

· 药材与资源 ·

不同种质来源孩儿参的 rDNA ITS 区序列分析及鉴别

易 骏¹, 廖芳平², 郑伟文^{3*}

1. 福建教育学院 理科部, 福建 福州 350001

2. 福建中西医结合研究院, 福建 福州 350122

3. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003

摘要: 目的 通过分析不同种质来源孩儿参 ITS 序列, 为孩儿参种内鉴别提供 DNA 分子标记。方法 利用特异性引物进行 PCR 扩增、克隆和测序, 对孩儿参的 rDNA ITS 区间碱基序列进行测定, 比较其差异。结果 参试的 9 个不同种质来源孩儿参的整个 ITS 长度变异为 623~624 bp; 其中 ITS1 为 224 bp, G+C 量为 52.91%~54.26%; 5.8 SrDNA 为 155 bp, G+C 量为 54.49%~55.13%; ITS2 为 244~245 bp, G+C 量为 55.55%~56.41%。整个 ITS 区共有 17 个变异位点 (2.72%), ITS1、ITS2 和 5.8S 的变异位点分别为 7、7 和 3 个, 不同种质来源孩儿参均有若干个特异性的单核苷酸变异位点; 各样品的序列同源性均在 99.9% 以上; 序列间的遗传距离为 0.003~0.013。显示了不同产地、不同种质孩儿参的变异是不超过 1 个种的范围内的变异。结论 可利用 ITS 区序列差异, 鉴别不同种质来源的孩儿参。

关键词: 分子鉴定; 孩儿参; ITS 序列; 序列分析; 种质鉴别

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1318-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.022

Identification of *Pseudostellaria heterophylla* from different idioplasms by analysis of rDNA ITS sequences

YI Jun¹, LIAO Fang-ping², ZHENG Wei-wen³

1. Department of Science, Fujian Institute of Education, Fuzhou 350001, China

2. Fujian Academy of Integrative Medicine, Fuzhou 350122, China

3. Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

Abstract: Objective To provide the DNA molecular marker for the identification of *Pseudostellaria heterophylla* from the different idioplasms by analysis of rDNA ITS sequences. **Methods** PCR amplification, cloning, and sequencing were carried out using specified primer, and the rDNA ITS base sequences were compared. **Results** The ITS mutation extension was 623—624 pb among nine idioplasms of *P. heterophylla*. Thereinto, the ITS-1 was 224 pb and its G + C content was 52.91%—54.26%, the 5.8S rDNA was 155 bp and its G + C content was 54.49%—55.13%, the ITS-2 was 244—245 bp and its G + C content was 55.55%—56.41%. There were 17 mutation sites (2.72%) in the whole ITS sequences. There were 7, 7, and 3 mutation sites in ITS1, ITS2, and 5.8S, respectively. The different idioplasms had a number of specific single nucleotide mutation sites. Their homologies with each other were upwards 99.9% and their sequence genetic distances were 0.003—0.013. These results showed that the mutation in species from different producing areas and idioplasms was within no more than one species. **Conclusion** The mutation of ITS sequences could be used to authenticate *P. heterophylla* from different idioplasms.

Key words: molecular identification; *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.; ITS region; sequence analysis; authentication of different idioplasms

孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax 假繁缕属 *Pseudostellaria* Pax 植物, 其干燥块根为 ex Pax et Hoffm. 为石竹科 (Caryophyllaceae) 异叶 太子参, 是中医常用中药之一, 具有益气健脾、生

收稿日期: 2013-01-07

基金项目: 福建高校服务海西建设重点项目 (NO.5)

作者简介: 易 骏 (1966—), 女, 副教授, 主要从事药用植物生物技术等研究。

*通信作者 郑伟文, 男, 研究员。E-mail: 864741148@qq.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1119.008.html>

津润肺之功效，用于脾虚体倦、食欲不振、病后虚弱、气阴不足、自汗口渴、肺燥干咳^[1]。我国孩儿参栽培历史悠久，目前已形成福建、贵州、江苏等主要产区，2005 年福建柘荣太子参规范化生产基地获得国家食品药品监督管理局 GAP 认证，其种质为柘参 2 号，具有性状稳定、产量高、品质优等特点。近年来，随着太子参价格不断攀升，孩儿参种植面积不断扩大，其种质混乱已影响太子参的品质，因此有必要开展不同种质来源的孩儿参鉴别研究。目前，由于药用植物核糖体 DNA 中的内转录间隔区 ITS 因存在种内多态性，已被用于种内居群间的差异性研究，该技术为中药质量标准规范化奠定了坚实的基础^[2]。国内有太子参脱毒苗、混伪品和不同产区太子参 rDNA 的 ITS 区序列分析研究的报道^[3-5]，但尚未开展不同种质来源孩儿参 rDNA 的 ITS 区序列分析及鉴别研究，本实验对不同种质来源孩儿参 rDNA 的 ITS 区序列进行 PCR 扩增、克隆和测序，获得 rDNA ITS 区序列，通过分析 ITS 区序列差异，运用软件分析序列，构建不同种质来源孩儿参种内系统发育树，建立不同种质来源孩儿参种内鉴别方法，为太子参规范化生产提供稳定的孩儿参种质，以确保太子参药材质量的安全、有效、稳定、可控。

1 材料与仪器

1.1 材料

供试品为石竹科异叶假繁缕属植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的新鲜叶片，采集后立刻进行液氮速冻，带回实验室后移至 -80 °C 冰箱保存待用。9 个不同种质来源孩儿参的采集地点见表 1，均由福建中医药大学杨成梓副教授鉴定。

1.2 仪器

PCR 仪 (PTC-100TM 型, MJ Research INC), 冷冻离心机 (5415R 型, Eppendorf), 凝胶分子成像分析系统 (GEL DOC2000, Bio-Rad 公司), 图像打印系统 (MITSUBISHI P91E,), 电泳 (PAC300-R 型, Schneider, 法国), 电泳槽 (SUB-CELL GT), 电压仪 (MA665EL 200, Bio-Rad 公司), 磁力加热搅拌器 (78-1, 常州国华电器有限公司), SK-1 快速混匀器 (常州国华电器有限公司), 电子精密天平 (PB303-E), pH 计 (PHS-25A 型), 微量移液器 (10、50、200、1 000 μL, Gison 公司), 摇床 (HQ45B, 中国科学院武汉科学仪器厂), 制冰机 (SIM-F124,

表 1 不同种质孩儿参采集地点及注册的 Genbank 登陆号

Table 1 Collection places and registered Genbank No. of *P. heterophylla* from different idioplasms

编号	采集地点	种质	Genbank 登陆号
1	柘荣县双城镇	柘参 2 号	EF197887
2	柘荣县双城镇	自留种	EF197886
3	柘荣县英山乡	柘参 2 号	EF197879
4	柘荣县英山乡	大叶种	EF197880
5	福安县上白镇	圆叶种	EF197881
6	柘荣县富溪镇	自留种	EF197882
7	霞浦县	柘参 1 号	EF197883
8	霞浦县	柘参 2 号	EF197884
9	山东临沂市	自留种	EF197885

Sanyo), -80 °C 冰箱 (MDF-192, Sanyo)。

2 方法

2.1 总 DNA 提取

称取孩儿参叶片 0.2 g, 采用改进的 CTAB 法提取总 DNA, 酚氯仿抽提法纯化 DNA。所提的总 DNA 沉淀为白色, 经电泳检测, 不同种质来源的孩儿参总 DNA 均是单一的条带, 没有杂带。

2.2 ITS 序列 PCR 扩增

2.2.1 扩增引物 使用的 18S~26S rRNA 特异性引物 W1/W2 是根据药用植物柴胡 18S~26S rRNA 的序列设计的^[6], 其引物序列为 W1: 5'-TCCGTA-GGTGAACCTGCGG-3'; W2: 5'-TCCTCCGCTTAT-TGATATGTTAACTC-3'。使用的 18S~26S rRNA 特异性引物 P1/P2 是已发表的扩增孩儿参的 ITS 区的引物^[7], 其序列为引物 18SP1: 5'-CGTAACAAG GTTTCCGATGGTGAA-3'; 引物 26SP2: 5'-TTA-TTGATATGCTTAACTCAGCGGC-3'。

2.2.2 PCR 扩增反应 在一新的 Eppendorf 管中加入 DNA 模板 50 ng; dNTP 0.128 mmol; 10×buffer 3 μL; 引物 0.32 μmol; Taq 酶 0.4 U; Mg²⁺ 1.8 mmol (未添加外源 Mg²⁺); 反应体系总体积为 25 μL, 其中 Mg²⁺ 含在 10×缓冲液中。

2.2.3 扩增程序 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 48 °C 复性 20 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 2 个循环; 94 °C 变性 20 s, 48 °C 复性 20 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 36 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 得扩增产物。扩增产物经电泳检测, 引物 W1/W2 所扩增的条带特异性好, PCR 产物的凝胶电泳只出现一条大小约为 700 bp 的产物; 而用引物 SP1/SP2 所扩

增的条带的特异性不理想。

2.3 ITS 序列克隆

将 PCR 扩增的目的条带用凝胶回收试剂盒回收后,与载体 pMD 18-T 连接,连接反应按大连宝生 pMD 18-T 载体试剂盒提供的方法进行。连接反应后,转进大肠杆菌中,再用含氨苄的培养基进行过夜培养,提取大肠杆菌转化菌的质粒 DNA 进行克隆鉴定。

2.4 ITS 区克隆片段的测序

将 PCR 扩增,酶切鉴定均为阳性的克隆菌菌液送至北京三博远志生物技术有限责任公司测定核昔酸序列。

2.5 ITS 序列比对

去除载体序列:将序列提交至 NCBI 网站运行 VECTOR SCREEN,然后再手动去除载体序列。序列的对位排列与分析:采用软件 DNAMAN 5.2 对 9 条序列进行对位排序,采用 Kimura 参数计算遗传距离,采用 Mega 3.1 软件包构建系统发育树。

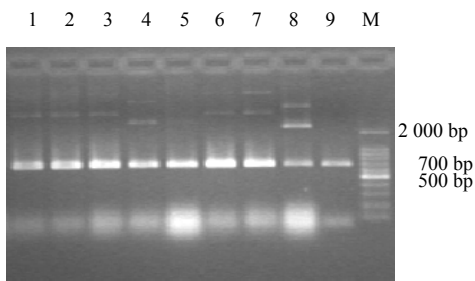
3 结果与讨论

3.1 PCR 扩增

PCR 扩增体系优化后,在 25 μ L 反应体系中,包括 1 μ L 模板,1.8 mmol Mg^{2+} ,0.128 mmol dNTP,0.32 μ mol 引物,0.4 U TaqDNA 聚合酶。

通过质粒的电泳检测,结果出现了超螺旋、线性、开环 3 种形式的 DNA 分子。以重组的质粒 DNA 为模板,进行 PCR 鉴定,经电泳检测,均能扩增出目的片段(图 1),初步显示,目的片段已插入克隆载体 pMD 18-T 中并转入大肠杆菌 DH5 α 。

在质粒插入位点附近,有一个 EcoRI 的酶切位点和 PstI 的酶切位点,因此将重组质粒用 EcoRI 和 PstI 进行双酶切,可以产生两个片段。经电泳鉴定(图 2),产生了一条较大的片段和一条较小的片段,



M-Marker 1~9 个不同种质孩儿参,下图同 M-Marker 1—9-9 *Pseudostellaria heterophyllas* from different idioplasms, same as follow

图 1 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of recombinant plasmids

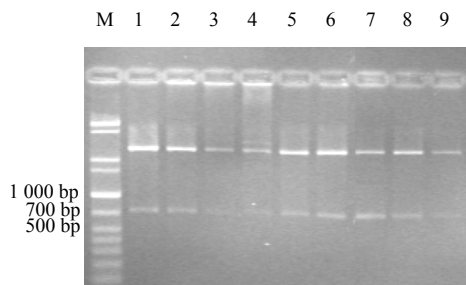


图 2 阳性克隆所提取质粒的双酶切电泳图

Fig. 2 Double enzyme digestion electrophoresis of plasmid extracted from positive clone DNA

后者大小在 700 bp 左右,与插入的外源片段大小相符,证明外源片段完整和载体连接,插入到质粒 DNA 中。

ITS 区序列分析结果表明,共测得 9 个不同种质来源孩儿参部分 18S,全部 rDNA ITS 序列(包括 5.8S)和部分 26S 序列,共约 700 bp。9 个 ITS 序列已经注册到 GenBank,登录号见表 1。

孩儿参 rDNA 的 ITS-1、5.8S 和 ITS-2 的界限参照 Genbank 中石竹科植物雀舌繁缕 *Stellaria alsine* 的资料来确定。测得 9 个不同种质来源孩儿参 ITS-1, 5.8S rDNA 和 ITS-2 全序列,18S rDNA 基因 3'端和 26S rDNA 基因 5'端部分碱基序列,共约 700 bp。各样品均显示不同的变异位点,其中 ITS-1 为 224 bp,变异位点有 7 个;5.8S rDNA 为 155 bp,变异位点有 3 个;ITS-2 为 244~245 bp,变异位点有 7 个。整个 ITS 区的变异位点丰富,可以较好地区分不同种质来源的孩儿参。所以,采用 ITS 序列鉴别不同种质孩儿参的方法是可行的。

3.2 不同种质孩儿参 ITS 序列比对

不同种质来源孩儿参 ITS-1、5.8S 和 ITS-2 序列变异位点丰富。9 个不同种质来源孩儿参均有若干个特异性的单核苷酸变异位点。柘荣县双城镇柘参 2 号、福安县上白镇圆叶种各有 1 个特异性的单核苷酸变异位点;柘荣县英山乡大叶种、柘荣县富溪镇自留种、霞浦县柘参 2 号、山东临沂自留种均有 2 个特异性的单核苷酸变异位点;柘荣县双城镇自留种、霞浦县柘参 1 号的特异性位点均有 3 个。因此通过比较 ITS 区序列可以准确地鉴别不同种质来源孩儿参。由此可见,不同种质来源孩儿参的 ITS 区序列,即其 ITS 及 5.8S rDNA 的序列分析,可为孩儿参不同种质的鉴别及该属的分类方面提供了新的手段,所得的 ITS 区序列为孩儿参的分子标记的

确定提供了依据,说明核糖体 DNA ITS 区序列用于孩儿参的分子鉴定是可行的。

3.3 碱基组成分析

G+C 量能反映属种内亲缘关系的遗传型特征,每个物种的 DNA 都有其特定的 G+C 量,不同物种的 G+C 量不同,亲缘关系愈远,其 G+C 量的差别就愈大。不同种质来源孩儿参 ITS 中碱基组成见表 2。

由表 2 可见,ITS2 的 G+C 量在 55.55%~56.41%变化,而 5.8S G+C 量在 54.49%~55.13%变化,ITS1 的 G+C 量在 52.91%~54.26%变化。5.8S G+C 量较 ITS1 的高,比 ITS2 的低。

3.4 遗传距离分析

由表 3 可见,不同种质来源孩儿参的遗传距离变异范围为 0.003~0.013,这表明孩儿参种内 rDNA

ITS 区存在遗传变异,但遗传变异率较低,属于同一个种植物,其中霞浦产柘参 1 号种和来自山东临沂的孩儿参遗传距离最大,柘荣县双城镇柘参 2 号、柘荣县英山乡柘参 2 号、福安县上白镇圆叶种和柘荣县富溪镇自留种的遗传距离最小。

尽管 rDNA ITS 区已被国际上公认是生物各类群属下种内水平比较研究的一个很好的分子指标,并且已在动物^[8]、被子植物^[9]、真菌^[10]等得到广泛的应用,但是,作为种的界定标准,目前尚未有一致的标准。Renske 等^[10]认为通过 ITS 区域比对,序列相似性大于 99%,鉴别为相同种;序列相似性大于 95%且小于 99%,鉴别为相同属;序列相似性小于 95%,鉴别为相同科。用 DNAMAN 对 9 个不同品系孩儿参的 ITS 序列进行多重比对后,得到一序列同源树(图 3)。柘荣县双城镇柘参 2 号、柘荣县英山乡柘参 2 号、福安县上白镇圆叶种和霞浦县柘参 2 号的同源性最高,达到了 100%。如此相似的 ITS 序列反映了它们之间具有十分密切的亲缘关系。其余各个品种的同源性为 99%,表明这几个种在系统演化过程中分化节律比较一致,历史分歧时间也相差不大,亲缘关系较近。

由于 ITS 1 和 ITS 2 两个片段的长度有限,各自提供的信息量有限,因此多数研究者都是将这两个片段综合起来分析,为此,用 Mega3.1 软件,基于 9 个不同种质来源孩儿参的 ITS 区序列构建其分子系统发育树。构建系统发育树的常用方法有邻接法(NJ)、最大简约法(MP)、不加权对群分析法(UPGMA)、ME(minimum evolution)法。以上 4 种方法各有一定的运用条件和范围,但是同时用

表 2 不同种质来源孩儿参 ITS 中各序列的 G+C 量
Table 2 Contents of G + C in ITS sequences of *P. heterophylla* from different idioplasms

编号	G+C 量 / %		
	ITS1	5.8S	ITS2
1	53.81	55.13	55.55
2	53.81	55.13	56.17
3	53.81	55.13	55.98
4	53.81	55.13	55.56
5	53.81	54.49	55.98
6	52.91	55.13	55.98
7	53.36	55.13	56.41
8	53.36	55.13	55.56
9	54.26	55.77	55.98

表 3 不同种质来源孩儿参 ITS 各序列遗传距离

Table 3 Genetic distance matrix in ITS sequences of *P. heterophylla* from different idioplasms

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0								
2	0.007	0							
3	0.003	0.007	0						
4	0.007	0.011	0.007	0					
5	0.003	0.007	0.003	0.007	0				
6	0.003	0.007	0.003	0.007	0.000	0			
7	0.009	0.013	0.007	0.013	0.009	0.009	0		
8	0.004	0.009	0.004	0.009	0.004	0.004	0.010	0	
9	0.007	0.011	0.007	0.000	0.007	0.007	0.013	0.009	0

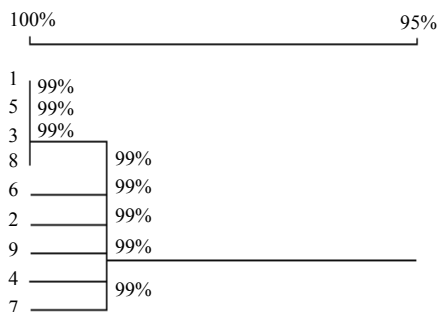


图 3 不同种质来源孩儿参 ITS 序列的同源树

Fig. 3 Homology tree for ITS sequence of *P. heterophylla* from different idioplasms

几种方法构建的系统树结果的一致性将提高研究结果的可靠性。

来自山东临沂的孩儿参都是处于系统发育树的末端，说明其在历史上出现的最晚，属于其中最进化的种系，这也说明福建是太子参的道地产地。

4 结语

rDNA ITS 在核中是多拷贝的重复序列，大多数被子植物的 ITS 序列由于同步进化的力量，众多拷贝已高度相似或一致化，目前该片段已广泛用于探讨植物种内变异和种间、近缘属间分子系统关系的研究，然而在不同的植物类群以及在不同分类等级上，ITS 序列的价值是不一样的，因为不同类群的起源时间及进化（分化）速率不一样，其 ITS 序列所含有的信息量也不同^[11]，如对 *Fouquieria* Kunth (*Fouquieriaceae*) 11 种的研究中，信息位点比例为 6%。系统发生树上来自同一地区的样品并不一定处于同一分组或首先聚类，可能是由于样品分布区广的原因；而来自不同地区的样品也可能处于一组，这可能是由于孩儿参分布区的环境小造成的。由于本研究的不同种质孩儿参覆盖了孩儿参道地产区福建的 8 个样品，在福建取样具有一定的代表性，因此 ITS 序列在孩儿参种内分化活跃，变异位点量丰富，对于探讨孩儿参种内亲缘关系具有一定的意义。

利用核 rDNA ITS 序列对不同种质来源孩儿参的系统发育关系进行分析。认为孩儿参的整个 ITS 长度变异范围为 623~624 bp；其中 ITS1 为 224 bp，G+C 量为 52.91%~54.26%；5.8S rDNA 为 155 bp，

G+C 量为 54.49%~55.13%；ITS2 为 244~245 bp，G+C 量为 55.55%~56.41%。整个 ITS 区共有 17 个变异位点，ITS1、ITS2 和 5.8S 的变异位点分别为 7、7 和 3 个；序列间的遗传距离为 0.003~0.013。

9 个不同种质来源孩儿参的 ITS 区变异稳定，变异位点共 17 个（2.72%），5.8S rDNA 其长度均 155 bp，有 3 个变异位点；各样品的序列同源性均在 99.9% 以上；系统发育分析表明 9 个样品的最大遗传距离为 0.013。上述结果说明不同种质来源孩儿参的变异是不超过一个种的范围内的变异。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 黄璐琦, 肖小河, 马小军, 等. 分子生药学 [M]. 北京: 北京医科大学-中国协和医科大学联合出版社, 2000.
- [3] 朱 艳, 秦民坚, 杭悦宇. 太子参脱病毒苗的核糖体 ITS 序列研究 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 599-601.
- [4] 朱 艳, 秦民坚, 杭悦宇, 等. 太子参及其混伪品的 rDNA 的 ITS 区序列分析及鉴别 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 211-216.
- [5] 余永邦, 秦民坚, 梁之桃, 等. 不同产区太子参的 rDNA ITS 区序列的比较 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 1-5.
- [6] Lee S B, Rasmussen S K. Molecular markers in some medicinal plants of the Apiaceae family [J]. *Euphytica*, 2000, 114: 87-91.
- [7] Adimoelja A. Phytochemicals and the break through of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions [J]. *Int Jandrol*, 2000, 23(Suppl 2): 82-84.
- [8] Eric S, Christiaan V, Jacqueline B. Molecular analysis of ectomycorrhizal basidiomycete communities in a *Pinus syvestris* L. stand reveals long-term increased diversity after removal of litter and humus layers [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 45: 49-57.
- [9] Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics* [M]. New York: Oxford University Press Inc, 2000.
- [10] Renske L, Paula L, Thomw K, et al. Molecular identification of Ectomycorrhizal Mycelium in Soil Horizons [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 327-333.
- [11] 唐宝莲, 辛绍祺, 蔡宝昌, 等. 太子参 HPLC 指纹图谱的初步研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(3): 171-173.