

长泰砂仁生物学性状观测及分子鉴定

周先治, 黄素芳, 陈菁瑛, 唐建阳
(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

摘要:主要研究了长泰砂仁的生物学性状,并对长泰砂仁进行了分子鉴定,明确了长泰砂仁分类定位,为长泰砂仁产地品牌建设奠定基础。通过实地观察测量长泰砂仁的生物学特性结合室内研究分析不同豆蔻属植物的 ITS-5.8S 序列,结果显示,长泰县陈巷镇新吴村和长泰县马洋溪旅游区山重村的砂仁的花、叶、果等主要生物学指标方面无明显差异;长泰县陈巷镇新吴村的砂仁的坐果率、结果率、千粒重和单产均显著高于马洋溪旅游区山重村的砂仁。由 ITS-5.8S 序列构建进化树看,长泰砂仁和阳春砂、绿壳砂聚为一支,支持率达 99%,长泰砂仁与这两种砂仁的同源性均达 99% 以上,结合形态特征和 ITS-5.8S 结果判定长泰砂仁和阳春砂应为同一种。

关键词:长泰砂仁;生物学性状;分子鉴定

Observation on the Biological Characteristics and Molecular Identification of Amomum in Changtai

ZHOU Xian-zhi, HUANG Su-fang, CHEN Jing-ying, TANG Jian-yang
(Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003)

Abstract: This paper focused on the biological characteristics of Amomum in Changtai, carried out its molecular identification, and cleared its taxonomic status, which laid the foundation for the origin brand building of Changtai Fructus Amomi. According to the combining field observations and measurements of the biological characteristics of Changtai Fructus Amomi with the indoor research, this paper analyzed ITS-5.8S sequences of the different Amomum species. It indicated that there is no significant difference of Fructus Amomi flowers, leaves, fruits and other major biological indicators between Xinwu Village, Chenxiang Town and Shanchong Village, Mayangxi tourist area, Changtai County. It also showed that the percentage of fertile fruit, ripening rate, 1000-gain weight and acre yield of Xinwu Village, Chenxiang Town are significantly higher than Shanchong Village of Mayangxi tourist area. According to the Phylogenetic trees, which were constructed based on ITS-5.8S sequences, Changtai Fructus Amomi, Amomum villosum and Amomum villosum Lour. var. xanthioides T. L. Wu et Senjen clustered into a branch with the 99 percent support. The homology of Changtai Fructus Amomi and the other two kinds all reached more than 99 percent. Therefore it is found that Changtai Fructus Amomi and Amomum villosum should be the same based on the morphological characteristics and ITS-5.8S.

Key words: Amomum in Changtai; Biological characteristics; Molecular analyses

砂仁是重要的名贵南药,具有化湿开胃,温脾止泻,理气安胎的功效^[1]。福建省长泰县所产砂仁为广东产阳春砂(*Amomum villosum* Lour.)的变异品种,始载于宋代《开宝本草》,又名阳春砂仁^[2]。长泰县是福建砂仁的主产区,占福建砂仁产量的 70% 以上^[3]。研究发现福建长泰春砂仁含有砂仁的特

收稿日期:2011-04-22 修回日期:2011-12-11
基金项目:福建省科技公益专项(2009R10037-2);福建省科技公益专项(2010R1020-4);福建省发改委项目[闽发改高技(2009)608号];福建省发改委项目[闽发改投资(2009)958号];福建省自然科学基金(2010J01094);福建省科技平台项目(2008Y2003)
作者简介:周先治,助理研究员,主要从事生物资源研究。E-mail:xianzhizhou@126.com
通讯作者:唐建阳,研究员,主要从事生物资源研究。E-mail:tjy836@163.com

征成分,挥发油含量符合 2005 版国家药典规定,主要成分和性状特征相似,可考虑作为正品砂仁入药^[4]。

植物核糖体内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacers, ITS) 进化速率快,承受选择压力小,是最常用、种间区分度最高的植物分子系统调查序列^[5-6]。该片段已成功应用于许多植物不同分类级别的系统发育研究^[7-12]。ITS 区段进化速率快,同源性比对复杂,5.8S rRNA 基因片段非常保守,ITS 近缘性比对不易区分或没有匹配的情况下,可以比对 5.8S rRNA 片段,限定比对范围,因此 ITS-5.8S 序列适用于植物分子鉴定研究^[7]。

长泰砂仁的生物学性状方面的研究较少^[3],作为阳春砂的一个变种,长泰砂仁的分类地位未定。本研究观测比较了两个产地的长泰砂仁的生物学性状,基于 ITS-5.8S 序列构建了不同豆蔻属植物的系统进化树,旨在进一步明确长泰砂仁的生物学性状和分类地位,为长泰砂仁综合开发利用以及产地品牌建设奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的砂仁分别采自福建省漳州市长泰县的陈巷镇新吴村和马洋溪旅游区山重村,试验地砂仁均采用人工授粉。

1.2 试验方法

1.2.1 生物学性状观测 在两地分别随机选取 30 株种植 3 年以上的植株,测量株高、叶长、叶宽,统计单株叶片数;观察叶、花、果实、种子形态;在两地随机调查 5m²,统计每 1m² 内的花序数、每花序花朵数、坐果数和成熟果实数,统计坐果率和结果率,坐果率 = 坐果数 / 花朵数,结实率 = 成熟果实数 / 坐果数;随机抽取 30 粒果实,测量果实长度、宽度,统计种子团中的种子数;测定千粒重,重复 3 次;随机抽取 5m²,测定每 1m² 的果实鲜重,估算两地砂仁的亩产量。

1.2.2 基因组 DNA 提取 参照 Doyle 等^[13] 的 CTAB 法并稍作改进提取砂仁叶片基因组 DNA,具体操作如下:于 1.5ml 离心管中,将 0.1g 叶片用液氮磨成细粉末,加入 600μl 预热的 CTAB 提取缓冲液 (50mmol/L Tris · HCl, pH8.0; 20mmol/L EDTA; 2% CTAB; 1.4mmol/L NaCl, 临用前加入 2% β-巯基乙醇),混匀后置于 65℃ 水浴中温育 45min,期间混匀数次;4℃ 下 12000r/min 离心 20min,将上清转移到新的

1.5ml 离心管;上清加入等体积预冷的氯仿:异戊醇 (24:1),将离心管缓慢颠倒几分钟使管内充分混匀;4℃ 下 12000r/min 离心 10min,将上清小心转移到新的 1.5ml 离心管中;加 2/3 体积预冷的异丙醇,缓慢混匀,置于 -20℃ 下培养 30min;4℃ 下 13000r/min 离心 10min,弃上清,用 1ml 预冷的 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次;加 100 μl ddH₂O,溶解 DNA。

1.2.3 ITS 序列 PCR 扩增测序及序列差异分析

ITS 全序列 (含 5.8S rRNA 基因) 采用引物 ITS5a: 5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3'^[14] 和引物 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'^[15] 扩增获得。PCR 反应体系体积为 50μl: 其中模板 100ng, 2mmol/L dNTP 5μl, 10 × buffer 5μl; Taq 酶 2U; 引物 ITS5a 和 ITS4 各 20pmol。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 1min; 50℃ 退火 1min; 72℃ 延伸 2min; 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒 (杭州博日生物技术有限公司) 纯化后,由上海生工生物工程服务有限公司双向测序,每样品重复 3 次。

1.3 数据和序列分析

采用 SPSS 16.0 软件对砂仁的生物学特征特性进行差异显著性检验。将取自长泰陈巷镇新吴村和马洋溪旅游区山重村的砂仁 ITS-5.8S 序列测序结果进行分析,确定 ITS1、ITS2 和 5.8S rRNA 区,依据来源地分别用 Chenxiang 和 Mayangxi 编号标记,并登陆 GenBank,登录号分别为 JF292430 和 JF292431,依据 ITS-5.8S 序列,运用 Blast 程序在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索。根据同源序列搜索的结果,下载相关植物的 ITS-5.8S 序列,采用 DNASTar 软件进行多序列比对修剪,结果采用 MEGA4.0 中的邻接法 (Neighbor-Joining) 进行系统树的构建,以茴香砂仁 *Etlingera yunnanensis* (AF414468) 作为外源属植物,并用 Bootstrap 对进化树进行 1000 次可信度分析。

2 结果与分析

2.1 长泰砂仁生物学特征性状观测结果

由表 1 可知,产于长泰陈巷镇新吴村和马洋溪旅游区山重村的砂仁的叶、果实、花序、花、种子团及种子等形态特征方面无明显差异;两地砂仁的叶长、叶宽、单株叶片数、果长、果宽、每平方米花序数等生物学指标方面差异不显著;长泰陈巷镇新吴村的砂仁的坐果率、结果率、千粒重和单产均显著高于马洋溪旅游区山重村的砂仁。

表 1 长泰砂仁的生物学性状观测结果
Table 1 Observation on the biological characteristics of Amomum in Changtai

生物学特征特性 Biological characteristics	来源 Source	
	陈巷镇新吴村	马洋溪旅游区山重村
株高(m) Plant height	1.55 ~ 2.48 (2.03 a)	1.24 ~ 2.25 (1.92 a)
叶形态 Leaf morphology	叶互生, 叶片绿色, 叶片窄长圆形或条状披针形, 全缘, 羽状平行脉	叶互生, 叶片绿色, 叶片窄长圆形或条状披针形, 全缘, 羽状平行脉
叶长(cm) Leaf length	17.4 ~ 45.5 (34.6 a)	15.0 ~ 41.5 (34.1 a)
叶宽(cm) Leaf width	2.5 ~ 5.2 (3.9 a)	2.3 ~ 5.2 (3.7 a)
单株叶片数 No. of leaves per plant	15 ~ 31 (23.9 a)	14 ~ 28 (23.4 a)
果实形态 Fruit morphology	棕红色, 长椭圆形或圆形, 果皮米生硬刺状突起	棕红色, 长椭圆形或圆形, 果皮米生硬刺状突起
果长(mm) Fruit length	20.0 ~ 24.5 (22.3 a)	18.5 ~ 22.4 (20.2 a)
果宽(mm) Fruit width	18.0 ~ 20.0 (19.3 a)	18.2 ~ 19.8 (19.1 a)
花序及花形态 Inflorescence and flower morphology	穗状花序成疏松球形, 具 8 ~ 14 朵花, 花萼白色, 先端 3 裂, 锥桶形, 较大花萼的中间有一深黄色着黄褐色斑点的梯形条带, 花粉着生于梯形条带下部, 花冠管细长, 弯曲, 先端 3 裂	穗状花序成疏松球形, 具 8 ~ 12 朵花, 花萼白色, 先端 3 裂, 锥桶形, 较大花萼的中间有一深黄色着黄褐色斑点的梯形条带, 花粉着生于梯形条带下部, 花冠管细长, 弯曲, 先端 3 裂
每平方米花序数 No. of inflorescence per square meter	24.3 a	22.4 a
坐果率(%) Rate of fruit-setting	36.3 a	30.8 b
结果率(%) Ripening rate	22.5 a	17.1 b
种子团及种子 Seed ball and seed	具三钝棱, 中间由白色隔膜隔开, 将种子团分成 3 瓣, 每瓣有种子 14 ~ 24 粒, 种子表面暗褐色, 为不规则多面体, 直径 2.3 ~ 3.5 mm	具三钝棱, 中间由白色隔膜隔开, 将种子团分成 3 瓣, 每瓣有种子 14 ~ 22 粒, 种子表面暗褐色, 为不规则多面体, 直径 2.0 ~ 3.1 mm
千粒重(g) 1000 - grain weight	12.5 a	11.3 b
单产(kg/667m ²) Yield	34.5 a	27.7 b

表中同行不同字母表示经 Fish's LSD 检验差异显著 ($P < 0.05$)
Means followed by the same letter within a line are significantly different as determined by the Fish's LSD test ($P < 0.05$)

2.2 长泰砂仁分子鉴定结果

通过 PCR 扩增, 试验获得了砂仁 Chengxiang 和砂仁 Mayangxi 的 ITS - 5.8S rRNA 序列的全长, 利用 Blast 软件将该片段序列与 GenBank 中收录的 DNA 序列进行比对, 并与相关同属植物构建进化树(图 1)。结果表明, Chenxiang 和 Mayangxi 与 *A. villosum* Kress #01-6978 US (AF478724)、*A. villosum* Xia-735 HITBC (AY352009)、*A. villosum* var. *xanthioides* (AY352011) 聚成一支, 支持率达 99%, Chenxiang 和 Mayangxi 序列同源性达到 100.0%, 上述两序列与 *A. villosum* Kress #01 - 6978 US (AF478724)、*A. villosum* Xia - 735 HITBC (AY352009) 的同源性同为 99.5%, 表明 4 者亲缘关系最近; 与 *A. villosum* var. *xanthioides* (AY352011) 的同源性达 99.3%, 表明 3 者亲缘关系较近。

3 讨论

长泰县陈巷镇新吴村的砂仁与马洋溪旅游区山重村的砂仁的叶、花、果实及种子等形态特征方面无明显差异, 株高差异不显著, 但个体间株高差异较大, 段立胜等^[16]调查发现西双版纳的阳春砂仁的株

高在 1.0 ~ 3.5m, 个体株高差异同样较大。两地砂仁的叶长、叶宽、单株叶片数、果长、果宽、每平方米花序数等生物学指标差异不显著, 从形态特征和生物学指标来看, 两地砂仁应属于同种砂仁。两地砂仁的生物学特征特性与文献中记载的阳春砂^[16-17]极为相似, 初步判定长泰砂仁和阳春砂为同一种。长泰县陈巷镇新吴村的砂仁的坐果率、结实率、千粒重和单产均显著高于长泰县马洋溪旅游区山重村的砂仁, 这与两地的种植管理有极大关系, 由于砂仁叶斑类病害的爆发和砂仁人工授粉成本的上升, 长泰县马洋溪旅游区山重村的砂仁在 2000 - 2009 年疏于管理, 任其自然生长, 导致砂仁的长势弱, 而陈巷镇新吴村的砂仁则管理较好。有研究表明, 阳春砂仁人工授粉比自然授粉的结果率高近 2 倍, 人工授粉砂仁产量比自然授粉高 22.7% ~ 69.4%, 但人工授粉坐果率比自然授粉坐果率低 13.1% ~ 32.1%^[18]。长泰砂仁都是采用人工授粉, 人工授粉对坐果率、结实率和产量影响极大, 通过调查发现, 长泰马洋溪旅游区山重村未加管理的砂仁的自然授粉情况极差, 坐果率低于 5.0%, 因此也不排除人工授粉情况对两地砂仁产量的影响。

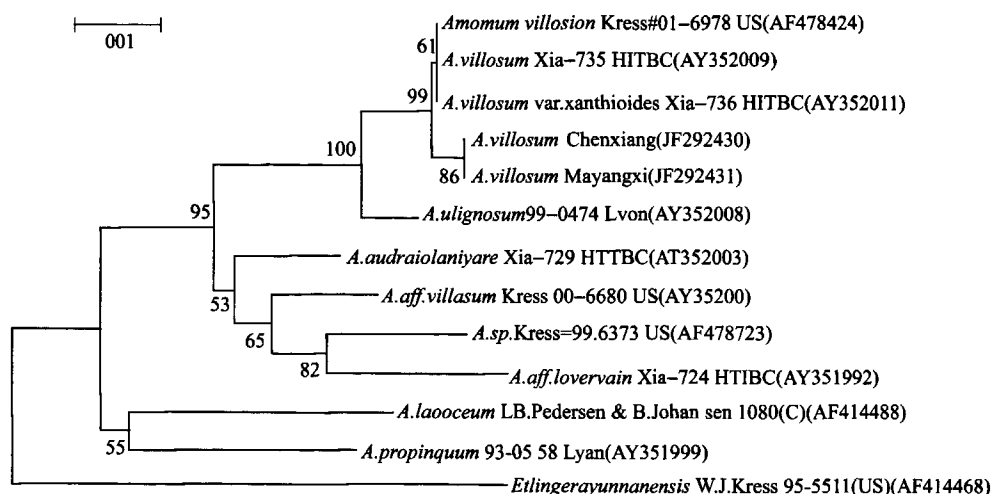


图 1 基于 ITS-5.8S 序列和 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree drawn from Neighbor-Joining analysis based on ITS-5.8S sequence alignment

分支上的数值: Bootstrap 检验的支持百分率 (>50%). The numbers on the tree; Bootstrap values greater than 50%

长泰两地的砂仁的 ITS-5.8S 序列同源性达 100%, 证明两地砂仁为同种砂仁, 长泰砂仁的 ITS-5.8S (JF292430 和 JF292431) 序列与阳春砂仁 *A. villosum* Kress #01-6978 US (AF478724)、*A. villosum* Xia-735 HITBC (AY352009) 和绿壳砂 *A. villosum* var. *xanthioides* (AY352011) 聚为一支, 支持率达 99%, 同源性达 99% 以上, 这与 Xia 等^[8]采用 ITS 序列构建的豆蔻属系统发育树的研究结果一致, 采用 ITS 序列或 ITS-5.8S 序列无法区分阳春砂和绿壳砂, 长泰砂仁与阳春砂或绿壳砂仅在 ITS1 区段和 ITS2 区段存在个别碱基的缺失或替换。程存归等^[19]采用傅里叶变换红外光谱法研究发现, 阳春砂和绿壳砂的红外光谱差别不大。王培训等^[20]采用 RAPD 技术区分阳春砂和其他几种常见的姜科伪充品, 发现阳春砂与绿壳砂存在明显的指纹差异, 通过构建分子系统树, 同样发现阳春砂和绿壳砂的亲缘关系较近。通过 ITS-5.8S 序列构建的系统树无法直接判定长泰砂仁的分类地位, 但据段立胜等^[16]报道阳春砂和绿壳砂的果实颜色存在明显差异, 绿壳砂的果实为绿色, 阳春砂为棕红色, 形态特征结合分子数据分析判定长泰砂仁和阳春砂为同一种即 *Amomum villosum* Lour.。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1248
- [2] 陈卫琳, 陈红. 福建长泰砂仁中乙酸龙脑酯含量测定 [J]. 福建中医学院学报, 2010, 20(5): 57-58
- [3] 林建和. 长泰砂仁的特征特性及丰产栽培技术 [J]. 福建热作科技, 2008, 33(1): 27-28
- [4] 唐建阳, 黄英桢, 陈菁瑛, 等. 福建流通砂仁的质量比较 [J]. 福建农业学报, 2009, 24(4): 323-327
- [5] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102: 8369-8374
- [6] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. Ann Mis Bot Garden, 1995, 82: 247-277
- [7] Kress W J, Prince L M, Williams K J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data [J]. Am J Bot, 2002, 89(11): 1682-1696
- [8] Xia Y M, Kress W J, Prince L M. Phylogenetic analyses of *Amomum* (Alpinioideae: Zingiberaceae) using ITS and *matK* DNA sequence data [J]. Syst Bot, 2004, 29(2): 334-344
- [9] 周先治, 陈晟, 吴宇芬, 等. 基于 ITS 序列探讨西瓜种下分化 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(1): 17-21
- [10] 吴宇芬, 周先治, 陈晟, 等. 基于 ITS 序列探讨南瓜属植物系统发育 [J]. 福建农业学报, 2010, 25(2): 170-175
- [11] 陈志彬, 黄勤楼, 潘伟彬, 等. 狼尾草属牧草 rDNA 的 ITS 序列分析 [J]. 草业学报, 2010, 19(4): 135-141
- [12] 龚汉雨, 刘如亮, 董正伟, 等. 药用野生稻复合体 ITS1 和 ITS2 序列变异及其系统进化分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 442-447
- [13] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15
- [14] Wilsseman V, Ritz C M. The genus *Rosa* (Rosaceae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and atpB-rbcL intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy [J]. Bot J Linne Soc, 2005, 147: 275-290
- [15] Gurushidze M, Mashayekhi S, Blattner F R, et al. Phylogenetic relationships of wild and cultivated species of *Allium* section *Cepa* inferred by nuclear rDNA ITS sequence analysis [J]. Plant Syst Evol, 2007, 269: 259-269
- [16] 段立胜, 张丽霞, 彭建明, 等. 西双版纳阳春砂仁种质资源调查初报 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 627-628
- [17] 陈士林, 林余霖. 中华人民共和国药典中药材及原植物彩色图鉴 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1236
- [18] 何茂金, 胡廷松, 何振兴, 等. 几个砂仁品种的性状比较与栽培 [J]. 广西农业科学, 1992(2): 66-68
- [19] 程存归, 阮永明, 李冰岚. 傅里叶变换红外光谱法应用于中药砂仁真伪鉴别的研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(11): 1355-1358
- [20] 王培训, 黄丰, 周联, 等. 阳春砂与几种常见姜科伪充品的 RAPD 分析 [J]. 中药材, 2000, 23(2): 71-74

长泰砂仁生物学性状观测及分子鉴定

作者:

周先治, 黄素芳, 陈菁瑛, 唐建阳, [ZHOU Xian-zhi](#), [HUANG Su-fang](#), [CHEN Jing-ying](#), [TANG Jian-yang](#)

作者单位:

[福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州, 350003](#)

刊名:

[植物遗传资源学报](#) 

英文刊名:

[Journal of Plant Genetic Resources](#)

年, 卷(期):

2012, 13(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201202026.aspx