

不同产地菊苣的 ITS 序列分析及模式识别研究

周俊¹, 张冰^{1*}, 吴丽丽², 林志健¹, 朱文静¹, 孙博喻¹, 王红坡¹

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 赣州市人民医院 药剂科, 江西 赣州 341000

摘要: 目的 通过分析不同产地菊苣 *Cichorium intybus* 和毛菊苣 *C. glandulosum* 核糖体基因内部转录间隔区 (ribosomal DNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS) 序列, 为菊苣药材鉴定和品种鉴别提供 DNA 分子标记。方法 采用广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取 14 个产地的菊苣和毛菊苣样品的总 DNA, 利用 ITS 序列扩增通用引物 PCR 扩增 rDNA-ITS 序列并测序。运用 DNAMAN V6 软件比较两品种菊苣样品 ITS 序列的差异。所有样品 ITS 序列上的差异碱基经数学处理后使用 SPSS 17.0 软件对其进行聚类分析。结果 菊苣 ITS 序列种内相似度基本上在 99.2% 以上, 毛菊苣 ITS 序列种内相似度在 99.8% 以上, 而两品种间 ITS 序列相似度在 99.2% 以下。两品种菊苣的 ITS 序列上分别有多个特异性信息位点。聚类分析实现了两品种菊苣 ITS 序列差异的识别。结论 rDNA-ITS 序列是菊苣和毛菊苣药材鉴定和品种鉴别的有效分子标记。

关键词: 菊苣; 毛菊苣; ITS 序列; 鉴定; 聚类分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)13-1823-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.023

ITS sequence analysis and gene pattern recognition of *Cichorium intybus* from different habitats

ZHOU Jun¹, ZHANG Bing¹, WU Li-li², LIN Zhi-jian¹, ZHU Wen-jing¹, SUN Bo-yu¹, WANG Hong-po¹

1. College of Pharmacology, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Department of Pharmacy, The People's Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000, China

Abstract: Objective To analyze the ribosomal DNA internal transcribed spacer (rDNA-ITS) sequence of *Cichorium intybus* and *C. glandulosum* from different habitats, and to provide DNA molecular marker for the identification of chicory. **Methods** The total DNA was extracted from the samples of *C. intybus* and *C. glandulosum* from 14 habitats by rapid broad spectrum of plant genomic DNA extraction kit. The ITS sequence was amplified by PCR with universal primer of ITS and then sequenced. The two kinds of ITS sequences were compared by DNAMAN V6 software. The cluster analysis was adopted by SPSS 17.0 after the different ITS bases from all the samples were mathematically treated. **Results** The intraspecies identity of ITS sequence was above 99.2% in *C. intybus*, and that in *C. glandulosum* was above 99.8%, while the interspecies identity of ITS sequence was below 99.2%. There were various specific information sites in the ITS sequences of the two kinds of chicory. **Conclusion** The ITS sequence is an available molecular marker for the identification of *C. glandulosum* and *C. intybus*.

Key words: *Cichorium intybus* L.; *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet; internal transcribed spacer sequence; identification; cluster analysis

菊苣为菊科植物毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet 或菊苣 *C. intybus* L. 的干燥地上部分或根^[1]。为维吾尔族习用药材, 主要分布于我国东北、西北和华北地区, 新疆各地均有分布。《中国药典》2010年版对菊苣真伪及品种鉴别仅限于性状鉴别、显微鉴别及理化鉴别, 然而仅

用这些方法较难清楚地区分市场上菊苣的品种和真伪^[2]。ITS 序列是位于 rDNA 编码基因 18S、5.8S 和 28S 之间的小基因片段。ITS 序列分析技术从诞生之初便被广泛应用于药用植物资源鉴定^[3-5]。目前, 国外已有利用 ITS 序列研究菊苣属植物形态学分类的相关报道^[6], 而国内对菊苣和毛菊苣 ITS 序

收稿日期: 2013-01-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073068, 81274153); 国家教育部博士点基金 (20120013130002); 北京中医药大学科研创新团队项目 (2011-CXTD-14); 国家级教学团队建设项目 (07td010); 北京市优秀教学团队建设项目 (2007012)

作者简介: 周俊 (1989—), 男, 硕士, 研究方向为中药质量评价。E-mail: wzmczhoujun@163.com

*通信作者 张冰, 教授、主任医师。Tel: (010)64286335 E-mail: zhangbing6@263.net

列的研究尚未展开。本研究对 14 个产地的菊苣样本,采用 PCR 扩增以及测序技术进行了 rDNA-ITS 序列的测定,用 DNAMAN 和 SPSS 软件对菊苣 ITS 序列进行分析,为菊苣的资源鉴定、品种识别提供新思路。

1 材料

本实验所用的材料采自全国菊苣的主要产区或购自药材市场,实验药材均经北京中医药大学中药学院中药鉴定系闫永红教授鉴定为菊科植物菊苣 *Cichorium intybus* L. 或毛菊苣 *C. glandulosum* Boiss. et Huet, 来源见表 1。

表 1 材料来源

Table 1 Sources of materials

编号	药材品种	药材来源	采集时间
M1	毛菊苣	新疆昌吉	2012-08
M2	毛菊苣	新疆墨玉	2012-08
M3	毛菊苣	新疆和田	2010-05
M4	毛菊苣	中国药品生物制品检定研究院	2012-08
J1	菊苣	新疆乌鲁木齐	2011-04
J2	菊苣	北京顺义	2012-07
J3	菊苣	河北平山	2012-07
J4	菊苣	辽宁辽阳	2011-07
J5	菊苣	黑龙江黑河	2011-04
J6	菊苣	内蒙古	2011-04
J7	菊苣	山东寿光	2011-06
J8	菊苣	山东泰安	2010-05
J9	菊苣	山东郓城	2012-06
J10	菊苣	山东沂蒙	2011-04
J11	菊苣	贵州贵阳	2011-06

2 方法

2.1 总 DNA 提取

采用北京博迈德科技发展有限公司的广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取样品的总 DNA。1%琼脂糖电泳检测。-20 °C 冰箱保存,备用。

2.2 PCR 扩增和产物纯化

采用 rDNA-ITS 区的通用引物 P1 及 P4^[7] 进行该序列扩增,引物序列为 P1: 5'-AGAAGTCGTAAC-AAGGTTTCCGTAGG-3' 位于 18S 上; P4: 5'-TCC-TCCGCTTATTGATATGC-3' 位于 26S 上。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

扩增反应在 Biometra 公司的 Tprofessional 型 PCR 仪上进行,反应体系体积均为 50 μL,包括上下游引物各 1.0 μL (10 μmol/L), dNTP (25 mmol/L) 4 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μL, 10×PCR 缓冲液 5 μL,

模板 2 μL (约 100 ng), 加超纯水至 50 μL。PCR 扩增程序为 95 °C 预变性 7 min, 95 °C 变性 45 s, 57 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 60 s, 40 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。用切胶回收方式进行 PCR 产物的纯化。

2.3 PCR 产物 ITS 序列的测定

经北京博迈德科技发展有限公司 ABI 3730 XL DNA 测定仪,以 P1、P4 引物为测序引物,进行 DNA 序列的正向和反向测定,以保证测定序列的准确性。

2.4 样品 ITS 序列分析

ITS 序列的范围参照 GenBank 上菊苣 (AJ746388.1) 序列,确定样品 ITS1、ITS2 和 5.8S 的边界。用 DNAMAN V6 软件进行同源性分析及序列比对。碱基经数学处理后用 SPSS 17.0 软件进行聚类分析。

3 结果与分析

3.1 PCR 产物的电泳检测

4 批毛菊苣和 11 批菊苣的 DNA 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析均有一条明亮条带,表明扩增方法可行,见图 1。

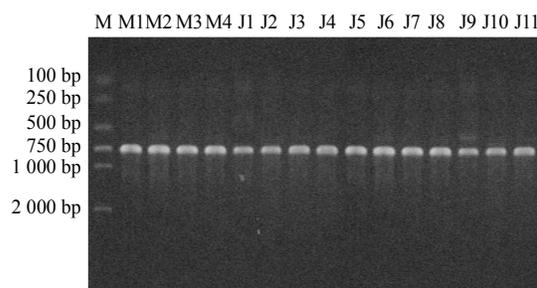


图 1 毛菊苣和菊苣 PCR 扩增产物电泳

Fig. 1 PCR amplification electrophoresis of *C. glandulosum* and *C. intybus*

3.2 菊苣的 ITS 序列

3.2.1 ITS 序列的长度和变异 菊苣完整的 ITS 序列长度范围为 640~641 bp, ITS-1 为 255 bp, 5.8S rDNA 为 163 bp, ITS-2 为 223~224 bp, ITS-1 (GC) 量在 53.8%~54.5%, ITS-2 (GC) 量在 57.1%~58.1%, 5.8S (GC) 量为 55%。共有 13 个碱基位点发生了变异,其中 5 个位点为碱基颠换,1 个碱基缺失,另外 7 个位点为碱基转换。ITS-1 有 7 个变异位点,ITS-2 变异位点有 6 个,5.8S 无变异位点,具体差异位点见表 2。

表 2 各样品 ITS 序列差异
Table 2 Difference of ITS sequence of samples

编号	ITS 序列位点差异												
	61 bp	69 bp	79 bp	141 bp	198 bp	206 bp	209 bp	228 bp	428 bp	511 bp	579 bp	581 bp	582 bp
M1	C	T	C	A	G	C	C	G	C	C	G	G	A
M2	C	T	T	A	G	C	C	G	C	C	G	G	A
M3	C	T	C	A	G	C	C	G	C	C	G	G	A
M4	C	T	T	A	G	C	C	G	C	C	G	G	A
J1	T	G	C	G	A	C	T	A	C	C	G	G	A
J2	T	G	C	G	A	C	T	A	C	A	G	T	T
J3	T	G	C	G	G	C	T	A	C	C	A	G	A
J4	T	G	C	G	A	C	T	A	C	A	G	T	T
J5	T	G	C	G	G	C	T	A	C	C	G	G	A
J6	T	G	C	G	G	C	T	A	—	C	A	G	A
J7	T	G	C	G	A	C	T	A	C	A	G	T	T
J8	T	G	C	G	G	C	T	A	—	C	A	G	A
J9	T	G	C	G	G	A	T	A	—	C	A	G	A
J10	T	G	C	G	A	C	T	A	C	A	G	G	A
J11	T	G	C	G	C	C	T	A	C	C	A	G	A

“—”表示该位点碱基缺失

“—”refers to base deletion on this site

3.2.2 ITS 序列的相似度 菊苣各样品 ITS 序列的碱基相似度在 99.1%~100%，毛菊苣各样品 ITS 序列的碱基相似度在 99.8%~100%。毛菊苣各样品与菊苣各样品 ITS 序列的碱基相似度在 98.4%~99.2%。由此看出，菊苣或毛菊苣的 rDNA-ITS 序列在种内保守，而在属间差异相对较大。

3.3 不同产地菊苣 ITS 序列特异性鉴别位点

3.3.1 特异性鉴别位点的确认 通过对所用样品的 ITS 序列分析发现，在第 61、69、141、209、228 bp 位置上，不同物种的碱基存在不同程度的转换和颠换，结果见表 2。这些种内稳定、种间存在差异的位点为菊苣和毛菊苣的特异性鉴定位点。

3.3.2 特异性鉴别位点的 GenBank 比对 将特异性碱基位点与 GenBank 中已有的菊苣(AJ746388.1, AJ746374.1, AJ746375.1, AJ746376.1, AJ746377.1, AJ746378.1, AJ746379.1, AJ746410.1, AJ746409.1, AJ746408.1, AJ746407.1, AJ746406.1, AJ746405.1, AJ746404.1, AJ746403.1, AJ746402.1, AJ746401.1, AJ746400.1, AJ746399.1, AJ746398.1, AJ746397.1, AJ746396.1, AJ746395.1) 和野生菊苣 *C. pumilum* J. (AJ746381.1, AJ746382.1, AJ746383.1, AJ746384.1, AJ746385.1, AJ746386.1, AJ746389.1, AJ746390.1, AJ746391.1, AJ746392.1) 相应的 ITS 位点对比。所有特异性位点都与 GenBank 中相应品种菊苣对应位点碱基相符合。《中国植物志》收载野生菊苣与毛菊

苣为同种植物，因此用野生菊苣代替毛菊苣进行生物信息学分析。

3.4 基于 ITS 序列的模式识别

将表 2 中的信息位点经数学处理后导入 SPSS 软件，采用类内均锁链法 (average linkage)，以欧氏距离 (Euclidean distance) 法为度量标准，建立样品间 ITS 序列相似性聚类，结果见图 2。当聚类距离在 21 时，样品聚为 2 类，菊苣聚为一类，毛菊苣聚为一类。根据聚类图又可以将菊苣进一步的划分为 2 类，J2、J4 和 J7 归为一类，其他产地的菊苣归为一类。

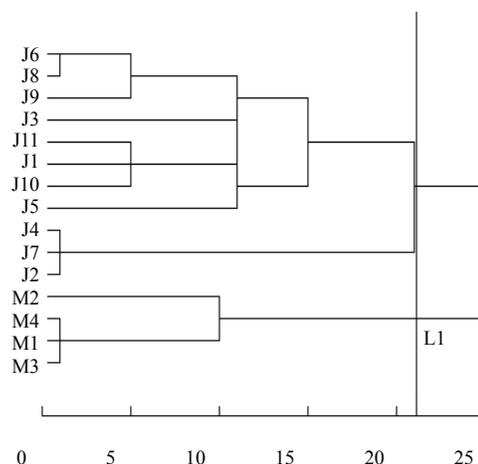


图 2 基于 ITS 序列的菊苣聚类分析结果

Fig. 2 Clustering analysis of chicory based on ITS sequence

4 讨论

4.1 菊苣的 ITS 序列特征

由分析结果可知,毛菊苣种内遗传距离非常小(0~0.002),而菊苣种内遗传距离稍大(0~0.009),且与菊苣种间遗传距离(0.008~0.060)有交叉。造成菊苣种内最大遗传距离稍大于菊苣种间最小遗传距离可能有两方面,一方面,研究所用菊苣地域分布广,造成了其种内最大遗传距离偏大,另一方面,菊苣 ITS 序列变异小(共 13 个差异位点),造成了其种间最小遗传距离偏小。因此,单用遗传距离鉴别菊苣品种有一定的局限性,需结合特异性鉴别位点或聚类分析来判断菊苣品种。中药菊苣资源分布广阔,产地因素和品种因素共同引起 ITS 序列的变化,产地因素可造成碱基的颠换、转换甚至缺失,但 ITS 序列相对稳定,不同产地同一品种菊苣 ITS 序列差异均小于 1%。

4.2 ITS 序列在鉴别菊苣品种中的意义

rDNA-ITS 序列是近年来探讨植物种内变异和种间、近缘属间分子系统关系的重要分子标记之一。本研究将该序列用于中药菊苣的品种鉴定中,通过对药典记载品种菊苣、毛菊苣序列对位排列分析表明,不同品种的菊苣有特异性的变异位点,这些位点在两品种间非常稳定。通过对待测样品 ITS 序列与已知菊苣 ITS 序列相似度,并结合第 61、69、141、209、228 bp 位置上的特异性鉴定位点,就可以确定其为菊苣或毛菊苣。

4.3 ITS 序列用于中药品种鉴别的研究思路

中药品种鉴定是中药研究的重要组成部分,中药品种混乱问题目前普遍存在,直接影响到药材的质量和人民的用药安全。因此,采用科学有效的方法对容易混淆品种进行鉴定具有重要的现实意义。ITS 序列分析从分子水平理清中药的遗传背景,与传统中药品种鉴定方法相比有一定的优势^[8]。

结合本实验的研究,ITS 序列用于中药品种鉴定的步骤总结如下:(1)以通用引物对待测样品所提取的总 DNA 进行扩增,扩增产物经纯化后进行测序,根据 GenBank 中该中药某一品种已知 ITS 序列确定待测样品 ITS 序列边界;(2)将待测样品 ITS 序列与 GenBank 中该中药某一品种已知 ITS 序列比对,根据相似度结果判断其是否属于该类中药;(3)如果已知该类中药 ITS 序列上特异性鉴别位点,则通过特异性鉴别位点判断其具体属于哪一种中药;如果尚无该中药 ITS 序列特异性鉴别位点的研究报告,则通过其与 GenBank 中该中药所有品种已知 ITS 序列的聚类分析结果进行品种识别。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 北京药品生物制品检定所. 中国民族药志 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984.
- [3] 孙稚颖, 陈士林, 姚 辉, 等. 基于 ITS2 序列的美活及其混伪品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 568-571.
- [4] 张宏意, 石祥刚. 不同产地何首乌的 ITS 序列研究 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 911-914.
- [5] 曾 明, 马雅军, 郑水庆, 等. 中药葛根及其近缘种的 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(3): 173-175.
- [6] Annemieke M K, Ted H M M, Ruud V D M, *et al.* Morphologically defined *Cichorium* (Asteraceae) species reflect lineages based on chloroplast and nuclear (ITS) DNA data [J]. *Syst Bot*, 1999, 24(4): 645-659.
- [7] 丁 平, 方 琴. 巴戟天与常见混伪品的 rDNA-ITS 序列分析及其分子鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 908-911.
- [8] Yang Z Y, Chao Z, Huo K K, *et al.* ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(6): 416-423.