

毛黄堇和石生黄堇的 ITS 序列差异分析

易思荣, 韩 凤, 黄 娅, 李 娟, 全 健, 曹厚强

重庆市药物种植研究所 重庆市中药良种选育与评价工程技术中心, 重庆 408435

摘要:目的 从分子水平鉴别濒危药用植物毛黄堇和石生黄堇的差异。方法 分别从毛黄堇和石生黄堇的叶片中提取 DNA, 以核基因组通用引物为引物进行扩增, 扩增产物经纯化后对 PCR 产物采用直接测序法进行测序。结果 获得 ITS 及 5.8 S rDNA 完全序列, 分别为毛黄堇 561 bp、石生黄堇 552 bp; 二者的 ITS 序列差异呈显著性, 其中 ITS1 差异性达 16.28%, ITS2 差异性达 21.21%。结论 ITS 序列可有效地鉴别毛黄堇和石生黄堇, 并可广泛应用于中药材的鉴别。

关键词: 毛黄堇; 石生黄堇; ITS 序列; 物种鉴别; 扩增产物

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)11-2257-03

Analysis on ITS sequence differences of *Corydalis tomentella* and *C. saxicola*

YI Si-rong, HAN Feng, HUANG Ya, LI Juan, QUAN Jian, CAO Hou-qiang

Chongqing Research Center for Fine Variety Breeding and Evaluation Engineering Techniques of Chinese Materia Medica,

Chongqing Institute of Pharmaceutical Plant, Chongqing 408435, China

Abstract: **Objective** To identify the endangered medicinal plants *Corydalis tomentella* and *C. saxicola* at molecular level. **Methods** DNA was extracted from the leaves of *C. tomentella* and *C. saxicola* and amplified by common primers in nuclear genome. The amplification products were sequenced using direct sequencing method after purification. **Results** The rDNA full-length sequences of ITS and 5.8S, i.e. 561 and 552 bp for *C. tomentella* and *C. saxicola*, were obtained, respectively. Significant differences were found between the two ITS sequences, and differences were 16.28% and 21.21% for ITS1 and ITS2, respectively. **Conclusion** ITS sequence could be used for the identification of *C. tomentella* and *C. saxicola*, and also be widely used for the identification of Chinese materia medica.

Key words: *Corydalis tomentella* Franch.; *Corydalis saxicola* Bunting; ITS sequence; identification of species; amplification products

近年来,利用分子生物学方法获得的大量 DNA 序列被广泛应用于植物系统研究和药用植物近缘种和道地性鉴别等方面的研究。其中核糖体 DNA (rDNA) ITS 区的应用最为广泛,并且已经证明这一区域的 DNA 序列特征可以作为被子植物系统学研究的一个非常重要的性状^[1]。目前,核糖体 DNA ITS 区序列分析已被广泛应用于解决植物科属内的系统问题和近缘物种的鉴别等^[2-7],这些研究表明,采用 ITS 在探讨相关科属之间、属内的关系以及近缘物种和药用植物道地性等方面的问题都有很高的价值。

毛黄堇 *Corydalis tomentella* Franch. 为罂粟科紫堇属植物,以全草入药,性凉味苦,具有祛瘀止痛、凉血、止血等功效,广泛用于治疗跌打损伤、关节痛、咳血、劳伤吐血、晚期癌症等症,产于湖

北西部、四川、重庆、陕西等地,生于海拔 600~1 000 m 的岩石缝隙中;石生黄堇 *C. saxicola* Bunting 产于浙江、湖北、陕西、重庆、四川、云南、贵州、广西等地,生于海拔 600~1 700 m 的石灰岩缝隙中,在四川西南部海拔可升至 2 800~3 900 m。由于毛黄堇药用效果明显,同时其生长环境独特,加上近年来采集量逐渐增大,逐渐导致了严重的资源枯竭,价格急剧攀升,毛黄堇与石生黄堇形态相似,干燥药品仅从外形上难于分辨,为了准确区分二者,本实验采用 PCR 扩增以及测序技术,分别测定其 rDNA ITS 区序列,并对其进行比较分析,为药材鉴定提供参考依据。

1 材料

石生黄堇 *Corydalis saxicola* Franch. (标本号 YISIRONG100623017) 和毛黄堇 *Corydalis tomentella*

收稿日期: 2012-03-19

基金项目: 科技部“十一五”支撑计划项目(2006BAC01A16); 重庆市中医药重点攻关计划项目(20090116, 201002166)

作者简介: 易思荣(1972—),男,重庆市药物种植研究所副研究员,主要从事药用植物栽培和资源等方面的研究工作。E-mail: yisirong123@yahoo.cn

网络出版时间: 2012-10-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121019.1040.009.html>

Bunting (标本号 YISIRONG100706004) 株叶片, 采自重庆市南川区金佛山, 由笔者鉴定。标本均存放于中国科学院昆明植物研究所标本馆, 基因库号见表 1。

表 1 毛黄堇和石生黄堇的 rDNA ITS 序列基因库号

Table 1 Gene registers of rDNA ITS sequence of *C. saxicola* and *C. tomentella*

序列名称	来 源	基因库号
Corydalis_trnH	毛黄堇	HQ735402
Corydalis_trnH	石生黄堇	HQ735403
Corydalis_ITS	毛黄堇	HQ735404
Corydalis_ITS	石生黄堇	HQ735405

2 方法

2.1 ITS 区的扩增

分别取用硅胶干燥的两种样品叶片各 2 份 0.1 g 左右, 采用改良 CTAB 法^[8]提取总 DNA。PCR 反应在 Perkin Elmer 9700 型 PCR 仪上进行, 采用 White 等^[9]的引物 (ITS5, 5'-GGAAGTAAAAGTAACAAG-G-3'; ITS4, 5'-TCCTTCCGCTTATTGATA-TGC-3') 进行 ITS 区的扩增。PCR 扩增程序为: 97 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min; 50 °C 退火 1 min; 72 °C 延伸 1 min; 30 个循环。72 °C 延伸 7 min。

扩增反应采用 25 μL 的反应体系, 包括 1× 缓冲液, 0.2 U 的 *Taq* 聚合酶, 2.5 mmol/L 的 MgCl₂, 0.25 mmol/L 的 dNTPs, 正反向引物浓度各为 0.2 μmol/L, 以及约 50 ng 的模板 DNA。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 用美国华舜公司的纯化试剂盒纯化, 备用。

2.2 rDNA ITS 序列测定

扩增引物同时作为测序引物, 利用正反向引物分别对两条链测序, 反应依据双脱氧链终止法终端荧光标记, 进行 DNA 序列的测定。测序反应在 PE9600 或 PE9700 PCR 仪上进行, 反应程序为: 95 °C 预变性 4 min; 96 °C 变性 10 s; 50 °C 退火 5 s; 60 °C 延伸 4 min; 共 33 个循环。反应产物经 95% 乙醇 + 乙酸钠沉淀, 用 70% 乙醇、无水乙醇洗涤, 干燥后加入 20 μL 的双蒸水充分溶解, 经 95 °C 变性 4 min 后上样, 在 ABI3700 型自动测序仪上检测。为保证所测序列的准确性, 分别对每一种类型的 ITS 序列的正、反链进行测序并校准。

3 结果

3.1 毛黄堇和石生黄堇 ITS 序列长度及同源性比较

采用 ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对毛黄堇和石生

黄堇进行 PCR 扩增, 得到毛黄堇和石生黄堇 ITS 序列长度分别为 561 bp 和 552 bp (图 1)。毛黄堇 5.8 S rDNA 147 bp, ITS1 片段 173 bp, ITS2 片段 231 bp; 石生黄堇 5.8 S rDNA 147 bp, ITS1 片段 172 bp, ITS2 片段 223 bp。

ITS 分布长度及同源性比较结果表明, 毛黄堇和石生黄堇的 ITS、5.8 S rDNA、ITS1 spacer 和 ITS2 spacer 的同源性分别为 81.26%、100.00%、83.72% 和 78.79%, 其 ITS1 片断和 ITS2 片断对应的差异性分别为 16.28% 和 21.21%, 同源性分析表明两物种的亲缘关系相近, 但也存在一定的差异。

3.2 毛黄堇和石生黄堇 ITS 序列变异分析

获得毛黄堇和石生黄堇的 ITS DNA 序列后, 对其按照 5.8 S rDNA、ITS1 和 ITS2 进行划分, 并分别进行 G+C 量百分比比较, 其中毛黄堇的 ITS 序列 G+C 量占 67.02%, 5.8 S rDNA 占 21.81%, ITS1 片段占 32.98%, ITS2 片段占 45.21%; 石生黄堇的 ITS 序列 G+C 量占 64.855%, 5.8 S rDNA 占 22.91%, ITS1 片段占 32.96%, ITS2 片段占 44.13%。从分析结果可以看出毛黄堇和石生黄堇的 5.8S rDNA、ITS1、ITS2 的 G+C 量百分比相似, 说明它们的亲缘关系相近。

本课题组利用 DNASTAR 软件对获得的石生黄堇和毛黄堇各 2 份样品的 4 条 ITS DNA 片段序列进行比对分析, 发现来自同种的两份样品有完全一致的 ITS 序列, 而两种之间 ITS 序列有 4.3% (共 24 个位点) 的差异, 其序列分布见图 1。该差异处于陈月琴等^[10]提出的 ITS 序列在被子植物中的 1.2%~10.2%。毛黄堇和石生黄堇的 5.8 S rDNA 具有 100% 的同源性, 而 ITS1 和 ITS2 表现出种间的多态性, 对应差异性分别为 16.28% 和 21.21%, 同时毛黄堇在第 356 位出现碱基缺失, 而石生黄堇在第 61 位出现碱基缺失。

4 讨论

rRNA 位于 18 S~28 S rDNA 的内转录间隔区, 它包括进化上高度保守的 5.8 S rDNA 和包含有 rDNA 前体加工信息的两个间隔区 ITS1 和 ITS2, 在 rDNA 多基因家族成员中, ITS 区是多拷贝, 以串连重复方式出现在一个或多个染色体基因位点上的, 同时 ITS 区又有通过不等交换和基因转变等方式经历快速一致进化的特性, 使得重复单位在基因组内保持了高度的一致性; 而且 ITS 区两侧有高度保守序列存在, White 等^[9]设计了一整套真核生物通用扩

C. t	1	AACCTGCCCA	GCAGAACGAC	CCGCGAACAC	GTGATGCCCC	CGGTTACGCC
C. s		AACCTGCCCA	GCAGAACGAC	CCGCGAACAC	GTGATGCCCC	CGGTTACGCT
C. t	51	GGACGGGGGG	GAGCGGAGAC	GCCCCCTCCCC	GCCCCGGAACA	AACGAACCCC
C. s		GGACGACGGG	-AGCGGAGAC	GCCCCCTACC	GCCCCGGAACA	AACGAACCCC
C. t	101	CGGCGCGATC	CCCGCCAAGG	AAAACGAAAA	AAACGGATCG	GGCGCCCCGC
C. s		CGGCGCGATC	ACCGCCAAGG	AAAACGAAAA	AAACGGATCG	AGCGCCCCGC
ITS1 spacer ←						
C. t	151	AAGGACGCGC	CCACCGAGCT	CTTAACGACT	CTCGGCAACG	GATATCTTGG
C. s		AAGGACGTGC	TCCCCGAGCT	CTTAACGACT	CTCGGCAACG	GATATCTTGG
C. t	201	CTCTCGCATC	GATGAAGAAC	GTAAGCGAAAT	GCGATACTTG	GTGTGAATTG
C. s		CTCTCGCATC	GATGAAGAAC	GTAAGCGAAAT	GCGATACTTG	GTGTGAATTG
C. t	251	CAGAATCCCC	TGAATCATCG	AGTCTTTGAA	CGCAAGTTGC	GCCCTAGGCC
C. s		CAGAATCCCC	TGAATCATCG	AGTCTTTGAA	CGCAAGTTGC	GCCCTAGGCC
C. t	301	GTCAGGCCGA	GGGCACGCT	GCCTGGGCGT	CACGCACCGA	GTGCCCCCA
C. s		GTCAGGCCGA	GGGCACGCT	GCCTGGGCGT	CACGCACCGA	GTGCCCCCA
5.8s rDNA → ITS2 spacer						
C. t	351	TCCCC-TGCC	CTCTGTACAA	CCCAGAGGGC	CGGGACGTTG	GGACCGGACA
C. s		TGCCCCAGCC	CTTTGTACAA	TTCAGAGGGC	CGGGGCGTCG	GGACCGGAGA
C. t	401	ATGGCCCCCC	GCGCCCCCGC	GCGCGGTCGG	CCCAAATCGA	GGCCCCCGCG
C. s		ATGGCCCCCC	GTGCCCCCGC	GCGCGGTCGG	CCCAAATCGA	GGCCCCCTCG
C. t	451	AGGCCGGCGT	CACGATCCGT	GGTGGTTGTA	AAAGACCGCG	CCTAGAAACC
C. s		AGGCCGACGT	CACGATCCGT	GGTGGTTGTA	AAAGACACGC	CCTAGAAACC
C. t	501	GGATCACGTG	CACGCCGCGC	CGCTCCCCGG	GAGGCCACAG	CGACCCCCAG
C. s		GGATCACGTG	CACGCCGCGC	CGCTCCCCGG	GAGGCCACAG	CGACCCCCAA
C. t	551	GGGCCGTCCC	CG			
C. s		GGG				

C.t-石生黄堇 C.s-毛黄堇

图 1 毛黄堇和石生黄堇 ITS 序列分布图

Fig. 1 ITS sequences of *C. saxicola* and *C. tomentella*

增引物,所有这些特性有利于 PCR 扩增、测序和排序,而所得到的序列潜在信息变异可以有效地解决系统发育关系,近年来 ITS 区已成为分子生物学研究中的热点,ITS 序列是物种鉴定的可靠依据,本研究结果表明毛黄堇和石生黄堇的 ITS 序列有 4.3% (共 24 个位点) 的差异,ITS1 和 ITS2 的差异性分别为 16.28% 和 21.21%,因此 ITS 可以用作毛黄堇和石生黄堇的种间鉴定。

参考文献

- [1] Baldwin B G, Sanders M J, Porter J M, *et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 1995, 82: 247-257.
- [2] 刘艳玲, 徐立铭, 倪学明, 等. 睡莲科的系统发育: 核糖体 DNA ITS 区序列证据 [J]. *植物分类学报*, 2005, 43(1): 22-24.
- [3] 蒋 明, 周英巧, 李嵘嵘. 铁线莲属 8 种药用植物 ITS 序列分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(9): 1802-1806.
- [4] Kita Y, Ito M. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Acordtnm* subgenus *Acordtum* (Ranunculaceae), with special reference to extensive polymorphism in individual plants [J]. *Plant Syst Evol*, 2000, 225: 1-4.
- [5] 欧立军, 张人文, 谈智文, 等. 我国不同地区天门冬核 DNA ITS 序列分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(7): 1402-1406.
- [6] Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the composite [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1992(1): 3-16.
- [7] 罗玉明, 张卫明, 丁小余, 等. 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]. *药学学报*, 2006, 41(9): 840-843.
- [8] Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [9] White T J, Bruns L, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. Innes M, Gelfand D, Sninsky J, *et al.* *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [C]. Emeryville: California Academic Press, 1990.
- [10] 陈月琴, 屈良鹄, 曾陇梅, 等. 南海赤潮有毒甲藻链状—塔马亚历山大藻的分子鉴定 [J]. *海洋学报*, 1999, 21(3): 105-121.