

我国不同地区天门冬核 DNA ITS 序列分析

欧立军^{1,2,3}, 张人文³, 谈智文³, 赵婷婷³, 余朝文^{1,2,3}

1. 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南 怀化 418008
2. 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008
3. 怀化学院 生命科学系, 湖南 怀化 418008

摘要: **目的** 研究我国不同地区天门冬核 DNA ITS 序列差异及其与地理位置的关系, 为不同居群天门冬的鉴定和道地产区的确定提供理论依据。**方法** 运用 PCR 法对 25 个地区的 75 个样本 ITS 序列扩增后双向测序, 用软件 DNAMAN 和 MEGA 4 分析测序结果。**结果** 每个地区的 3 个样本的 ITS 序列基本相同, 不同地区样本间的 ITS 全序列存在一定差异, ITS2 片段变异高于 ITS1。贵州产天门冬遗传分化度较大, 变异位点和信息位点较多。ITS 序列构建的系统树表明, 同一个地区的 3 个样本优先聚类, 然后是同省的样本聚类, 位于北纬 24.6°~36.6° 和 22.2°~24.4° 的样本分别聚为 1 大支; 第 1 大支中包括青海、湖南和贵州省的样本, 第 2 大支则包括浙江、广东、云南和广西 4 省的样本。**结论** ITS 序列可鉴定不同产地的天门冬, 贵州省是天门冬药材道地产区之一, 不同地区天门冬的亲缘聚类主要与纬度相关, 与经度关系不大。

关键词: 天门冬; ITS 序列; 分子鉴定; 道地性; 聚类分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1402-05

Nuclear DNA ITS sequence analysis of *Asparagus cochinchinensis* from different geographical regions in China

OU Li-jun^{1,2,3}, ZHANG Ren-wen³, TAN Zhi-wen³, ZHAO Ting-ting³, SHE Chao-wen^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-western Medicinal Plant and Ethnobotany, Huaihua 418008, China
2. Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Huaihua 418008, China
3. Department of Life Science, Huaihua University, Huaihua 418008, China

Abstract: Objective The nuclear DNA ITS sequence variation and its correlation to geographical distribution of *Asparagus cochinchinensis* from different populations in China were studied, the aims were to reveal the difference among different populations and determine the genuineness of *A. cochinchinensis*. **Methods** The ITS fragments of 75 samples from 25 populations were amplified and bidirectional sequenced. And they were analyzed using the software of DNAMAN and MEGA 4. **Results** ITS sequences of three samples from the same areas were almost the same and ITS sequence of 25 populations were different from each other. The variation of ITS2 sequences was bigger than that of ITS1 sequences. ITS sequences of Guizhou Province had bigger genetic differentiation and more variable sites and information sites than other provinces had. Clustering results based ITS sequences showed three samples from the same area firstly clustered and then populations from a province clustered. All populations were divided into two branches based on North latitude of 24.6°—36.6° and 22.2°—24.4°, the first branch included the populations of Qinghai, Hunan, and Guizhou Provinces, the second branch included the populations of Zhejiang, Guangdong, Yunnan and Guangxi Province. **Conclusion** ITS sequences could identify the different populations of *A. cochinchinensis*. Guizhou Province is the place of genuineness of *A. cochinchinensis*. Clustering the different populations of *A. cochinchinensis* primarily relates to the latitude while has little relationship with the longitude.

Key words: *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.; ITS sequences; molecular identification; genuineness; cluster analysis

天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 是百合科天门冬属植物, 主产于贵州、云南、浙江、湖南等省, 已有几千年的药用历史, 在《神农本草经》和《千金方》中均有记载, 是多个民族的常用

药, 有养阴润燥、清肺生津的功效。常用于治疗肺燥干咳、咽干口渴、肠燥便秘等症^[1], 并具有抗菌和抗肿瘤等药理活性, 常被用作滋补品、收敛药使用^[2]。目前对天门冬的研究主要集中在化学成分、

收稿日期: 2010-12-06

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金项目 (09K106); 湖南省科技计划重点项目 (2009FJ2008)

作者简介: 欧立军 (1976—), 男, 湖南长沙人, 博士, 主要研究方向为药用植物遗传与分子生物学。Tel: 15974048762 E-mail: ou9572@126.com

药理药效及临床应用等方面, 多项研究表明天门冬的主要成分为糖类^[3-4]、氨基酸类^[5]、皂苷类^[6]等, 天门冬的临床作用主要表现在治疗乳腺小叶增生^[7]、恶性淋巴瘤^[8]、镇咳、祛痰及平喘等^[9]方面。

高等植物编码核糖体 RNA 的基因是高度重复的串联序列, 其中编码 18S、5.8S、26S 的 rDNA 为 1 个转录单位, 在该转录单位中, ITS (internal transcribed spacer) 是介于 18S 和 5.8S 之间 (ITS1) 以及 5.8S 和 26S 之间 (ITS2) 的非编码转录区, 其转录产物在 rRNA 的加工过程中被切掉。编码 18S、5.8S、26S 的序列为高度保守区, ITS 序列为进化速度较快的中度保守序列, 且各重复单元间具有同步进化的特点。因此, ITS 作为基因标记很快成为在序列水平上探讨系统发育和进化研究的有效手段^[10-12], 但该序列在天门冬的研究中尚未见报道。本研究收集我国 7 个省的 25 个不同地区的天门冬, 通过测定其 DNA 序列, 比较不同地理区域天门冬 DNA 序列的差异, 为天门冬的分子鉴别、道地药材的引种和栽培提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

我国主要产区的不同天门冬 25 个居群, 每个居群 3 个样本, 分布于贵州、湖南和浙江等 7 个省, 按照纬度从高到低进行排列和编号, 所有材料由怀化学院曾汉元教授鉴定, 见表 1。

1.2 方法

采取 CTAB 法进行 DNA 的提取。ITS 引物参考 White 等^[13]方法设计, 采用 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 和 5'-GGAAGGTAAAAGTCAAGG-3', 反应体系包括 10×PCR 缓冲液 5 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 50 mmol/L 引物各 1 L, DNA 40 ng, Taq DNA 聚合酶 0.4 L, 补充双蒸水至 50 L。反应程序为: 95 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 后延伸 10 min。PCR 产物纯化采用生工生物工程 (上海) 有限公司的 DNA 纯化试剂盒, 纯化产物鉴定后双向测序, 重复 3 次。所得序列采用 DNAMAN 和 MEGA.4 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列长度和 GC 分析

75 个样本的 ITS 序列全长为 609~622 bp, 长度变化为 13 bp, GC 量在 56.7%~62.8%; ITS1 和 ITS2 片段长度主要为 249 bp 和 240 bp, ITS2 的 GC

表 1 天门冬来源及地理位置

Table 1 Source and location of *A. cochinchinensis*

居群	来源地	品种	北纬/(°)	东经/(°)
XN	青海西宁	野生	36.567	101.814
YS	青海玉树	野生	31.910	89.450
HZ	浙江湖州	栽培	30.367	119.233
ZH	浙江杭州	栽培	29.183	118.350
YH	贵州沿河	野生	28.211	108.005
HS	湖南衡山	野生	27.284	112.706
XH	湖南新晃	野生	27.067	108.787
QX	贵州黔西	野生	26.902	105.683
WA	贵州瓮安	野生	26.883	107.284
FQ	贵州福泉	野生	26.681	107.516
HX	贵州花溪	野生	26.428	106.675
KL	贵州凯里	野生	26.410	107.683
XI	湖南新宁	野生	26.251	110.301
TD	湖南通道	野生	25.911	109.742
YQ	贵州余庆	野生	25.317	107.283
DS	贵州独山	野生	25.011	108.310
YZ	湖南永州	野生	24.650	111.001
XY	贵州兴义	野生	24.633	104.851
KM	云南昆明	野生	24.383	102.167
QJ	云南曲靖	野生	24.317	102.710
GL	广西桂林	栽培	24.250	109.060
YX	云南玉溪	野生	23.316	101.267
GZ	广东广州	栽培	23.105	113.251
NN	广西南宁	栽培	22.217	107.901
ZS	广东中山	栽培	22.183	113.151

量较高, 几乎都为 65%, 见表 2。序列比对发现, 居群内 3 个样本的 ITS 序列长度完全相同, 仅仅存在个别位点碱基的变化。居群间样本则存在较明显的变异, 可见 ITS 序列能较好地反映不同居群天门冬差别, 是鉴别不同居群天门冬的良好分子标记。

2.2 天门冬变异位点分析

不同天门冬居群的 ITS1 和 ITS2 序列变异位点数目存在差异, ITS1 序列的变异位点数目少于 ITS2 序列的变异位点数目, ITS1 序列平均变异位点数目为 9.64 个, ITS2 序列平均变异位点数目明显高于 ITS1 序列, 达到 14.6 个; ITS 序列变异率最高为瓮安居群和福安居群, 为 5.93%, 湖州和桂林居群为最低, 变异率为均 3.88%, 见表 3。

不同省之间的变异位点数目和变异率同样存在差异, 贵州省的天门冬居群 ITS1 和 ITS2 的变异位点比率分别达到 4.19% 和 6.75%, 高于其他省的天门冬, 见图 1。

2.3 天门冬 ITS 序列信息位点分析

经过序列比对, 不同省的天门冬居群的信息位点存在数量上的差异, ITS1 片段的信息位点少于

表 2 不同居群天门冬的 ITS 长度和 GC 量比较

Table 2 Length and GC content of ITS sequences of *A. cochinchinensis* from different populations

居群	ITS		ITS1		ITS2	
	长度/bp	GC/%	长度/bp	GC/%	长度/bp	GC/%
XN	617	56.7	246	59.4	241	59.8
YS	616	56.7	246	59.4	240	59.8
HZ	619	62.1	249	63.0	240	65.0
ZH	622	61.5	249	61.4	243	65.0
YH	619	62.1	249	63.0	240	65.0
HS	619	62.0	249	63.0	240	64.6
XH	619	62.7	249	64.2	240	65.0
QX	619	62.5	249	63.0	240	65.9
WA	619	62.5	249	63.4	240	65.5
FQ	619	62.1	249	63.0	240	65.0
HX	619	62.1	249	62.6	240	65.5
KL	621	61.5	250	62.0	241	65.1
XI	619	62.1	249	63.4	240	64.6
TD	621	62.7	250	62.8	241	65.1
YQ	619	62.0	249	63.4	240	65.0
DS	619	62.1	249	63.0	240	65.0
YZ	619	61.7	249	63.0	240	64.1
XY	618	62.8	249	64.2	239	65.3
KM	619	62.1	249	63.0	240	65.0
QJ	621	62.3	249	63.8	242	66.1
GL	619	62.1	249	63.0	240	65.0
YX	619	62.1	249	63.0	240	65.0
GZ	622	62.1	249	62.6	243	65.0
NN	609	61.7	239	61.5	240	65.5
ZS	619	62.1	249	63.0	240	65.0

ITS2, ITS2 片段的信息位点都为单核苷酸位点 (Single nucleotide sites, SNP)。贵州省信息位点数较多, ITS1 的 184~186 位点为 T, 其他省居群都为 C, ITS2 片段的 30 位点为 G, 其他省居群都缺失 (云南省居群为 A), 75、83、132、197 和 229 位点分别为 T、C、A、T 和 A, 见表 4。

2.4 基于 ITS 序列的系统树

根据 ITS 序列构建 75 个天门冬样本的系统树发现, 同一居群内的 3 个样本优先聚类, 然后是同省的居群聚类。位于北纬 24.633°~36.567° 和 22.183°~24.383° 的天门冬居群分别聚为 1 大支, 第 1 大支中包括青海、湖南和贵州省的居群, 第 2 大支则包括浙江、广东、云南和广西 4 省的居群, 见图 2。

3 讨论

核糖体 DNA ITS 序列相对保守, 同时进化速率较快, 可以提供较丰富的变异位点, 不仅广泛用于物种间的鉴定, 而且也被用于种内居群间的差异性分析^[14-16]。本实验对天门冬不同地区的分析结果表明, 相同居群的 3 个样本的 ITS 序列几乎不存在差异, 这说明居群内样本的 ITS 序列基本完成了趋同进化; 不同居群的 ITS 序列较保守, 变异为 2.13%, 没有完全相同的 2 个序列, 说明这个序列有较好的区分度, 能区分不同居群天门冬。此外, 天门冬 ITS2 片段长度仅为 240 bp, 稍短于 ITS1 片段长度, 但其变异率和信息位点却多于 ITS 片段, 说明 ITS2 容易扩增和分析比较, 是天门冬 DNA 条形码的简单有效片段之一。

表 3 不同居群天门冬 ITS1 和 ITS2 的变异位点数目和变异率

Table 3 Variable sites and mutation rate of ITS1 and ITS2 sequences of *A. cochinchinensis* from different populations

居群	ITS1		ITS2		总变异位点数/个	变异率/%
	变异位点数/个	变异率/%	变异位点数/个	变异率/%		
XN	8	3.25	14	5.81	22	4.51
YS	11	4.47	16	6.67	28	5.76
HZ	7	2.81	12	5.00	19	3.88
ZH	9	3.61	15	6.17	24	4.87
YH	11	4.42	17	7.08	28	5.72
HS	12	4.82	15	6.25	27	5.52
XH	8	3.21	17	7.08	25	5.11
QX	10	4.06	16	6.67	26	5.31
WA	13	5.22	16	6.67	29	5.93
FQ	7	2.81	22	9.17	29	5.93
HX	9	3.61	16	6.67	25	5.11
KL	9	3.60	13	5.39	22	4.48
XI	11	4.41	15	6.25	26	5.31
TD	8	3.20	13	5.39	21	4.27
YQ	10	4.01	16	6.67	26	5.31
DS	13	5.22	14	5.83	27	5.52
YZ	11	4.41	16	6.67	27	5.52
XY	12	4.82	16	6.69	28	5.73
KM	9	3.61	14	5.83	23	4.70
QJ	7	2.81	13	5.37	20	4.07
GL	8	3.21	11	4.58	19	3.88
YX	9	3.61	13	5.42	22	4.49
GZ	9	3.61	11	4.52	20	4.06
NN	11	4.60	13	5.42	24	5.01
ZS	9	3.61	11	4.58	20	4.08

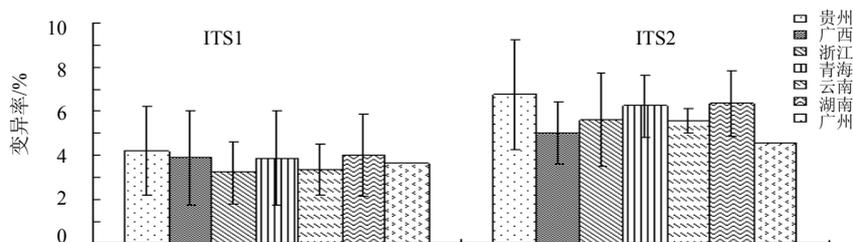


图 1 不同省天门冬居群 ITS 序列变异率

Fig. 1 Mutation rate of ITS sequences of *A. cochinchinensis* from different provinces

表 4 不同省天门冬居群信息位点比较

Table 4 Informative sites of *A. cochinchinensis* from different provinces

省份	ITS1 信息位点			ITS2 信息位点								
	53~55	94~96	184~186	30	43	75	83	132	197	207	229	239
贵州	GGC	TGC	T	G	A	T	C	A	T	G	A	C
广西	AGC	TGT	C	-	-	G	T	G	A	A	C	T
浙江	AGC	TGC	C	-	A	G	T	C	A	G	C	C
青海	CGC	TGC	C	-	A	A	T	C	A	G	T	C
云南	GGC	AAC	C	A	A	G	T	C	A	G	C	C
湖南	GGA	TGT	C	-	-	G	T	G	A	A	C	T
广东	AGC	TGT	C	-	A	G	T	C	A	G	C	C

“-” 为缺失

“-” lack base or deletion

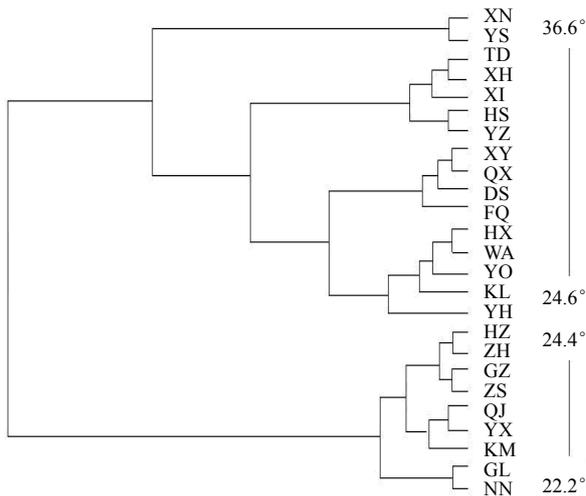


图 2 基于 ITS 序列的天门冬系统树

Fig. 2 Dendrogram of *A. cochinchinensis* based on ITS sequences

植物的分布与系统发育一般与地理位置（特别是纬度）存在一定的关系^[17-18]。本实验的不同产地天门冬居群被北纬 24.5° 划分为 2 大群，说明天门冬的种间变异主要受纬度的影响，与经度关系不大。浙江、广东、广西的天门冬居群来自人工栽培，与云南天门冬居群聚在一起，这可能是由于随着栽培时间的推移，其 ITS 序列逐渐受到纬度的影响而趋同进化，或者是这些天门冬居群直接引种于云南，因此与云南居群亲源较近。

天门冬药材主要利用野生天门冬资源，近年来由于其需求量越来越大，野生资源日益枯竭，必须依靠人工栽培种植，而人工栽培品种主要靠异地引种。中药材一个重要特点是存在道地性，不同产地的药材，有效成分组成与量存在很大差异，因此天门冬药材道地性的确定是指导引种和良种选育的重要前提，而 DNA 序列分析技术是药材道地性鉴定的手段之一。本研究的结果表明，贵州省产天门冬遗传多样性较多，其 ITS 序列变异率和信息位点都相对较高，说明贵州是天门冬药材的道地产区之一，ITS 序列可以从分子水平上阐明其遗传背景，克服由于品种混杂导致产量、品质下降和种质退化等问题，并指导天门冬的资源管理和引种栽培。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
 [2] 姚念环, 孔令义. 天门冬属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 天然药物研究与开发, 1999, 11(2): 67-71.
 [3] 杜旭华, 郭允珍. 抗癌植物药的开发研究 IV. 中药天

门冬的多糖类抗癌活性成分的提取与分离 [J]. 沈阳药学院学报, 1990, 7(3): 197-201.
 [4] 李志孝, 黄成钢, 蔡育军, 等. 天门冬多糖的化学结构及体外抗氧化活性 [J]. 药学学报, 2000, 35(5): 358-362.
 [5] 倪京满, 赵汝能, 王 锐. 中药天门冬炮制前后氨基酸含量比较 [J]. 中草药, 1992, 23(4): 182.
 [6] Liang Z Z, Aquino R, Simone D, et al. Oligofurostanosides from *Asparagus cochinchinensis* L. [J] *Planta Med*, 1988, 54(4): 344-346.
 [7] 沈梓云, 平金良. 三苯氧胺、天门冬素治疗乳腺增生 513 例疗效分析 [J]. 综合临床医学, 1997, 13(2): 138-139.
 [8] Zhang H J, Sydara K, Tan G T, et al. Bioactive constituents from *Asparagus cochinchinensis* L. [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 194-200.
 [9] 罗 俊, 龙庆德, 李诚秀, 等. 地冬与天门冬的镇咳、祛痰及平喘作用比较 [J]. 贵阳医学院学报, 1998, 23(2): 132-134.
 [10] Christopher H J, Kenneth J S, Harvey E B J. Evolutionary relationships, interisland biogeography, and molecular evolution in the *Hawaiian violets* (*Viola*: *Violaceae*) [J]. *Am J Bot*, 2009, 96: 2087-2099.
 [11] Vijaykumar A, Saini A, Jawali N. Phylogenetic analysis of Subgenus *vigna* species using nuclear Ribosomal RNA ITS: Evidence of hybridization among *vigna unguiculata* subspecies [J]. *J Hered*, 2010, 101: 177-188.
 [12] Yan J, Deng J, Zhou C J, et al. Phenotypic and molecular characterization of *madurella pseudomycetomatis* sp. nov, a novel opportunistic fungus possibly causing black-grain mycetoma [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 251-257.
 [13] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. Innes M, Gelfand D, Sninsky J, et al. eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* [C]. San Diego: Academic Press, 1990.
 [14] 蒋玲艳, 郭志刚, 王 翀, 等. 中国不同地区绞股蓝 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1123-1127.
 [15] 朱 爽, 周 林, 黄楷鸿, 等. 毛钩藤和无柄果钩藤的 ITS 序列分析研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1696-1700.
 [16] 郝剑瑾, 程 舟, 梁洪卉, 等. 基于 rDNA ITS 序列探讨我国冬虫夏草的遗传分化及分布格局 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 112-116.
 [17] 王艳红, 王 辉, 高立志. 普通野生稻 *Oryza rufipogon* Griff. 的 SSR 遗传多样性研究 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(10): 1750-1754.
 [18] 朱世华, 张启发, 王明全. 中国普通野生稻核糖体 RNA 基因限制性片段长度多态性 [J]. 遗传学报, 1998, 25 (6): 531-537.