

## 不同居群草珊瑚的 ITS 序列分析及模式识别研究

魏艺聪<sup>1</sup>, 陈莹<sup>2</sup>, 牛广俊<sup>1</sup>, 罗林泉<sup>1</sup>, 杨群雄<sup>1</sup>, 陈艺娟<sup>1</sup>, 梁一池<sup>1\*</sup>

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122
2. 福建农林大学园林学院, 福建 福州 350002

**摘要:** 目的 通过分析不同居群草珊瑚 *Sarcandra glabra* 和金粟兰属 5 种近缘植物的核糖体基因内部转录间隔区 (rDNA-ITS) 序列, 为草珊瑚鉴定和品种鉴别提供模式识别与思路。方法 采集不同产地的草珊瑚 18 份、金粟兰 6 份, 所有样品提取总 DNA, 并对其 ITS 片段进行扩增、测序, 并搜索 GenBank 数据库中收录的其他 4 种金粟兰属植物的 ITS 序列, 运用 ClustalX 2.1 软件比较不同产地草珊瑚与其他金粟兰属植物的 ITS 序列差异, 并对其进行聚类分析。结果 草珊瑚样品不同居群间的 ITS 序列相似度达 99%, 其中位点总突变率 ITS1 (2.7%) > ITS2 (1.4%), 而与金粟兰属其他植物相比, 位点总突变率 ITS2 (20.3%~22.7%) > ITS1 (15.9%~18.3%)。聚类分析表明 18 个不同种群的草珊瑚居群间变异极小, 且与金粟兰属 5 种近缘植物具有显著差异的聚类识别。结论 草珊瑚 ITS1 与 ITS2 分别为不同居群间及与不同属近缘植物间比较有效的鉴别序列, 具有较多个特异性信息位点的草珊瑚 ITS 序列用于鉴别金粟兰属 5 种近缘植物, 具显著差异的聚类识别, 是草珊瑚和金粟兰属近缘植物鉴定和品种鉴别的有效分子标记。

**关键词:** 草珊瑚; 金粟兰; ITS 序列; 品种鉴别; 聚类分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)20-2982-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.021

## Sequences analysis and pattern recognition of ITS in *Sarcandra glabra* from different areas

WEI Yi-cong<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>2</sup>, Niu Guang-jun<sup>1</sup>, LUO Lin-quan<sup>1</sup>, YANG Qun-xiong<sup>1</sup>, CHEN Yi-juan<sup>1</sup>, LIANG Yi-chi<sup>1</sup>

1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China
2. College of Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

**Abstract: Objective** To study the ribosomal DNA internal transcribed spacer (rDNA-ITS) sequences of *Sarcandra glabra* from different areas and five plants in *Chloranthus* Swartz, and to provide pattern recognition and thread for the species identification of *S. glabra*. **Methods** The ITS sequences of 18 populations of *S. glabra* and six populations of *Chloranthus spicatus* were amplified by PCR with universal primer of ITS and sequenced, and the ITS sequences of the other plants in *Chloranthus* Swartz were searched in GeneBank. Data were analyzed by ClustalX 2.1, and a cluster analysis was presented by UPGMA. **Results** The semblance of ITS sequences of *S. glabra* from different areas was 99%. The total mutation rate of ITS1 sequence (2.7%) was higher than that of ITS2 sequence (1.4%). However, compared with other plants in *Chloranthus* Swartz, the total mutation rate of ITS2 sequence (20.3%—22.7%) was higher than that of ITS1 sequence (15.9%—18.3%). The cluster analysis showed that there was little variation among the 18 populations of *S. glabra*, but there was significant difference with the five plants of *Chloranthus* Swartz. **Conclusion** ITS sequence can be used to identify the plants from different areas and in different genus, ITS sequence of *S. glabra* has several specified information sites to identify the five plants in *Chloranthus* Swartz, with significantly different cluster analyseis, and is the active molecular marker for the species identification of *S. glabra* and plants in *Chloranthus* Swartz.

**Key words:** *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai; *Chloranthus spicatus* (Thunb.) Makino; ITS sequence; species identification; cluster analysis

草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 是一种广谱中药材, 全株可入药, 具有很高的药用价值。《中国药典》2010 年版列为法定药材使用, 还被广泛应

用于保健品、饮料、食品、日用化工等方面, 草珊瑚原料需求的不断增加, 市场前景十分广阔<sup>[1]</sup>。其近缘植物有金粟兰属的金粟兰 *Chloranthus spicatus*

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 福建省教育厅 A 类项目 (JA11138); 福建省科技重大项目 (2011Y4005)

作者简介: 魏艺聪 (1981—), 男, 讲师, 研究方向为中药生物技术。E-mail: yicongwei@126.com

\*通信作者 梁一池, 教授, 博士生导师, 主要从事中药材品质评价与质量标准研究。E-mail: fafulyc@126.com

(Thunb.) Makino、及己 *C. serratus* (Thunb.) Roem et Schult、宽叶金粟兰 *C. henryi* Hemsl、四川金粟兰 *C. sessilifolius* K. F. Wu、台湾金粟兰 *C. oldhamii* 等,形态极其相似,容易误采、误用,是与草珊瑚功效不尽相同的非药典收载的混淆品。而且金粟兰属植物多具有一定的肝毒性<sup>[2]</sup>。因此对草珊瑚种源的分类、鉴定和种群遗传关系研究具有重要的应用价值。

核糖体 DNA 中的 18 S、5.8 S、28 S 基因组序列在大多数生物中趋于保守,在生物种间变化小,而内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)中的 ITS1 和 ITS2 作为非编码区,承受的选择压力较小,相对变化较大,并且能够提供详尽的系统学分析所需要的可遗传性状。通过 ITS 序列分析可以反映生物体在遗传上的变异,从分子水平理清其遗传背景<sup>[3]</sup>,克服了传统研究方法的弱点,提高了药用植物种质资源研究的水平,为确定科学有效的保护策略和恢复措施提供依据。近年 ITS 已被广泛用于药用植物品种鉴定<sup>[4-5]</sup>、亲缘关系确定<sup>[6-7]</sup>、遗传多样性分析<sup>[8]</sup>等方面。本实验测定并分析了草珊瑚 18 个居群植物和金粟兰 6 个居群的 ITS1、5.8 S、ITS2 全长序列,并搜索 GenBank 数据库中收录的其他金粟兰属植物的 ITS 序列,探讨了草珊瑚及其他金粟兰属植物 ITS 序列的变异情况,为草珊瑚的资源鉴定、品种识别提供新思路。

## 1 仪器与材料

PCR 仪(Eppendorf,型号 5332),电泳系统(北京市六一仪器厂,型号 DYY-12),低温冷冻离心机(Eppendorf,型号 5810R),凝胶成像分析仪(BIO-RAD ChemiDoc XRS),微量移液器(Eppendorf)。

CTAB 提取液, TAE 缓冲液, 琼脂糖(Promega 公司), 溴化乙锭(Fluka 公司), DNA Taq 聚合酶(Takara 公司), 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇均为国产分析纯。

本研究实验样品是由福建中医药大学梁一池教授鉴定并收集的采自不同产地的 18 批样品,为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai, 集中种植于福建中医药大学时珍园, 金粟兰属其他植物则分别被鉴定并收集于福建中医药大学时珍园、漳州卫生职业学院与福建省热带作物科学研究所。并进行了随机的编号,来源见表 1。

## 2 方法

### 2.1 草珊瑚基因组 DNA 的提取和纯化

采取样品的嫩叶,采用本研究室改良的 CTAB 法提取草珊瑚幼嫩叶片的基因组 DNA<sup>[9]</sup>,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。然后对所提取的草珊瑚 DNA 进行纯化。

### 2.2 ITS 序列 PCR 扩增与测序

设计 ITS 通用引物(ITSF: 5'-AGGTGAACCTG CGGAAGATCATTGT-3';ITSR: 5'-GGTGGCCCCG-CCTGACCT-3')对草珊瑚、金粟兰样品进行 PCR 扩增,扩增序列的通用反应体系:总体积 20  $\mu$ L,其中包括 10 $\times$ 缓冲液 2.0  $\mu$ L, dNTP 20 nmol, 2  $\mu$ mol/L 引物各 2  $\mu$ L, Taq 酶 1 U, DNA 20 ng, 灭菌蒸馏水 12.8  $\mu$ L。PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。获得 PCR 产物通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,并用 EB 染色观察。扩增产物回收后,经华大基因公司测序,获得 24 条 ITS 序列;并于 GenBank 数据库中搜索其他金粟兰属植物的 ITS 序列信息,获得及己(AF280412.1)、宽叶金粟兰(AF280415.1)、四川金粟兰(AF280413.1)、台湾金粟兰(AF280414.1) ITS 序列。

### 2.3 数据统计及分析

所有 ITS 序列用 ClustalX 2.1 软件对所有序列进行多重比较,并进行 UPGMA 分析其遗传距离,建立聚类图谱,并用 Genedoc 软件分析 ITS 序列变异情况,用 Treeview 软件分析聚类结果。

## 3 结果

### 3.1 序列测定结果

所获得 ITS 序列,根据 Genebank 中已公布的草珊瑚与金粟兰 ITS 的序列(AF280408.1、AF280411.1)确定 rDNA 内转录区间 ITS1 和 ITS2 与 3 个编码区 18 S、5.8 S、26 S 的界限。测得草珊瑚 18 个样品和金粟兰属 6 个样品的 ITS1、5.8 S rDNA 和 ITS2 全序列分别为 663、658 bp。其中草珊瑚 ITS1 长度为 289 bp,5.8 S rDNA 序列长度为 163 bp,ITS2 序列长度为 211 bp;ITS1 的(G+C)量在 58.13%~59.17%,ITS2 的(G+C)量在 56.87%~57.15%。金粟兰 ITS1 长度为 290 bp,5.8 S rDNA 序列长度为 163 bp,ITS2 序列长度为 205 bp。ITS1 的(G+C)量在 55.52%~56.21%,ITS2 的(G+C)量均为 54.63%,见表 1。

表 1 草珊瑚及金粟兰属植物样品信息及 rDNA 序列特征

Table 1 Samples information and characteristics of rDNA sequences of *S. glabra* and *C. spicatus*

编号	名称	经度 / 纬度	ITS1		ITS2	
			长度 / bp	(G+C) / %	长度 / bp	(G+C) / %
S1	草珊瑚 <i>Sarcandra glabra</i>	118°12'/26°58'	289	59.17	211	56.87
S2		118°17'/26°64'	289	58.48	210	57.15
S3		118°29'/25°32'	289	59.17	211	56.87
S4		118°17'/25°05'	289	58.83	211	56.87
S5		114°71'/23°74'	289	58.13	211	56.87
S6		117°45'/26°25'	289	58.83	211	56.87
S7		119°32'/26°17'	289	58.48	211	56.87
S8		114°94'/25°80'	289	58.83	211	56.87
S9		116°50'/25°31'	289	58.83	211	56.87
S10		117°45'/26°17'	289	58.82	211	56.87
S11		117°35'/26°33'	289	58.48	211	56.87
S12		116°77'/25°70'	289	58.48	211	56.87
S13		117°55'/30°00'	289	58.83	211	56.87
S14		117°30'/24°35'	289	58.83	211	56.87
S15		117°41'/25°29'	289	58.83	210	57.15
S16		118°97'/25°85'	289	58.83	210	57.15
S17		118°13'/27°33'	289	58.83	211	56.87
S18		119°06'/26°08'	289	58.83	211	56.87
C1	金粟兰 <i>Chloranthus spicatus</i>	119°06'/26°08'	290	55.52	205	54.63
C2		119°23'/25°42'	290	55.97	205	54.63
C3		119°23'/25°42'	290	56.21	205	54.63
C4		118°97'/25°85'	290	55.87	205	54.63
C5		118°97'/25°85'	290	56.21	205	54.63
C6		118°97'/25°85'	290	55.87	205	54.63
C7	及己 <i>C. serratus</i>	—	291	55.33	205	53.71
C8	宽叶金粟兰 <i>C. henryi</i>	—	291	54.99	205	52.20
C9	四川金粟兰 <i>C. sessilifolius</i>	—	291	53.95	205	54.63
C10	台湾金粟兰 <i>C. oldhamii</i>	—	286	53.49	205	51.22

3.2 草珊瑚 ITS 序列变异情况及与其他金粟兰属植物 ITS 序列鉴别位点分析

测序结果显示, ITS1 区前 100 bp 段第 34、53、54 位点突变的样品有 S1、S5、S7 3 个样品。利用 ClustalX 2.1 及 Genedoc 软件分析得到草珊瑚 18 个样品 ITS 序列间的变异情况, 见表 2。

Genedoc 软件分析显示 18 个草珊瑚受试样品相互间 ITS 序列相似度达 99%, 18 个草珊瑚受试样品共有 11 个变异位点, 占 663 bp ITS 序列 1.6%, 其中 8 个位点在 ITS1 区 289 bp 占 2.7%, 3 个位点在 ITS2 区 211 bp 占 1.4%。其中 222 bp 位点的变异性较大, 18 个样品中有 4 个样品有变异, 34 bp 和 634 bp 在 18 个样品中均有 2 个样品有变异, 而其余位点都仅有 1 个位点的变异。11 位点变异中, 3 个位

点为碱基颠换, 2 个碱基缺失, 另外 6 个位点为碱基转换, 受试样品中草珊瑚 ITS2 序列比 ITS1 序列稳定, 变异位点较少。

同时对草珊瑚与金粟兰属植物的 ITS 序列变异情况进行分析显示, 在 ITS1 区, 草珊瑚与金粟兰、及己、宽叶金粟兰、四川金粟兰、台湾金粟兰的变异位点分别达 46、49、47、48、53 个, 而在 ITS2 区, 分别达 47、43、43、48、45 个。因此, 草珊瑚与其他 5 种金粟兰属植物在 ITS1 和 ITS2 均有较多位点的变异, 其中在 ITS1 区变异位点达 46~53 个位点, 占 289 bp ITS1 序列的 15.9%~18.3%, 在 ITS2 区变异位点达 43~48 个位点, 占 211 bp ITS2 序列的 20.3%~22.7%。除去其中个别草珊瑚不用种群间的变异位点, 这些位点都可以用于草

表 2 草珊瑚样品 ITS 序列差异  
Table 2 Differences in ITS sequence of samples

编号	ITS 序列位点差异 / bp										
	34	53	54	101	148	181	222	248	589	627	634
S1	C	C	A	T	C	A	G	C	G	T	T
S2	C	A	T	T	C	A	A	C	G	T	—
S3	C	A	T	C	C	G	A	C	C	T	T
S4	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T
S5	T	A	T	T	C	A	A	C	G	T	T
S6	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T
S7	T	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T
S8	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T
S9	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T
S10	C	A	T	T	C	A	G	G	G	T	T
S11	C	A	T	T	C	A	A	C	G	T	T
S12	C	A	T	T	T	A	G	C	G	T	T
S13	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T
S14	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T
S15	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	—
S16	C	A	T	T	C	A	G	C	G	—	T
S17	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T
S18	C	A	T	T	C	A	G	C	G	T	T

珊瑚与金粟兰属植物的分子鉴别，以上数据表明 ITS2 提供更多位点将草珊瑚区别于其他 5 种金粟兰植物。综合以上 2 方面的数据表明，草珊瑚 ITS1 序列相对于 ITS2 更适合于草珊瑚属内不同种群的分子鉴别分析，而 ITS2 更适合于草珊瑚属与金粟兰属不同植物的分子鉴别分析。

### 3.3 基于 ITS 序列的模式识别

用 ClustalX 2.1 软件 UPGMA 分析法对表 1 中的所有序列进行聚类分析，建立聚类图谱，并用 Treeview 软件分析表 1 中所有样品间 ITS 序列相似性聚类，结果见图 1。所有样品聚为 2 类，18 个来源于不同产地的草珊瑚聚为一类，其他 5 种金粟兰属植物聚为一类，且其中 6 个来源不同种群的金粟兰聚为一类，而其他 4 种金粟兰属植物又聚为一类。由聚类图可见基于 ITS 序列，来源于不同产地的草珊瑚都可与其他 5 种金粟兰属植物进行基于 ITS 序列变异的分子鉴定。

### 4 讨论

通过 18 个来源于不同产地的草珊瑚 ITS 序列的测序分析表明，ITS 序列碱基变异形式有碱基缺失、碱基颠换与碱基转换 3 种，其中一半以上以碱基转换方式突变。表明草珊瑚的 ITS1 与 ITS2 序列的稳定性在受试的 18 个不同种群中稳定性并不一样，ITS1 的变异性比 ITS2 大，一定程度表明 ITS1 序列

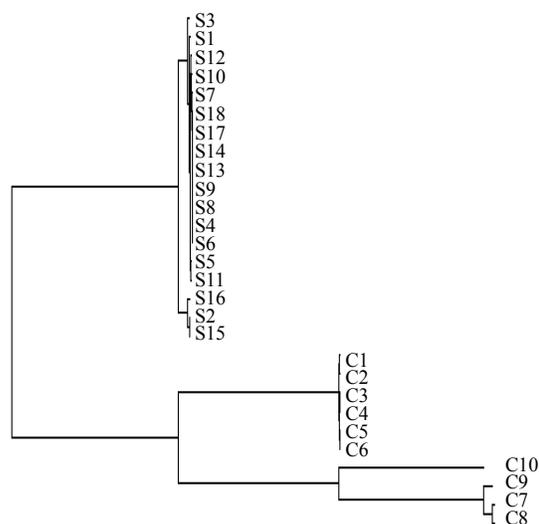


图 1 基于 ITS 的草珊瑚样品与其他 5 种金粟兰的 UPGMA 聚类

Fig. 1 UPGMA clustering of *S. glabra* and five plants in *Chloranthus Swartz* based on ITS

相对于 ITS2 更适合于草珊瑚属内不同种群的分子鉴别分析。而通过比较草珊瑚与金粟兰属 5 种植物的 ITS 序列比较分析表明 ITS1 序列变异 15.9%~18.3%，ITS2 序列变异达 20.3%~22.7%，为草珊瑚鉴别于金粟兰属其他 5 种植物提供丰富的位点。而

草珊瑚 ITS2 在种群内更稳定, 因此, ITS2 更适合于草珊瑚属与金粟兰属不同植物的分子鉴别分析。进一步通过聚类分析, 表明 18 个不同种群的草珊瑚种内变异极小, 且与金粟兰属 5 种植物的种间变异没有交叉, 分别聚为有明显差异的 2 类, 一定程度表明基于 ITS 序列, 来源于不同产地的草珊瑚都可与其他 5 种金粟兰植物进行基于 ITS 序列变异的分子鉴定。

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草珊瑚不同种群及与金粟兰属其他 5 种近缘种的品种鉴定中, 通过对草珊瑚、金粟兰属植物序列的变异位点分析, 为草珊瑚种内变异及其与金粟兰属其他 5 种近缘种的分子鉴定提供思路与分子标记。本研究为如何采用 ITS 序列进行科学有效的对草珊瑚容易混淆的品种进行分子鉴定具有重要的意义, 也为其他中药材分子鉴定有借鉴意义。

#### 参考文献

- [1] 倪开诚, 闵芳, 郭卫东, 等. 采用 ISSR 分子标记进行草珊瑚 8 个种源的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1392-1396.
- [2] 曹聪梅. 中国金粟兰科植物药用亲缘学研究 [D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院, 2009.
- [3] 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.
- [4] Wang H, Kim M K, Kim Y J, *et al.* Molecular authentication of the oriental medicines *Pericarpium citri reticulatae* and *Citri unshius pericarpium* using SNP markers [J]. *Gene*, 2012, 494(1): 92-95.
- [5] Jigden B, Wang H, Kyum K M, *et al.* Authentication of the oriental medicinal plant *Ligusticum tenuissimum* (Nakai) Kitagawa (Korean Go-Bon) by multiplex PCR [J]. *Planta Med*, 2010, 76(6): 648-651.
- [6] Wang H, Kim M K, Kwon W S, *et al.* Molecular authentication of *Panax ginseng* and ginseng products using robust SNP markers in ribosomal external transcribed spacer region [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(5): 972-976.
- [7] Ding G, Zhang D Z, Feng Z Y, *et al.* SNP, ARMS and SSH authentication of medicinal *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and application for identification of Fengdou drugs [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(4): 553-557.
- [8] Zhang F M, Ge S, Chen W L. Phylogeny of the *Aconitum delavayi* complex (Ranunculaceae) based on evidence from nuclear ribosomal ITS sequences [J]. *Acta Phytotaxonomica Sin*, 2003, 41(3): 220-228.
- [9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.