

图谱的对照指纹图谱,为杜仲药材提供了质量上的技术监控手段。

#### References:

- [1] Kang T G. *Traditional Chinese Medicine Identification* (中药鉴定学) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese

Medicine, 2003.

- [2] Charles J S, Ravikumar P R, Huang F C, et al. Isolation and synthesis of pinoresinol-diglucosides, a major antihypertensive principle of Tu-Chung [J]. *J Am Chem Soc*, 1976, 98(17): 5412.  
[3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

## 太子参脱病毒苗的核糖体 ITS 序列研究

朱艳<sup>1</sup>, 秦民坚<sup>1\*</sup>, 杭悦宇<sup>2</sup>

(1. 中国药科大学 中药资源教研室, 江苏 南京 210038; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:**目的 研究太子参脱病毒苗与外界苗 rDNA ITS 区碱基序列的异同。方法 运用 PCR 直接测序法对 9 种太子参脱病毒苗和 4 种外界苗的 rDNA ITS 区 (包括 ITS1、5.8S、ITS2) 碱基序列进行了序列测定。结果 太子参脱病毒苗与外界苗的 5.8S 碱基序列完全一致, 变异位点基本上位于 ITS1 的起始端与 ITS2 的终止端, 其中江苏溧阳和安徽宣城的脱病毒苗变异位点较多。使用 UPGMA 法构建了系统发生树, 从分子生物学角度说明了它们之间的内在联系。结论 rDNA ITS 碱基序列的比较分析从分子水平上进一步阐明了脱病毒苗的遗传稳定性。

**关键词:**太子参; 脱病毒苗; rDNA ITS 区; DNA 序列

**中图分类号:**R282.7

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2007)04-0599-03

### Sequence analysis of rDNA ITS of de-virus seedlings of *Pseudostellaria heterophylla*

ZHU Yan<sup>1</sup>, QIN Min-jian<sup>1</sup>, HANG Yue-yu<sup>2</sup>

(1. Department of Traditional Chinese Medicinal Material Resources, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Institute of Plant, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract: Objective** To study rDNA ITS sequence similarities and differences between the de-virus seedlings and outside seedlings of *Pseudostellaria heterophylla*. **Methods** The sequences of ITS region (including ITS1, ITS2, and 5.8S) from nine de-virus seedlings and four outside seedlings were studied by the method of DNA sequence analysis. **Results** There were the same sequences in 5.8S region between the de-virus seedlings and outside seedlings of *P. heterophylla*. Variable sites lay in the initial position of ITS1 and termination of ITS2 basically. The de-virus seedlings from Liyang (Jiangsu Province) and Xuancheng (Anhui Province) had more variable sites. Phylogenetic dendrogram based on ITS was constructed by using UPGMA methods, which showed the inherent relation at the level of molecular biology. **Conclusion** The analysis of rDNA ITS of *P. heterophylla* has further clarified the inherit stability of de-virus seedlings at the molecular level.

**Key words:** *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.; de-virus seedlings; rDNA ITS; sequences of DNA

太子参为石竹科孩儿参属植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根, 收载于《中国药典》<sup>[1]</sup>, 具有益气健脾, 生津润肺之功效, 主治心悸自汗, 疲倦乏力, 脾虚食少, 气阴不足, 自汗口渴, 肺燥干咳等症。太子参主产于江苏、山东、安徽、福建等省, 长期无性繁殖易发生病毒病, 关于太子参脱病毒的具体情况, 笔者

已作了初步的研究<sup>[2]</sup>。近年来, rDNA ITS 区以进化速率快且与植物生活型呈相关性, 而被广泛用于近缘属间、属内系统发育及种内居群间的差异性研究<sup>[3~5]</sup>。余永邦等<sup>[6]</sup>曾对部分产区的太子参进行 rDNA ITS 区序列的比较, 那么太子参脱病毒苗与外界苗间是否也存在 DNA 序列上的差异? 脱病毒苗是否既脱除了病毒, 又保持了该品种的优良特性?

收稿日期: 2006-07-31

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2005206)

作者简介: 朱艳 (1972—), 女, 江苏吴江人, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事药用植物种质资源保存和生物技术等方面的研究。

\* 通讯作者 秦民坚 Tel: (025) 85391290 E-mail: minjianqin@sohu.com

为此,以不同产地太子参脱病毒苗与外界苗为研究对象,采用 PCR 产物直接测序的方法,对太子参各产区脱病毒苗与部分外界苗的 rDNA ITS 序列进行了测定,旨在从分子水平上进一步阐明太子参脱病毒苗的遗传稳定性。

## 1 材料与方法

1.1 材料:实验所用的外界苗为 2002 年 7 月—2005 年 6 月间采自江苏、山东、安徽、福建、辽宁等我国太子参主要产区的栽培种及野生种,脱病毒苗采自中国药科大学药用植物园组培室。材料来源详见表 1。

表 1 实验所用太子参来源

Table 1 Sources of *P. heterophylla* used in experiment

| 样品编号 | 采集地          | 相应脱病毒苗编号 |
|------|--------------|----------|
| Z1   | 福建柘荣(柘参 1 号) | S1       |
| Z2   | 福建柘荣(柘参 2 号) | S2       |
| Fj   | 福建柘荣         | S3       |
| Gz   | 贵州施秉         | S4       |
| Ah   | 安徽宣城         | S5       |
| Ly   | 江苏溧阳         | S6       |
| Sw   | 山东文登         | S7       |
| S1   | 山东临沂         | S8       |
| Ln   | 辽宁凤城(野生)     | S9       |

1.2 总 DNA 提取:采用改良 CTAB 法提取总 DNA,具体步骤如下:取样品叶片或块根适量,用蒸馏水清洗干净,用液氮速冻,然后在研钵中迅速将其研磨成粉末,在化冻之前将粉末转移至 2.0 mL 聚丙烯离心管中,加入 1.5 mL 预热的 DNA 提取缓冲液 (2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% PVP,  $\beta$ -巯基乙醇 0.1%),混匀,65 ℃ 水浴保温 40~90 min,氯仿-异丙醇 (24:1) 抽提 2 次,异丙醇沉淀 DNA,70% 乙醇洗涤 2 次,沉淀风干,50  $\mu$ L 重蒸水溶解,-20 ℃ 保存备用。

1.3 ITS 区片段的扩增与测序:rDNA ITS 片段扩增采用的引物根据余永邦的引物略加修改而得,分别为位于 18S 上的 IP1 (5'-AGTCGTAACAAGG-TTTCGATGGTG-3') 和位于 26S 上的 IP2 (5'-TTATTGATATGCTTAACTCAGCGGG-3')。

PCR 扩增反应在 30  $\mu$ L 的体系中完成,反应液含 10 $\times$ PCR buffer 3  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.0  $\mu$ L, dNTP mix (2.5 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, Template DNA 1.0  $\mu$ L, Primer 1 (10 mmol/L) 1.0  $\mu$ L, Primer 2 (10 mmol/L) 1.0  $\mu$ L, Taq 酶 0.2  $\mu$ L。反应在 PTC200 型 PCR 仪上进行,扩增条件为:95 ℃ 预变性 4 min,95 ℃ 变性 50 s,54 ℃ 复性 45 s,

72 ℃ 延伸 50 s,35 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。以 ddH<sub>2</sub>O 代替模板 DNA 作空白对照。

PCR 产物用上海华舜纯化试剂盒进行纯化,然后采用 ABI PRISM 377-96 型自动测序仪进行测序,为保证所测序列的准确性,使用双向测序,交由上海生工进行测序。

1.4 DNA 序列数据分析:所得 DNA 序列输入计算机后,用 Clustal X (1.8) 软件进行对位排列,并辅以人工校对,用 MEGA3.0 软件分析脱病毒苗与外界苗之间 DNA 序列上的差异,并以石竹科近缘属蝇子草属植物 *Silene aegaea* 为外类群 (资料来自 GenBank,登录号 AJ299839),与 9 个产地的外界苗及相应脱病毒苗的 ITS 序列进行分析,采用非加权平均法 (UPGMA 法) 重建系统发生树。

## 2 结果与讨论

2.1 太子参脱病毒苗的 rDNA ITS 区序列的大小:本研究共测定了 13 个种,包括 9 种脱病毒苗和 4 种外界苗,其中福建柘荣 (Fj)、贵州施秉 (Gz)、江苏溧阳 (Ly)、山东文登 (Sw)、山东临沂 (Sl) 的 ITS 序列参考了余永邦<sup>[6]</sup>的结果,有关脱病毒苗的 ITS 序列为首次报道,其核糖体 DNA 内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 与 3 个编码区 18S、5.8S 和 26S 的界限的决定参考了余永邦<sup>[6]</sup>的结果及 GenBank 中石竹科近缘属蝇子草属植物 *S. aegaea* 的 ITS 序列 (登录号 AJ299839)。

根据测序结果,各脱病毒苗间 ITS 序列的长度除江苏溧阳 (S6) 为 614 bp 以外,其余长度完全一致,均为 611 bp,G+C 的量 ITS-2 区高于 ITS-1 区,分别为 54.7%~56.0% 和 52.9%~54.6%。所有太子参脱病毒苗的 5.8S 序列都很保守,长度均为 156 bp,碱基完全一致。

2.2 太子参脱病毒苗与外界苗的 rDNA ITS 碱基序列的差异与分析:从太子参外界苗及其脱病毒苗的 ITS 序列变异位点比较 (图 1) 中,发现其变异较小,变异位点基本上位于 ITS1 的起始端与 ITS2 的终止端。其中外界苗柘参 1 号 (Z1)、福建柘荣与脱病毒苗 S1、S3、S4、S7、S8 的 ITS 碱基序列完全一致;柘参 2 号 (Z2) 与其相应的脱病毒苗 (S2) 的碱基仅在 82 位点 (T $\rightarrow$ K) 存在变异,同时发现所测太子参的 ITS 序列除柘参 2 号 and 与其相应的脱病毒苗 S2 以外,其余序列在该位点上碱基均为 G,这是否与该品种不开花有关联,该差别能否作为鉴别太子参品种开花与否的分子标记,还需要进一步的实验来证实。

|                      |                              |
|----------------------|------------------------------|
|                      | 1555 5555566666 666666       |
|                      | 585455 8889900000 111111     |
|                      | 3578324467 2350104569 012345 |
| S1、S3、S4、S7、S8、Z1、Fj | GACC-GAATC GTGTTA-CTT GCGAC- |
| S2                   | ....-K.....                  |
| S5                   | ....-.... TATAC.CTAC.TA.-    |
| S6                   | ATAAC...AA.....-TAN N..TAA   |
| S9、Ln                | ....-CG.....                 |
| Z2                   | ....-T.....                  |
| Gz                   | ....-.... ..A.-              |
| Ah                   | ....-....CT.C.T.-            |
| Ly                   | .TA.C.....-TA.....A-         |
| Sw                   | ....-....                    |
| S1                   | ....-....                    |

图 1 太子参外界苗及其脱病毒苗的 ITS 序列变异位点比较  
Fig. 1 Comparison of variable sites in ITS sequences of *P. heterophylla* from outside seedlings and de-virus seedlings

所测脱病毒苗的 ITS 序列中,以安徽宣城(S5)和江苏溧阳(S6)的变异尤为明显,其中江苏溧阳的外界苗与脱病毒苗的 ITS 序列的碱基变异主要发生在 ITS1 与 ITS2 上,变异位点主要为 3 位点(G→A),8 位点(C→A),556 位点(T→A),557 位点(C→A)和 613 位点(A→T);安徽宣城的碱基变异主要发生在 ITS2 上,变异位点主要为 582 位点(G→T),583 位点(T→A),585 位点(G→T),590 位点(T→A),591 位点(T→C)和 612 位点(G→A)。这一方面可能与脱病毒苗制备过程中具体采用的方法有关系<sup>[2]</sup>,由于江苏溧阳和安徽宣城有着悠久的栽培太子参的历史,长期的无性繁殖,使得太子参病毒病非常严重,因此不得不采用多种方法共同处理,特别是化学试剂病毒唑的使用,可能会对其产生影响;另一方面,太子参不同产地的种质资源存在遗传多样性<sup>[6]</sup>,其中以安徽宣城的变异较为明显。

2.3 不同产地太子参及其脱病毒苗的系统发生树重建。由于 ITS1 和 ITS2 两个片段的长度有限,各自提供的信息量有限,因此将这两个片段综合分析,以 UPGMA 法重建系统树。

分析一个脱病毒植株与母本之间的关系,最直接的方法就是分析它们的基因序列上的变化,即 DNA 序列分析的方法,这种基因序列分析的方法比形态学的方法更快速、更准确、更可靠,更能准确地反映出脱病毒植株和母本之间的遗传关系。从图 2 可见,不同产地太子参的脱病毒苗与相应的外界苗基本上聚在一起,这就从分子水平上进一步阐明了脱病毒苗的遗传稳定性。

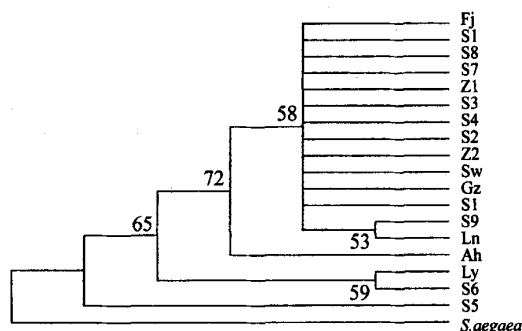


图 2 基于 ITS 序列的不同产地太子参外界苗与脱病毒苗的系统聚类树

Fig. 2 Systematic dendrogram based on ITS sequences of *P. heterophylla* from outside seedlings and de-virus seedlings

笔者看到作为外类群的 *S. aegaea* 自成一支,不同产地的太子参样品的 ITS 序列存在着种内的变异,其中安徽宣城(Ah)和江苏溧阳(Ly)的变异尤为明显,福建柘荣、柘参 1 号、柘参 2 号、贵州施秉、山东文登、山东临沂(S1)聚在一起,而辽宁凤城(Ln)单独聚为 1 支。由此可以看出福建地区的太子参品种与山东地区的太子参品种亲缘关系较近,而与地道产区江苏的亲缘关系较远;柘参 1 号、2 号为从当地种质资源中选育出的新品种,其遗传物质保持着相对的稳定性;辽宁凤城的野生太子参品种与福建、贵州、山东地区的亲缘关系较近,而与江苏、安徽地区的亲缘关系较远,这些可能与各地区不同的土壤和气候等环境条件的影响有很大关系,这需要进一步研究加以确证。

#### References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Zhu Y, Qin M J, Zhou X H. Studies on virus elimination of *Pseudostellaria heterophylla* [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2005, 14(4): 25-29.
- [3] Wang J B, Zhang W J, Chen J K. Application of ITS sequences of nuclear and rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1999, 37(4): 407-416.
- [4] Liu Z, Wang X Q, Chen Z D, et al. The phylogeny of Schisandraceae inferred from sequence analysis of the nrDNA ITS region [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42(7): 758-761.
- [5] Cai J N, Zhou K Y, Xu L S, et al. Ribosomal DNA ITS sequence analyses of *Cnidium monnieri* from different geographical origin in China [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(1): 56-59.
- [6] Yu Y B, Qin M J, Liang Z T, et al. Ribosomal DNA ITS sequence comparisons of *Pseudostellaria heterophylla* from different geographical regions [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2003, 12(4): 1-5.