA 在不同物种间存在丰富变异, 核苷酸序列变化大, 可以提供详尽的遗传学信息 (Schmidt, 2000), 相对于 mtDNA (线粒体 DNA), 其受到细胞核保护机制的保护, 进化过程稳定, 且其 ITS1、ITS2 序列的间隔区 (18S、5.8S、26S rDNA) 极为保守, 能够用通用引物进行扩增及直接测序 (Ainounce & Bayer, 1998; Baraket *et al.*, 2009)。因此, 非常适用于种以上水平的系统发育和分类鉴定研究, 如珠母贝属 (*Pinctada*)、紫苏属 (*Perill*)、冬青属 (*Ilex*) 等 (罗玉明等, 2006; Gottlieb *et al.*, 2005)。但在鉴别种内差异方面, 其应用价值则因种而异 (Ainounce *et al.*, 1997; Francisco-Oetega *et al.*, 1997)。本文中厚朴 nrDNAITS 序列变异位点较多 (ITS1 变异

位点 7 个, ITS2 变异位点 29 个), 并且变异类型多样 (包括 A-T、G-A、G-T、G-C 等碱基替换和碱基插入等), 极大地方便了碱基序列多态信息的判读, 即多数被检测的厚朴样本 ITS 序列相对于其它产区厚朴具有丰富的碱基变异, 并且大部分变异碱基可作为其识别特征。如城固 (SXCG) 厚朴便有 10 个变异位点, 其中 6 个可作为识别特征; 遂昌 (ZJSC) 厚朴也有 6 个变异位点, 并且全部可以作为其识别标志。可见, nrDNAITS 序列分析对于不同产地厚朴的鉴定具有一定指导意义, 可用于其鉴定研究。

3.2 ITS 序列与表型的关系

厚朴具有丰富的遗传变异, 不同地区品种间差异较大, 如根据叶子的形态便可分为凹叶、尖叶及中间型。本研究所采用的厚朴样本也包含这几种叶形, 但各叶形间没有 ITS 序列上的相关性, 且根据 Kimura-2 参数计算的不同产地厚朴间的遗传距离也未因叶形形态而表现较近遗传距离 (即同样表现中间型的遂昌厚朴、城固厚朴、浦城厚朴间具有相对较远的遗传距离)。现在有研究发现, 厚朴叶形的表现具有时间特征, 一年生厚朴并未有叶形上的表现, 而是随生长时间的增长逐渐表现出差异, 并最终成为种源间及家系间的重要生理性状指标 (斯金平等, 2001)。同时也有研究指出叶片性状还受地理位置、生境条件和气候特性等综合环境影响而表现出差异性 (徐德聪等, 2005)。因此, 本文推测, 受不同地区气候条件的限制, 加之所采不同产区的厚朴, 苗木还处在生长期, 部分叶片形态特征还未表现完全, 现在所识别的叶形性状只是其叶形变化过程中的不完全性状表现。这也指出仅依靠材料的叶形判断其归属地及质量存在不合理性, 厚朴种内叶形的变化并不

足以成为其产区分类的主要区别特征,而应从其内部分子结构分析,特别是碱基序列差异入手,合理准确地对不同产区厚朴做出评价。

3.3 ITS 序列的聚类及亲缘关系分析

通过 NJ 系统聚类分析发现,11 个产区被大体聚为 3 类(图 2),但并未表现出地理距离上的相关性,这与产地间厚朴的引种植有关(斯金平等,2001)。以安康为例,其是陕西厚朴的道地产区,包括城固(SXCG)、洋县(SXYX)、西乡(SXXX)厚朴,但从聚类分析发现,城固厚朴明显区别于西乡和洋县厚朴,相反道地产区浦城(FJPC)、四川部分产区厚朴(SCPZ)却与西乡、洋县聚为一类,表明其与安康厚朴间的引种关系,因此,可将城固厚朴从安康厚朴中去除,将其与景宁厚朴(ZJJN)归为一类(即温朴),以纯化安康厚朴道地性来源。同时,浦城厚朴与安康厚朴的聚类表现,也肯定了两者的亲缘关系。至于遂昌厚朴(ZJSC),其亲缘关系上与其它产区厚朴都相距较远,推测其来源偏向野生厚朴。由于厚朴在自然条件下存在生殖障碍,而不同的生长阶段和环境条件对厚朴形态影响很大,因此,完全依据形态特征很难对其亲缘关系做出准确鉴定,而 DNA 分子标记在物种的不同发育阶段、不同的环境条件之间保持均一稳定,现在可被用于厚朴的亲缘关系及种质资源道地性的鉴定。本文特以洋县厚朴为安康厚朴的代表,将其 ITS 序列提交至 GeneBank,获得安康厚朴 ITS 序列注册号(HM049633),为不同产地厚朴的选择及其来源鉴别提供参考佐证。

参考文献:

- 郭宝林,吴勳,斯金平,等. 2000. 厚朴道地性的遗传学证据[J]. 药学实践杂志,18(5):314-316
- 傅立国. 1991. 中国植物红皮书—稀有濒危植物(第 1 册)[M]. 北京:科学出版社:285-287
- 斯金平,童再康. 2001. 厚朴[M]. 北京:中国农业出版社:2-8
- Ainouche ML, Bayer R. 1997. On the origins of the tetraploid *Bromus* species(Section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. *Genome*, 730-743
- Baraket G, Saddoud O, Chatti K, et al. 2009. Sequence analysis of the internal transcribed spacers(ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA(nrDNA) in fig cultivars(*Ficus carica* L.)[J]. *Sci Hort*, 120(1):34-40
- Forrest T. 1995. Two thousand years of eating bark; *Magnolia officinalis* var. *biloba* and *Eucommia ulmoides* in traditional Chinese medicine[J]. *Arnoldia*, 55:12-18
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Hines A, et al. 1997. Molecular evidence for a mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum*(Asteraceae)[J]. *Am J Bot*, 84(11):1595-1613
- Gottlieb AM, Giberti GC, Poggio L. 2005. Molecular analyses of the genus *Ilex*(Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data[J]. *Am J Bot*, 92(2):352-369
- Huang WH(黄文华), Guo BL(郭宝林), Si JP(斯金平). 2005. Studies on HPLC chromatogram of phenolic constituents of cortex *Magnoliae officinalis*(不同种厚朴酚性成分的 HPLC 图谱研究)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 20(3):968-971
- Lin S(林珊), Zhen W(郑伟), Wu JZ(吴锦忠), et al. 2007. clone and sequence analysis of rDNA-ITS of *Nelumbo nucifera* from different geographical origins in China(不同来源莲 rDNA ITS 的 PCR 扩增、克隆及序列分析)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 32(8):671-675
- Luo YM(罗玉明), Zhang WM(张卫明), Ding XY(丁小余), et al. 2006. SNP marker and allele-specific diagnostic PCR for authenticating herbs of *Perilla*(紫苏属药用植物的 rDNA ITS 区 SNP 分子标记与位点特异性 PCR 鉴别)[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 41(9):840-845
- Schmidt GJ, Schilling EE. 2000. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium*(Asteraceae; Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data[J]. *American J Bot*, 87:716-726
- Su YJ(苏应娟), Zhu JM(朱建明), Wang T(王艇), et al. 2002. Fingerprint of arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for *Magnolia officinalis*(厚朴的任意引物 PCR 指纹图谱分析)[J]. *Chin Trad Herb Drug*(中草药), 33(6):545-548
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 24:1596-1599
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. 1997. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acid Res*, 125:4876-4882
- Wang XL(王晓玲), Guo AP(郭安平), Peng YF(彭于发), et al. 2008. Comparison and analysis of ribosomal DNA ITS sequence of common wild rice from different geographical regions in Hainan(海南普通野生稻不同居群 rDNA ITS 区序列的比较分析)[J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 29(4):478-484
- Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(1):280-284
- Xu DC(徐德聪), Lü FD(吕芳德), Su B(粟彬), et al. 2005. Comparison of chlorophyll fluorescence characteristics and leaf characters of pecan in different site conditions(不同立地美国山核桃叶绿素荧光特性及叶性状比较)[J]. *Nonwood For Res*(经济林研究), 23(4):17-20
- Yamaji H, Fukuda T, Yokoyama J, et al. 2007. Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum*(Aristolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences(ITS) of nuclear ribosomal DNA[J]. *Mol Phylog Evol*, 44(2):863-884
- Yang ZY, Chao Z, Huo KK, et al. 2007. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China[J]. *Phytomedicine*, 14(6):416-423