

堇菜属 11 种药用植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析

蒋明^{1,4}, 吴丹², 李嵘嵘³, 管铭^{1,4}, 章燕如⁴

1. 台州学院 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室, 浙江 椒江 318000

2. 杭州市中医院 骨科, 浙江 杭州 310007

3. 台州学院医药化工学院, 浙江 椒江 318000

4. 台州学院生命科学学院, 浙江 椒江 318000

摘要: 目的 通过测定和分析 11 种堇菜属药用植物的核糖体 DNA 内转录间隔区 (rDNA ITS) 序列, 为该属药用植物的分子鉴定提供依据。方法 利用 PCR 法克隆 ITS 序列, 借助生物信息学工具进行序列分析、遗传距离估算和系统发育树构建。结果 11 种堇菜属植物的 ITS 全长为 612~638 bp, ITS1 与 ITS2 的长度为 251~265 bp 和 198~211 bp, 5.8 S 的长度十分保守, 均为 163 bp; ITS1、ITS2 与 5.8 S 的信息位点数分别为 50、23 和 3。11 种堇菜属植物的遗传距离为 0.025~0.137, 紫花堇菜与七星莲的遗传距离最大, 亲缘关系最远; 紫花堇菜和鸡腿堇菜的遗传距离最小, 亲缘关系最近。结论 克隆到堇菜属 11 种药用植物的 ITS 序列, 它们的信息位点丰富, 可用于分子鉴定。

关键词: 堇菜属; rDNA; ITS; 分子克隆; 序列分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)16-2454-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.020

Cloning and analysis of rDNA ITS sequences from 11 medicinal plants in *Viola* L.

JIANG Ming^{1,4}, WU Dan², LI Rong-rong³, GUAN Ming^{1,4}, ZHANG Yan-ru⁴

1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Evolutionary Ecology and Conservation in Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

2. Department of Orthopaedics, Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China

3. College of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

4. College of Life Science, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

Abstract: Objective To provide molecular evidences for identification of medicinal plants in *Viola* L. by determining and analyzing the rDNA internal transcribed spacers (ITS) sequences of 11 species in *Viola* L. **Methods** ITS sequences were isolated using PCR amplification, and sequence analysis, evaluation of genetic distance as well as construction of phylogenetic tree were conducted by bioinformatics software. **Results** Full ITS sequences of 11 plants in *Viola* L. were varied from 612 to 638 bp in length. The lengths of ITS1 and ITS2 were 251—265 bp and 198—211 bp, respectively, while 5.8 S sequences were more conserved with identical length of 163 bp. Parsimony information sites of ITS1, ITS2, and 5.8 S were 50, 23, and 3, respectively. Genetic distance among 11 species in *Viola* L. varied from 0.025 to 0.137, and the greatest genetic distances were observed between *V. grypoceras* and *V. diffusa* var. *brevibarbata*, indicating their relative distinct relationship, and the smallest existed between *V. diffusa* and *V. acuminata*, revealing their closest relationship. **Conclusion** ITS sequences of 11 medicinal plants in *Viola* L. were obtained with a result of rich information sites, which provided a foundation for molecular identification.

Key words: *Viola* L.; rDNA; ITS; molecular cloning; sequence analysis

堇菜属 *Viola* L. 植物为多年生或二年生草本, 稀半灌木, 生于灌丛、路边、林缘和草地, 广布于温带、热带及亚热带, 全世界有 500 余种, 我国有 100 多种, 其中的不少种类具有药用价值, 在民间被广泛使用^[1]。堇菜属药用植物富含类黄酮、香豆

素类、萜类和挥发油等成分, 具有清热解毒、生肌接骨和消肿排脓等功效, 用于治疗跌打损伤、风热咳嗽、咽喉肿痛、无名肿毒、风湿和哮喘等^[2]。堇菜 *Viola verecunda* A. Grey、紫花地丁 *V. philippica* Cav.、鸡腿堇菜 *V. acuminata* Ledeb. 和七星莲 *V. diffusa*

收稿日期: 2015-01-04

基金项目: 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室植物进化生态学人才培养项目 (2014)

作者简介: 蒋明 (1973—), 男, 浙江嵊州人, 博士, 副教授, 研究方向为植物发育生物学及其分子调控。E-mail: jiangming1973@139.com

var. *brevibarbata* Ging. 等都是民间常见的中草药, 如堇菜可全草入药, 具清热解毒、散瘀和止咳功效, 用于治疗疔肿、结膜炎和上呼吸道感染等; 紫花地丁则有凉血消肿、清热解毒和散瘀作用, 可治疗目赤、咽喉肿痛和黄疸性肝炎等^[3-4]。近年来, 有关堇菜属药用植物的研究涉及化学成分、药理作用、资源调查、形态学分类、遗传多样性、组织培养和遗传转化等方面^[5-11]。不同堇菜属药用植物的成分和功效有一定差异, 而在药材市场中常出现混淆现象, 为临床正确应用带来了一定的麻烦。形态学鉴定是中草药识别的常规方法, 但易受基因型、环境和加工程度等因素的干扰。核糖体 DNA 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列因长度保守、信息位点丰富, 在中草药鉴定中有着广泛的应用^[12-14]。本研究以采自浙江的 11 种堇菜属植物为材料, 通过测定和比较它们的 ITS 序列, 以期为该属药用植物的分子鉴定提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

堇菜 *V. verecunda* A. Grey、紫花堇菜 *V. grypoceras* A. Gray、戟叶堇菜 *V. betonicifolia* J. E. Smith、白花堇菜 *V. lactiflora* Nakai、七星莲 *V. diffusa* var. *brevibarbata* Ging.、南山堇菜 *V. chaerophylloides* (Regel) W. Beck.、紫花地丁 *V. philippica* Cav.、鸡腿堇菜 *V. acuminata* Ledeb.、柔毛堇菜 *V. fargesii* H. Boissieu、长萼堇菜 *V. inconspicua* Blume 和辽宁堇菜 *V. rossii* Hemsl. ex Forbes et Hemsl. 均由笔者鉴定, 采集地点和海拔等信息见表 1; 每个物种采集 4 个单株的叶片, 带回实验室后用自来水洗净, 再用无菌水冲洗 2~3 次, 置于-80 °C 低温冰箱中备用。

表 1 堇菜属植物来源

Table 1 Sources of plants in *Viola* L.

编号	植物名称	采集地	海拔/m
1	堇菜	临海尤溪	128
2	紫花堇菜	嵊州甘霖	135
3	戟叶堇菜	临安天目山	245
4	白花堇菜	临安天目山	389
5	七星莲	天台赤城山	233
6	南山堇菜	天台华顶	566
7	紫花地丁	嵊州甘霖	67
8	鸡腿堇菜	临安清凉峰	1 085
9	长萼堇菜	临海括苍山	450
10	辽宁堇菜	天台华顶	760
11	柔毛堇菜	临安天目山	354

1.2 仪器

BIO-RAD C1000 型 PCR 仪; 北京六一 DYY-12 型电泳仪和电泳槽; BIO-RAD Gel Doc XR⁺凝胶成像系统; SANYO MDF-382E 型超低温冰箱; Eppendorf 移液枪; 超净工作台; BECKMAN Allegra 64R 高速冷冻离心机; 37 °C 恒温摇床。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取采用试剂盒法, 试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司 (北京鼎国), 操作根据“新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒”说明书进行。基因组 DNA 经电泳检测后, 置于-20 °C 冰箱中保存备用。

2.2 ITS 序列的克隆、转化和测序

ITS 序列的克隆采用通用引物, 上、下游引物分别为 5'-TATGCTTAAAYTCAGCGGGT-3' 和 5'-AACAAAGGTTTCCGTAGGTGA-3', 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 纯化方式为 PAGE。20 μL 反应体系中依次加入 2 μL 10×PCR 缓冲液 (含 20 mmol/L Mg²⁺)、0.50 μL dNTPs (Genview)、各 0.40 μL 上、下游引物 (20 μmol/L)、35 ng 基因组 DNA 和 0.50 μL 的 Taq DNA 聚合酶 (2 U/μL, 北京鼎国), 最后加无菌 ddH₂O 至终体积。反应在 BIO-RAD C1000 型 PCR 仪上进行, 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 54.8 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环次数为 33。

2.3 PCR 产物的回收、连接和测序

制备 1.2% 琼脂糖凝胶用于 PCR 产物的电泳, 在紫外灯下用洁净刀片割取含目的条带的胶块。DNA 回收采用快速凝胶回收纯化试剂盒 (北京鼎国), 操作根据说明书进行。各取 2 μL 经纯化的目的片段, 用 p-GEM T-easy 试剂盒 (Promega) 连接, 室温放置 2 h, 将连接产物转入 DH5α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选和 PCR 验证后, 每个单株各取 3 份阳性菌液测序。

2.4 序列分析

序列比对采用 ClustalX 1.81 软件^[15]; 系统发育树的构建用 MEGA 3.1 软件^[16], 建树方法为 NJ (Neighbor Joining, 邻接法), 经 1 000 次自举检测。

3 结果与分析

3.1 ITS 序列的克隆

利用通用引物, 用 PCR 方法从 11 种堇菜属植物中克隆到各自的 rDNA ITS 序列。测序结果表明,

每种植物 4 个单株的测序结果完全一致。11 种堇菜属植物的 ITS 序列全长为 612~638 bp, 紫花堇菜和鸡腿堇菜的序列最短, 均为 612 bp, 柔毛堇菜次之, 为 628 bp, 白花堇菜的 ITS 序列最长。ITS1 与 ITS2 的长度为 251~265 bp 和 198~211 bp, 白花堇菜的 ITS1 序列最长, 紫花地丁次之, 为 264 bp, 鸡腿堇菜和紫花堇菜最短; 长萼堇菜的 ITS2 序列最长, 白花堇菜和紫花地丁次之, 为 210 bp, 紫花堇菜和鸡腿堇菜最短。11 种堇菜属植物的 5.8 S 长度均为 163 bp, 与 ITS1 和 ITS2 相比, 长度十分保守 (表 2)。

5.8 S 的 GC 值为 53.4%~54.6%, 堇菜、紫花堇菜、鸡腿堇菜和柔毛堇菜的 GC 值最高, 戟叶堇菜、七星莲、南山堇菜、紫花地丁和辽宁堇菜的 GC 值次之, 均为 54.0%, 白花堇菜和长萼堇菜的最小。ITS1 和 ITS2 的 GC 值均高于 5.8S, ITS1 的 GC 值为 63.4%~68.0%, 柔毛堇菜的 GC 值最大, 堇菜和辽宁堇菜次之, 为 67.2%, 七星莲的 GC 值最小。ITS2 的 GC 值为 60.3%~67.7%, 变异幅度较 ITS1 和 5.8S 大, 鸡腿堇菜的 GC 值最大, 其次为紫花堇菜, GC 值为 67.2%, 七星莲的 GC 值最小 (表 2)。

表 2 堇菜属植物 ITS 序列的长度及 GC 量
Table 2 Sequence length and GC contents of ITS from plants in *Viola* L.

编号	植物名称	ITS 名称	5.8 S		ITS1		ITS2	
			长度/bp	GC/%	长度/bp	GC/%	长度/bp	GC/%
1	堇菜	VvITS	163	54.6	262	67.2	209	62.2
2	紫花堇菜	VgITS	163	54.6	251	66.1	198	67.2
3	戟叶堇菜	VbITS	163	54.0	261	64.8	209	62.2
4	白花堇菜	VhITS	163	53.4	265	66.0	210	62.9
5	七星莲	VdITS	163	54.0	262	63.4	209	60.3
6	南山堇菜	VcITS	163	54.0	261	65.9	209	61.7
7	紫花地丁	VyITS	163	54.0	264	65.9	210	62.9
8	鸡腿堇菜	VaITS	163	54.6	251	65.3	198	67.7
9	长萼堇菜	ViITS	163	53.4	260	65.8	211	62.6
10	辽宁堇菜	VrITS	163	54.0	262	67.2	208	62.0
11	柔毛堇菜	VpITS	163	54.6	259	68.0	206	66.0

3.2 5.8 S 序列的比较分析

利用 ClustalX 1.81 对 11 种堇菜属药用植物的 ITS 序列进行比对, 并借助 MEGA 3.1 计算 5.8S 的变异位点及信息位点。结果表明 (图 1), 11 种堇菜属植物的 5.8 S 序列有 5 个可变位点 (Variable sites), 其中信息位点 (parsimony informative sites)

3 个。戟叶堇菜、七星莲、南山堇菜和辽宁堇菜的 5.8 S 序列完全一致; 堇菜和柔毛堇菜及紫花堇菜和鸡腿堇菜的 5.8 S 序列相同, 与前述 4 种仅一个碱基的差异, 分别位于 132 bp 和 131 bp 处; 白花堇菜和长萼堇菜与前述 4 种也只有一个碱基的差异, 分别在 59 bp 和 122 bp 处。

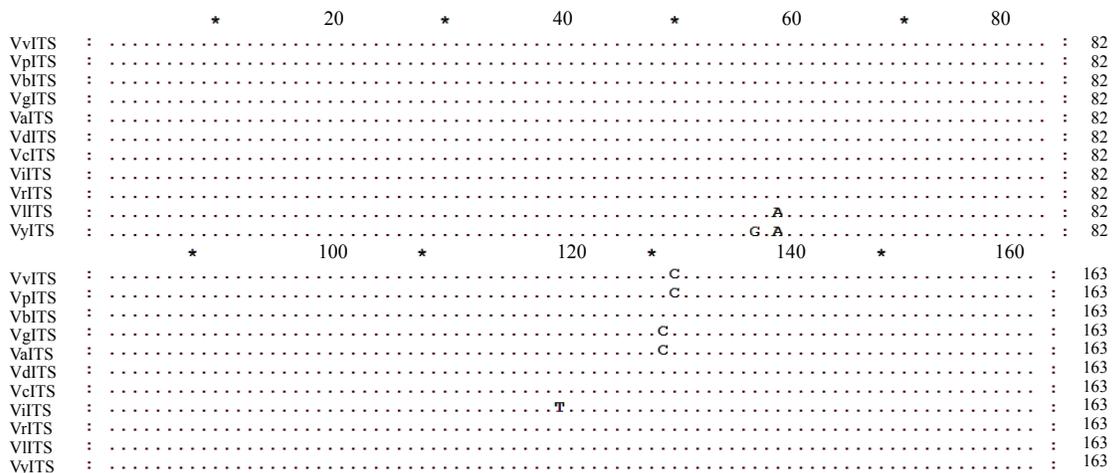


图 1 堇菜属 11 种药用植物的 5.8 S 序列

Fig. 1 5.8 S sequences of 11 medicinal plants in *Viola* L.

3.3 ITS1 和 ITS2 序列的比较分析

11 种堇菜属植物的 ITS1 序列差异较大, 存在转换、颠换、插入或缺失现象。比对结果表明, ITS1 有可变位点 87 个, 信息位点 50 个。紫花堇菜和鸡腿堇菜的序列较其他 9 种短, 在 60~68 bp、75~80 bp 和 263~264 bp 均有缺失现象, 但在 122 bp 有一个碱基的插入; 与白花堇菜相比较, 其他植物在 60

和 66 bp 均有 1 个碱基的缺失; 除紫花地丁和白花堇菜外, 其余物种在 263 和 264 bp 均有 2 个碱基的缺失 (图 2)。ITS1 中, 转换和颠换现象十分普遍, 与其他 10 条序列相比, 七星莲的 7 bp 和紫花地丁的 8 bp 均发生颠换, 碱基由 C 变为 A; 南山堇菜、紫花地丁、戟叶堇菜和长萼堇菜在 35 bp 处发生转换, 碱基由 C 变为 T (图 2)。

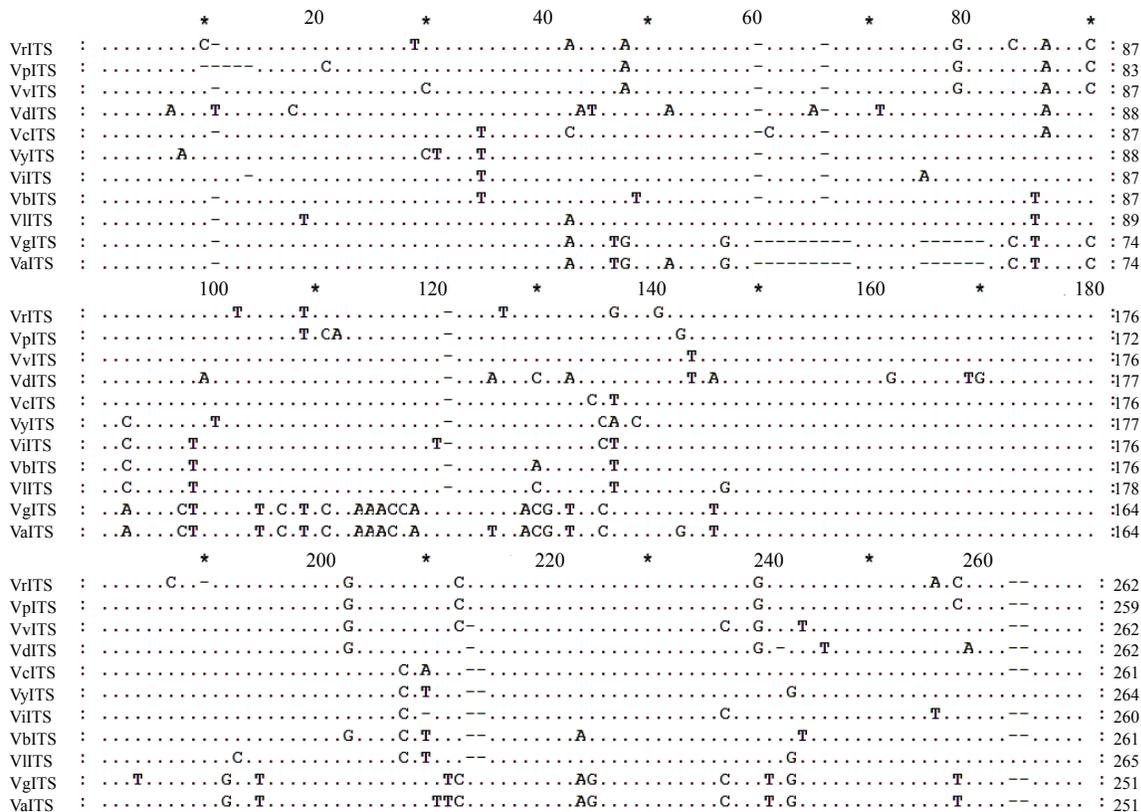


图 2 堇菜属 11 种药用植物的 ITS1 序列

Fig. 2 ITS1 sequences of 11 medicinal plants in *Viola* L.

与 ITS1 类似, 11 种植物 ITS2 序列之间的变异较大, 共有 54 个可变位点, 其中信息位点 23 个。与其他 9 种堇菜属植物相比, 紫花堇菜和鸡腿堇菜有较多的缺失现象, 分别发生在 14~17、34~35、44~48、88~89 和 196 bp 处; 除长萼堇菜外, 其他 10 条序列在 45 和 46 bp 位置有 2 个碱基的缺失; 白花堇菜和紫花地丁在 196 bp 处有 1 个碱基的插入。ITS2 序列的转换与颠换现象也十分普遍, 如柔毛堇菜在 6 bp 处发生颠换, 碱基由 C 变为 A; 戟叶堇菜和南山堇菜在 19 bp 处发生转换, 碱基由 C 变为 T; 七星莲 ITS2 序列在 79、84、180 和 201 bp 位置的 C 转换成 T, 121 bp 处碱基 C 颠换成 A, 而 132 和 181 bp 位置的 G 均转换成 T (图 3)。

3.4 系统发育分析

以蜜花堇属 *Melicytus* 药用植物蜜花堇 *M. ramiflorus* 为外类群, 利用 Mega 软件计算遗传距离, 结果表明 (图 4), 11 种堇菜属植物的总遗传距离为 0.078, 其中紫花堇菜和鸡腿堇菜的遗传距离最小, 仅 0.015, 戟叶堇菜和长萼堇菜次之, 遗传距离为 0.025; 紫花堇菜与七星莲的遗传距离最大, 为 0.137, 鸡腿堇菜和七星莲次之, 遗传距离为 0.129。从系统发育树上看, 戟叶堇菜、长萼堇菜、白花堇菜和紫花地丁聚为一组, 在植物分类学上, 它们同属合生托叶组; 紫花堇菜和鸡腿堇菜聚为一组, 它们同属鸟嘴柱状组; 裂叶堇菜组的南山堇菜和蔓茎堇菜组的七星莲分别处于不同分支; 堇菜、辽宁堇菜和柔毛堇菜聚为一组; 外类群蜜花堇单独聚为一

非常小,能容许更多变异的存在,最终导致序列长度和碱基组成产生差异,ITS1和ITS2已广泛应用于近缘种的分子鉴定^[25]。堇菜属11种药用植物共有141个变异位点和73个信息位点,这些信息位点可将它们完全区分开,可作为这些物种鉴定的分子标记。堇菜属药用植物ITS序列的克隆,为遗传多样性研究、地理学和鉴定提供了分子依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第51卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [2] 徐国兵. 堇菜属植物药用研究进展 [J]. 基层中药杂志, 1995, 9(2): 36-38.
- [3] 姚振生, 傅骞峰, 曹 岚. 江西省堇菜属药用植物资源及利用 [J]. 江西科学, 2001, 19(2): 104-107.
- [4] Pan Y Y. Antipyretic effects of liposoluble fractions of *Viola yedoensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 80-87.
- [5] 吴建芳, 李炳奇, 薛 梅, 等. 天山堇菜中总黄酮和多糖的微波提取与含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1105-1107.
- [6] 徐凤文. 东北堇菜抗炎作用的实验研究 [J]. 吉林中医药, 2005, 25(12): 61-61.
- [7] 李彦连. 山东省堇菜属药用植物资源及利用 [J]. 北方园艺, 2008(1): 237-238.
- [8] 李连方, 尹祖棠. 堇菜属植物花粉及叶表皮超微形态多样性的研究 [J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(3): 6-12.
- [9] 王旭红, 秦民坚, 吴永强. 南京地区6种堇菜属植物叶表皮的显微结构比较 [J]. 中药材, 2003, 26(10): 706-709.
- [10] 李 昂, 王可青, 葛 颂. 不同采样策略对细距堇菜遗传多样性估算的影响 [J]. 植物学报, 2000, 42(10): 1069-1074.
- [11] 朱锦懋, 代容春, 林国宇, 等. 蔓茎堇菜愈伤组织分化再生植株 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2001, 17(1): 79-83.
- [12] 代容春, 林荣华, 何文锦, 等. 农杆菌介导白藜芦醇合酶基因转化蔓茎堇菜的研究 [J]. 生物技术, 2009, 19(4): 16-17.
- [13] 魏艺聪, 陈 莹, 牛广俊, 等. 不同居群草珊瑚的 ITS 序列分析及模式识别研究 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 2982-2986.
- [14] 倪梁红, 赵志礼, 孟千万, 等. ITS 和 psbA-trnH 序列鉴别绿绒蒿属藏药植物 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 541-545.
- [15] 彭 梓, 朱金国, 谭建锡, 等. 基于 ITS2 序列的杜仲及其主要混伪品的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3042-3047.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al*. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5(2): 150-163.
- [18] 李文强, 黄士良, 牛玉璐, 等. DNA 分子标记技术在中草药鉴别中的应用 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2005, 29(6): 617-622.
- [19] 朱 爽, 周 林, 黄楷鸿, 等. 毛钩藤和无柄果钩藤的 ITS 序列分析研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1696-1700.
- [20] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, *et al*. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence of angiosperm phylogeny [J]. *Ann Mol Bot Gard*, 1995, 82: 247-277.
- [21] 李小刚, 王有科, 李 捷, 等. 基于 nrDNA-ITS 序列的 10 种枸杞属植物亲缘关系研究 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(25): 128-135.
- [22] 朱英杰, 陈士林, 姚 辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [23] 宁璇璇, 纪 灵, 王 刚, 等. 烟台海域暴发浒苔 ITS 及 5.8 S rDNA 的克隆及序列分析 [J]. 海洋通报, 2010, 29(1): 91-95.
- [24] 袁长春, 黎培新, 王燕芳, 等. 用核糖体 ITS 区序列验证自然杂交种 *Meconopsis × cookei* G. Taylor [J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 901-907.
- [25] Nolan M J, Cribb T H. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species [J]. *Adv Parasitol*, 2005, 60: 101-163.