

斑叶兰属 7 种药用植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析

蒋 明^{1,3}, 郭志平², 章燕如³, 许 鑫³, 朱 欣³, 蒋晓颖³, 吕 奕³

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. 丽水学院医学与健康学院, 浙江 丽水 323000

3. 台州学院生命科学院, 浙江 椒江 318000

摘 要: 目的 克隆和分析 7 种斑叶兰属药用植物的 ITS 序列, 为该属植物的分子鉴定提供依据。方法 利用 PCR 法克隆 ITS 序列, 在测序的基础上, 借助生物信息学软件进行序列分析和系统发育分析。结果 7 种斑叶兰属植物的 ITS 全长为 700~702 bp, ITS1 的长度为 239~240 bp, ITS2 为 298~300 bp, 而 5.8 S 的长度十分保守, 均为 162 bp; 序列中检测到可变位点 107 个, 其中信息位点 34 个。7 种斑叶兰属植物的遗传距离为 0.006~0.110, 大花斑叶兰与高斑叶兰的遗传距离最大, 亲缘关系最远, 而斑叶兰和小斑叶兰的遗传距离最小, 关系最近。结论 克隆到 7 种斑叶兰属药用植物的 ITS 序列, 它们信息位点丰富, 这些位点可将 7 种植物完全区分。

关键词: 斑叶兰属; ITS; 分子克隆; 序列分析; 分子鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)23-4242-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.021

Cloning and analysis of rDNA ITS sequences from seven kinds of medicinal plants in *Goodyera* L.

JIANG Ming^{1,3}, GUO Zhi-ping², ZHANG Yan-ru³, XU Xin³, ZHU Xin³, JIANG Xiao-ying³, LV Yi³

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

2. College of Medicine and Health, Lishui University, Lishui 323000, China

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

Abstract: Objective To identify the medicinal plants in *Goodyera* L. at molecular level, cloning and sequence analysis of seven internal transcribed spacer (ITS) sequences from seven plant species of *Goodyera* L. were performed. **Methods** ITS sequences were cloned 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 seven kinds of plants in *Goodyera* L. were 700—702 bp in length. The length of ITS1 and ITS2 were 239—240 bp and 298—300 bp, respectively, while 5.8S sequences were more conserved with identical length of 162 bp. Thirty-four parsimony information sites among 107 variable sites were detected in the sequence. Genetic distances among seven plant species of *Goodyera* L. were 0.006—0.110. The greatest genetic distances were observed between *V. grypoceras* and *V. diffusa* var. *brevibarbata* indicating the farthest of their relative distinct relationship, and the smallest existed between *V. diffusa* and *V. acuminata* revealing their closest relationship. **Conclusion** ITS sequences of seven kinds of medicinal plants in *Goodyera* L. are obtained with a result of rich information sites which could be used to distinguish these seven species completely.

Key words: *Goodyera* L.; ITS; molecular cloning; sequence analysis; molecular identification

斑叶兰属 *Goodyera* L. 植物为兰科 (Orchidaceae) 地生草本, 具根状茎, 因部分物种的叶片常带有杂色斑纹, 故名斑叶兰; 该属植物全世界约有 40 种, 我国有 29 种^[1]。斑叶兰属的部分种类如斑叶兰 *G. schlechtendaliana* Rchb. f.、高斑叶兰 *G. procera* (Ker-Gawl.) Hook. 和大花斑叶兰 *G.*

biflora (Lindl.) Hook. f. 等具有较高的药用价值, 具活血止痛、清肺止咳、消肿解毒和软坚散结的功效, 可用于治疗肺结核、跌打损伤、尿路感染、支气管炎、毒蛇咬伤和痈疽疮疡等^[2-4]。药材加工后容易改变形态结构, 利用传统的中药鉴定手段难以准确鉴别, 分子标记具有鉴定准确性高和重现性好等优点,

收稿日期: 2016-06-25

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

目前已广泛应用于中药材鉴定^[5]。

常见的分子标记技术有 DNA 条形码 (DNA barcoding)、随机扩增多态性 DNA 标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 和单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 等^[6], 核糖体 DNA 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 是一种重要的 DNA 条形码, 由 2 个间隔区 (ITS1 和 ITS2) 及它们之间的 5.8 S 组成, 5.8 S 在进化上十分保守, 而 ITS1 和 ITS2 在序列长度和碱基组成上的变异较大, 是研究遗传多样性、系统发育和物种鉴定的重要分子标记^[7]。近年来, 科研人员就斑叶兰属植物的药理作用、保护生物学、组织培养、化学成分和新记录种发现等方面开展了一些研究^[8-12]。但有关斑叶属植物 rDNA ITS 序列克隆方面未见报道, 本研究以 7 种斑叶兰属植物为材料, 在克隆各自 ITS 序列的基础上, 对它们进行序列分析, 为该属植物的分子鉴定和系统发育分析奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

斑叶兰 *Goodyera schlechtendaliana* Rehb. f.、绒叶斑叶兰 *Goodyera velutina* Maxim.、小斑叶兰 *Goodyera repens* (L.) R. Br.、光萼斑叶兰 *Goodyera henryi* Rolfe、高斑叶兰 *Goodyera procera* (Ker-Gawl.) Hook.、大花斑叶兰 *Goodyera biflora* var. *macrantha* (Lindl.) Hook. f. 和绿花斑叶兰 *Goodyera viridiflora* (Bl.) Bl. 7 种植物, 样品的采集地点及海拔信息见表 1, 植物均由蒋明鉴定。每个物种采集 5 棵植株的叶片, 分别装入取样袋后置于冰盒中带回实验室, 先用大量的自来水冲洗, 然后用无菌水冲洗 2~3 次, 用吸水纸吸干后贮存于 -80 °C 低温冰箱中备用。

表 1 斑叶兰属植物的来源

Table 1 Sources of plants in *Goodyera* L.

编号	植物名称	采集地	海拔/m
1	绒叶斑叶兰	临安天目山	987
2	斑叶兰	临海括苍山	1 118
3	小斑叶兰	歙县清凉峰	881
4	光萼斑叶兰	泰顺乌岩岭	1 094
5	高斑叶兰	泰顺乌岩岭	670
6	大花斑叶兰	临安天目山	365
7	绿花斑叶兰	黄岩划岩山	96

1.2 仪器

BIO-RAD C1000 型 PCR 仪; 北京六一 DYY-12 型电泳仪和电泳槽; Eppendorf 移液枪; BIO-RAD Gel Doc XR⁺ 凝胶成像系统; BECKMAN Allegra 64R 高速冷冻离心机; 超净工作台; 恒温培养箱; 恒温摇床。“新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒”购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

DNA 提取根据试剂盒说明书进行, 每个样品取 0.1 g 用于 DNA 的提取。基因组 DNA 经电泳检测后, 置于 -80 °C 低温冰箱中保存备用。

2.2 ITS 序列的克隆、转化和测序

克隆 ITS 序列所用的 PCR 引物分别为 ITSUP: 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3' 和 ITSDN: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。反应总体积为 20 μL, 在 PCR 管中依次加入 15.8 μL 无菌 ddH₂O, 2 μL 10×PCR 缓冲液 (含 20 mmol/L Mg²⁺)、0.35 μL 上游引物 (20 μmol/L)、0.35 μL 下游引物 (20 μmol/L)、0.20 μL 200 ng/μL 的 DNA、0.55 μL dNTPs (Genview) 和 0.55 μL 2 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶 (北京鼎国公司)。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s, 55.8 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 70 s, 循环次数为 33。

2.3 PCR 产物的回收、连接和测序

PCR 产物经琼脂糖凝胶分离后, 用刀片割取含目的片段的胶块。DNA 片段的回收采用北京鼎国的“快速凝胶回收纯化试剂盒”, 操作根据试剂盒说明书进行。各取 2 μL 纯化片段, 连接到 p-GEM T-easy 载体 (Promega), 经转化大肠杆菌 Trans5α 化学感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司)、蓝白斑筛选及菌液 PCR 验证后, 各取 3 份阳性菌液用于测序。菌液 PCR 的体系和程序同“2.2”项, 模板改为 0.1 μL 菌液。

2.4 序列分析

测序结果经整理后保存为 Fasta 格式, 用 ClustalX 1.81 软件进行序列比对^[13]; G+C 值利用 Excel 计算获得; 遗传距离计算及系统发育树的构建采用 MEGA 3.1 软件^[14], 建树方法为邻接法 (neighbor joining, NJ), 自举检测次数为 1 000。

3 结果与分析

3.1 ITS 序列的特征

以基因 DNA 为材料, 利用 ITSUP 和 ITSDN 引物对克隆到的 7 种斑叶兰属植物的 rDNA 进行 ITS 序列分析。测序结果显示, 每个物种 5 棵单株的 ITS 序列完全一致。序列分析结果表明, 7 种斑叶兰属植物的 ITS 全长为 700~702 bp, 绒叶斑叶兰的 ITS

序列最长, 光萼斑叶兰和大花斑叶兰次之, 长度为 701 bp, 其余 4 种的 ITS 长度均为 700 bp。ITS1 的长度为 239~240 bp, ITS2 为 298~300 bp, 而 5.8 S 的长度十分保守, 均为 162 bp (表 2)。7 种斑叶兰属植物 ITS 序列的 G+C 值为 49.4%~53.0%, 高斑叶兰的 G+C 值最高, 绿花斑叶兰次之, 为 50.3%, 绒叶斑叶兰的 G+C 值最低。

表 2 斑叶兰属植物 ITS 序列的长度及 G+C 值

Table 2 Length of ITS sequences and G+C value in plants of *Goodyera* L.

编号	植物名称	ITS 名称	G+C 值/%	ITS1 长度/bp	5.8 S 长度/bp	ITS2 长度/bp
1	绒叶斑叶兰	GveITS	49.4	240	162	300
2	斑叶兰	GscITS	50.0	239	162	299
3	小斑叶兰	GreITS	49.9	239	162	299
4	光萼斑叶兰	GheITS	49.9	239	162	300
5	高斑叶兰	GprITS	53.0	239	162	299
6	大花斑叶兰	GbiITS	49.9	240	162	299
7	绿花斑叶兰	GviITS	50.3	240	162	298

3.2 ITS 序列的比较分析

利用 ClustalX 1.81 对齐 ITS 序列, 发现它们共有可变位点 107 个、信息位点 34 个, 序列中存在大量的缺失/插入和转换/颠换现象, 这些信息位点可完全区分这 7 种斑叶兰属植物(图 1)。ITS1 和 ITS2 的信息位点数分别为 22 和 11, 5.8 S 序列中存在 1 个信息位点, 位于+341 处。ITS1 序列的+130、+139、+196 和+213 位发生缺失/插入现象, ITS2 仅+147 位存在缺失/插入, 而在 5.8 S 序列中未检测到。转换/颠换现象在 ITS1 和 ITS2 中十分普遍, 次数分别为 56 和 47, 而 5.8 S 序列中的转换/颠换现象较少, 仅发生 3 次, 分别位于+326、+341 和+363。斑叶兰和小斑叶兰的 ITS 序列差异最小, 仅存在 4 个碱基的差异, 分别位于+37、+113、+598 和+687 处; 绒叶斑叶兰和光萼斑叶兰的 ITS 存在 8 个碱基的差异, 它们是+32、+112、+140、+213、+511、+608、+609 和+651 位(图 1)。

3.3 系统发育分析

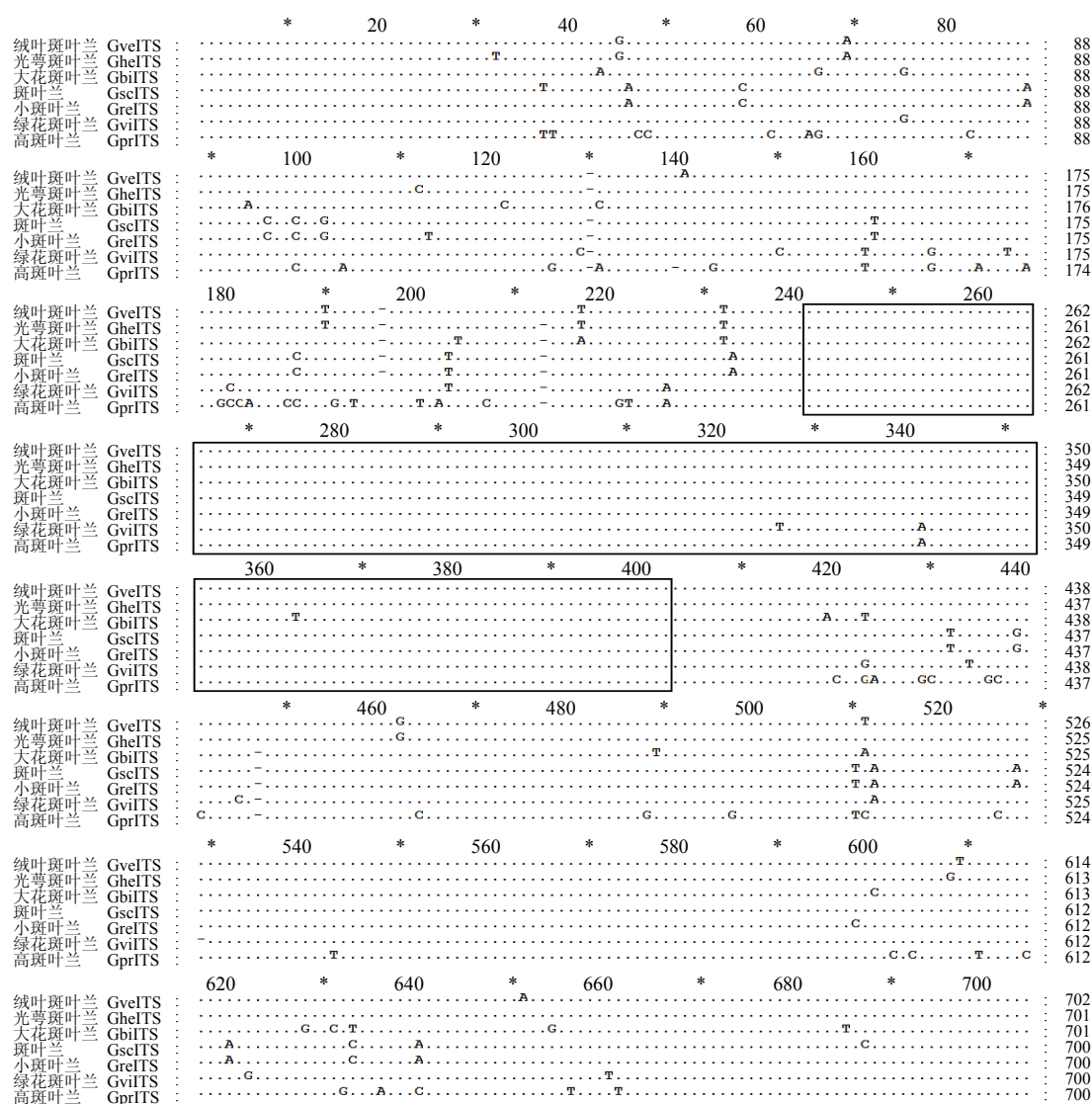
利用 Mega 软件计算遗传距离, 结果表明, 7 种斑叶兰属植物的遗传距离为 0.006~0.110。其中, 斑叶兰和小斑叶兰的遗传距离最近; 绒叶斑叶兰和光萼斑叶兰次之, 遗传距离为 0.010; 高斑叶兰和小斑叶兰、高斑叶兰和大花斑叶兰之间的遗传距离最远, 分别为 0.106 和 0.110。7 种斑叶兰属植物在系统发育树上分为 4 组, 大花斑叶兰、光萼斑叶兰和

绒叶斑叶兰聚为一组 (I), 斑叶兰和小斑叶兰聚为一组 (II), 而绿花斑叶兰及高斑叶兰单独处于 2 个不同分支 (III 和 IV) (图 2)。

4 讨论

正确鉴定中药是安全用药和药用植物合理开发的保证, 因地理分布和所处生境不同, 植物的形态和化学成分差异较大, 利用传统的形态学、显微法、理化性质和化学指纹图谱鉴定具有一定的局限性^[15]。随着分子生物学技术的发展, 分子标记已广泛应用于药用植物的资源鉴定、亲缘关系确定和多样性研究^[16]。rDNA-ITS 是一种重要的 DNA 条形码, 它具有信息位点丰富、序列长度保守和核苷酸变异快等特点, 已广泛用于物种鉴定、植物分类和系统发育研究^[6]。Jeanmougin 等^[13]以野豌豆属 *Vicia* L. 8 种药用植物为材料, 克隆到各自的 ITS 序列, 共有信息位点 33 个, 特异性鉴别位点 29 个, 可将这些植物完全区分; 邵婧等^[14]以茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 及其近缘种为材料获得各自的 ITS2 序列, 共鉴定到 7 个变异位点, 可用茅苍术药材的鉴定。本研究中, 7 种斑叶兰属植物 ITS 序列的信息位点十分丰富, 达 34 个, 利用它们可将 7 种植物完全区分。

在被子植物中, rDNA-ITS 的全长由 ITS1、5.8 S 和 ITS2 组成, 长度 500~700 bp, ITS1 的长度为 187~298 bp, ITS2 为 187~252 bp, 其中的 5.8 S 最为保守, 序列长度通常为 163~164 bp^[17-18]。不同



黑色方框表示 5.8 S 序列

Black boxes indicate 5.8S sequences

图 1 斑叶兰属药用植物的 ITS 序列

Fig. 1 ITS sequences of seven medicinal plants in *Goodyera* L.

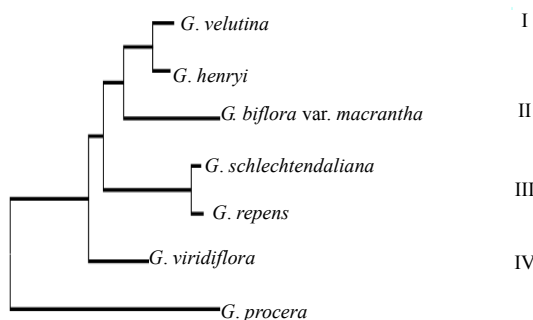


图 2 基于 ITS 序列构建的 7 种斑叶兰属植物的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of seven kinds of plants in *Goodyera* L. constructed based on ITS sequences

种属植物的 ITS 序列差异较大, 山姜属 *Alpinia* L. 植物 ITS1 的长度为 201~231 bp, ITS2 的长度为 253~281 bp, 而 5.8 S 的长度变异最小, 为 163~164 bp^[19]; 远志属 *Polygala* L. 7 药用植物 ITS1 的长度为 279~291 bp, ITS2 的长度为 211~219 bp^[20]; 鼠尾草属 *Salvia* L. 27 种药用植物的 ITS1 长度为 226~233 bp, ITS2 的长度为 216~228 bp^[21]。本研究中, 7 种斑叶兰属植物的 ITS 全长为 700~702 bp, 其中的 ITS1 长度为 239~240 bp, ITS2 长 298~300 bp, 而 5.8 S 的长度与石豆兰属 *Bulbophyllum* L.、银杏 *Ginkgo biloba* L. 和川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 一致, 均为 162 bp^[22-24]。

本研究以 7 种斑叶兰属植物为材料, 分别克隆到它们的 ITS 全长序列, 测序结果表明 7 种斑叶兰属植物 ITS 序列的信息位点丰富, 利用这些位点可将它们完全区分, 研究结果为斑叶兰属植物的分子鉴定和遗传多样性研究奠定了基础。

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 17 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] Lee S, Xiao C, Pei S. Ethnobotanical survey of medicinal plants at periodic markets of Honghe Prefecture in Yunnan Province, SW China [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 362-377.
- [3] 付志惠, 李洪林, 张建霞, 等. 斑叶兰的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 480-480.
- [4] 李泳锋, 刘杰书, 刘金龙. 大花斑叶兰中化学成分的气相色谱-质谱联用分析 [J]. 内蒙古中医药, 2009(4): 40-41.
- [5] 郭伟云, 牛玉璐, 姚朝阳. DNA 分子标记技术在中药材品质鉴定中的应用进展 [J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(6): 635-637.
- [6] Arif I A, Bakir M A, Khan H A, *et al.* A brief review of molecular techniques to assess plant diversity [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(5): 2079-2096.
- [7] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, *et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Mol Bot Gard*, 1995, 82(2): 247-277.
- [8] Du X M, Irino N, Furusho N, *et al.* Pharmacologically active compounds in the *Anoectochilus* and *Goodyera* species [J]. *J Nat Med*, 2008, 62(2): 132-148.
- [9] Wong K C, Sun M. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae) [J]. *Am J Bot*, 1999, 86(10): 1406-1413.
- [10] 付志惠, 李洪林, 张建霞, 等. 斑叶兰的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 480-480.
- [11] Zhang F, Han B, Li P, *et al.* Design, synthesis and hepatoprotective activity of analogs of the natural product goodyeroside A [J]. *Molecules*, 2013, 18(2): 1933-1948.
- [12] 葛斌杰, 田怀珍, 胡超. 田旗中国大陆兰科植物新记录种——南湖斑叶兰 [J]. 广西植物, 2012, 32(6): 750-752.
- [13] Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, *et al.* Multiple sequence alignment with Clustal X [J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(10): 403-405.
- [14] 邵婧, 谷巍, 巢建国, 等. 基于 ITS2 序列的茅苍术及其近缘种 DNA 分子鉴定 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1209-1215.
- [15] 张忠廉, 宋美芳, 李海涛, 等. 千斤拔属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 118-122.
- [16] Kool A, de Boer H J, Krüger A, *et al.* Molecular identification of commercialized medicinal plants in Southern Morocco [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39459.
- [17] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.
- [18] Alvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3): 417-434.
- [19] Kress W J, Liu A Z, Newman M, *et al.* The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A complex and polyphyletic genus of gingers [J]. *Am J Bot*, 2005, 92(1): 167-178.
- [20] 樊杰, 白妍, 束明月. 远志属 7 种药用植物 ITS1 和 ITS2 序列分析 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 562-565.
- [21] 王迎, 李大辉, 张英涛. 鼠尾草属药用植物及其近缘种的 ITS 序列分析 [J]. 药学学报, 2007, 42(12): 1309-1313.
- [22] 蒋明, 陈贝贝, 贺蔡明. 石豆兰属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 343-349.
- [23] 桂仁意, 金爱武, 高培军, 等. 银杏核糖体 DNA 内转录间隔序列初步分析 [J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(1): 17-21.
- [24] 官宇. 川牛膝 (*Cyathula officinalis* Kuan.) 种质资源遗传多样性的初步研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 1999.