

李家敏,周秀玲,姜 琼. 濒危药用植物盘龙参 rDNA ITS 序列分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):30-33.

濒危药用植物盘龙参 rDNA ITS 序列分析

李家敏,周秀玲,姜 琼
(宜春学院化学与生物工程学院,江西宜春 336000)

摘要:采用改良 CTAB 法提取 2 份江西省盘龙参总 DNA,利用通用引物对 rDNA ITS 序列进行 PCR 扩增,克隆后测序,应用 MEGA 5.2 软件进行序列分析和构建系统发育树,以研究盘龙参 ITS 片段遗传多样性,分析该片段在盘龙参 DNA 分子鉴别和绶草属植物系统学研究中的意义。结果表明,盘龙参样本的 rDNA ITS 长度为 766~767 bp;该样本与 GenBank 中绶草属的 rDNA ITS 对比分析,ITS1、ITS2 长度分别为 214~245、256~367 bp,变异位点分别为 16.17%、3.50%,ITS 总变异位点为 9.27%;基于 ITS 序列,用 p-distances 法计算遗传距离和 NJ 法建立系统发育树,2 段序列在绶草属种内保守,中间有较大变异,可作为盘龙参分子鉴定标记,而绶草属的系统发生关系尚须进一步研究。

关键词:绶草属;盘龙参;ITS 序列;遗传多态性;药用植物

中图分类号: S567.230.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0030-04

盘龙参为兰科绶草属植物绶草 [*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames] 的根或全草,为多年生草本植物,以全草入药,味甘,性温,入肺、肝、肾三经,具有滋阴益气、凉血解毒、润肺止咳的功效^[1],主要含有二氢菲类、黄酮类、苯丙素类、甾醇类、三萜类和脂肪酸等多种化学成分,属于名贵药材,具有较高的药用价值。Peng 等在盘龙参根中发现一种新的二氢黄酮,对肺癌细胞 A549、肝癌细胞 BEL27402、食管癌细胞 HT-29、乳腺癌细胞 MCF-7、胃癌细胞 SGC-7901、白血病细胞 K562 和肾癌细胞 A498 等多种癌细胞具有一定毒性^[2]。

盘龙参现为国家二级保护植物,已列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》^[3],为国际濒危植物。董必慧等对江苏沿海滩涂湿地的盘龙参资源进行调查,并提出有关盘龙参资源保护的策略^[4]。笔者在江西宜春和赣州调查时发现野生种盘龙参零星分布,对其采样进行驯化,在种植过程中发现盘龙参种子萌发率低,长势弱,成活极少,且植株结实不饱满,明显不如野外生长旺盛。对采样进行回访,采样点的盘龙参数量变少或不见踪迹,这对盘龙参的遗传多样性研究造成困难。

物种的濒危与其遗传结构和遗传多样性有关,遗传多样性的高低是物种生存能力的具体体现。目前,在研究遗传结构方面常采用 DNA 分子标记技术,rDNA ITS 序列分析技术是其中之一。rDNA ITS 序列是核糖体内转录间隔区,位于 18S 和 26S rDNA 基因之间,包括了 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 区段,具有较好的保守性。本研究首次通过 rDNA ITS 序列的遗传分析为盘龙参种间鉴定和种内遗传多样性提供生物学理论依据,并根据序列碱基差异、G+C 含量差异和片段长度的变化来有效地分析盘龙参遗传多样性和进化潜能。

收稿日期:2013-08-29

基金项目:江西省教育厅青年基金(编号:GJJ10252);江西省天然药物活性成分研究重点实验室开放基金。

作者简介:李家敏(1979—),女,贵州福泉人,硕士,讲师,从事药用植物 DNA 分子鉴定研究。E-mail:jiaminlizg@163.com。

通信作者:周秀玲(1960—),女,江西宜春,副教授,主要从事药用植物资源研究。E-mail:zxl600820@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 2013 年 3 月,于江西宜春和赣州 2 个不同生态群采集样本,经课题组周秀玲副教授鉴别为兰科绶草属植物盘龙参,样本凭证保存于江西省天然药物活性成分研究重点实验室。来源于 Genbank 的绶草属 rDNA ITS 序列相关信息见表 1。

表 1 来源于 GenBank 的绶草属 rDNA ITS 序列

登录号	物种	来源地	发布者
AJ539489	<i>Spiranthes cernua</i>	美国	Salazar
AF301443	<i>Spiranthes diluvialis</i>	美国	Szalanski
HE575517	<i>Spiranthes nebulorum</i>	美国	Szalanski
AF301441	<i>Spiranthes romanzoffiana</i>	美国	Szalanski
HE575518	<i>Spiranthes sinensis</i>	美国	Szalanski
AY364888	<i>Spiranthes spiralis</i>	西班牙	Bernardos
AB740173	<i>Spiranthes sinensis</i> var. <i>amoena</i>	日本	Ohga
AB740174	<i>Spiranthes sinensis</i> var. <i>amoena</i>	日本	Ohga
AB740175	<i>Spiranthes sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	日本	Ohga
AB740176	<i>Spiranthes sinensis</i> var. <i>sinensis</i>	日本	Ohga

1.1.2 主要仪器 超低温冰箱(7010702, Thermo);水浴锅(HH-4);离心机(Eppendorf-G5415R,德国);XP 基因扩增仪(BYQ602101-174,杭州博日);双稳定时电泳仪(DYY-6C,北京六一);紫外分光光度计(UV-2000);凝胶成像系统(Gel Media System,北京创美伟业)。

1.1.3 主要试剂 NaCl、CTAB、EDTA、Tris、氯仿、异戊醇、异丙醇,均为分析纯;引物,由上海生工生物公司合成;PCR 反应体系试剂、DNA 回收试剂盒等均购买于大连宝生物公司。

1.2 试验方法

1.2.1 盘龙参总 DNA 的提取 新鲜幼嫩叶片,清水冲洗,70%乙醇消毒,无菌水冲洗 3 次,于 -80℃ 冰箱保存。采用 CTAB 法提取样本总 DNA,具体操作按照李家敏等的方法^[5]进行。

1.2.2 rDNA ITS 片段的 PCR 扩增与产物纯化 采用 rDNA ITS 通用引物扩增整个 ITS 片段(ITS1-5.8S rDNA-ITS2 区段),ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',ITS5:5'-

GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG - 3'^[6]。50 μ L 反应体系: 10 \times PCR buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 2 mmol/L dNTP mix 5 μ L, 1 μ mol/L ITS4 与 ITS 引物各 5 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA polymerase 1 μ L, 5 μ L 模板溶液 (DNA 约 70 ~ 80 ng), ddH₂O 20 μ L。扩增反应在基因扩增仪上进行, PCR 反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min。反应结束后, 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。PCR 产物按照说明书操作步骤用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (TaKaRa Mini BESTA garose Gel DNA Extraction Kit, 宝生物工程有限公司) 进行纯化。

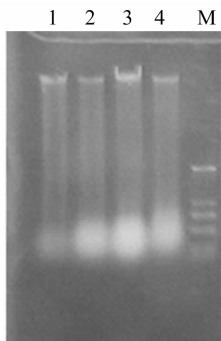
1.2.3 rDNA ITS 序列克隆与测序 纯化后的 PCR 产物克隆到大肠杆菌 PMD18 - T 载体上, 经氨苄青霉素抗性筛选所得菌落接种到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基上过夜培养, 再进行质粒提取, 并用扩增引物进行扩增; 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 观察目的基因是否成功导入载体。将克隆成功的菌液送往上海生工生物工程有限公司进行 DNA 单向测序。

1.2.4 rDNA ITS 序列数据的处理 DNA 序列的排列用 CLUSTALW 软件完成; 排序后的序列使用 MEGA 5.2 软件进行分析, 采用 p - distances 法计算遗传距离, 采用 NJ 邻接法构建 NJ 系统树; 系统树各分支的置信度用自举检验法 (bootstrap test) 检验, 共进行 2 000 次循环, 以评价各分支的系统学意义与可靠性。

2 结果与分析

2.1 盘龙参总 DNA 的提取和 rDNA ITS 序列的扩增

盘龙参总 DNA 提取物采用 120 ~ 150 μ L ddH₂O 稀释, 取 5 μ L 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, 并在凝胶成像系统进行检测。由图 1 可见, 2 个样本主带清楚, 片段完整, 样本 DNA 质量比较稳定。对 rDNA ITS 片段的扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 由图 2 可见, 扩增产物条带明亮, 片段完整, 分子量在 760 bp 左右, 条带清晰, 可进行回收、克隆和测序。

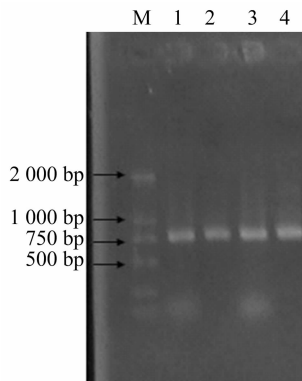


M—marker; 1、2—盘龙参江西宜春样本;
3、4—盘龙参江西赣州样本

图1 盘龙参的总DNA电泳图

2.2 rDNA ITS 序列分析

盘龙参 rDNA ITS 序列测序后, 通过 CLUSTALW 多序列比对, ITS4 与 ITS5 引物能完整地扩增出盘龙参 rDNA ITS 序列, 总长度为 767 bp, ITS1、ITS2 边界根据已发表的缙草属植物 18S rDNA、5.8S rDNA、26S rDNA 序列比对确定。由图 3 可见, 5'端开始, 55 ~ 289 bp 为 ITS1 区, 赣州样本的序列长度



M—marker; 1、2—盘龙参江西宜春样本;
3、4—盘龙参江西赣州样本

图2 盘龙参rDNA ITS序列扩增产物电泳图

为 235 bp, 宜春样本为 234 bp, 221 bp 处缺失 A; 290 ~ 453 bp 为 5.8S rDNA, 总长 164 bp; 454 ~ 736 bp 为 ITS2 区, 长 288 bp, 737 bp 后为 26S rDNA。

将 2 个盘龙参样本与 GenBank 中缙草属的 rDNA ITS 序列进行对比分析, 结果由表 2 可见, ITS1 序列长度为 214 ~ 245 bp, (G + C) 含量为 50.64% ~ 57.02%, 平均 54.02%; ITS2 长度 256 ~ 367 bp, (G + C) 含量为 53.91% ~ 58.68%, 平均 56.97%; ITS 序列中 G + C 含量高。将 2 个样本与缙草属的 ITS 序列进行变异位点比较, 结果由图 4 可见, 对比排序后总长度为 518 bp, 总的变异位点有 48 个, 变异位点占 9.27%; ITS1 的变异位点为 38 个, 占 ITS1 长度的 16.17%; ITS2 的变异位点为 10 个, 占 3.50%。

2.3 基于 ITS 序列的盘龙参遗传距离分析

由于 ITS1 和 ITS2 2 个片段的长度有限, 提供的信息不多, 因此将这 2 个片段综合为 ITS 片段对物种进行分析。采用 p - distances 法计算遗传距离, 结果由表 3 可见, 遗传距离为 0.000 ~ 0.068; 江西宜春与赣州的样本距离为 0.009, 两者有一定差异; 来源于日本的 AB740173、AB740174、AB740175、AB740176 这 4 个种内变种完全一致; 2 个盘龙参样本与 4 个日本缙草属物种遗传距离更近, 与 AJ539489、AF301443 两者的遗传距离最远; 来源于美国 (HE575518) 和西班牙 (AY364888) 的 2 个物种序列完全一致; 美国 2 个缙草属 (AF301441、AJ539489) 种间变异最大, 为 0.068。

2.4 分子系统树的比较与分析

基于兰科缙草属 12 个样本的 ITS 序列构建缙草属分子系统树——NJ 系统树, 结果由图 5 可见, 江西 2 个盘龙参样本的遗传关系与日本的 4 个种最近, 为一支; HE575518 (美国)、AY364888 (西班牙) 聚为一支; 美国 3 个缙草属 HE575517、AJ539489、AF301443 聚为一支。系统树的分析结果与采用 p - distances 法计算的遗传距离结果一致。

3 小结与讨论

rDNA ITS 序列作为种下一级分类群亲缘关系研究的重要基因序列, 进化速率较快, 具有核苷酸序列高度变异和长度上的保守性, 而且在核中是多拷贝重复序列, 大多数被子植物的 ITS 序列由于具有同步进化的力量, 众多拷贝已高度相似或一致化, 近年来, 用于探讨植物物种内变异和种间、近缘属

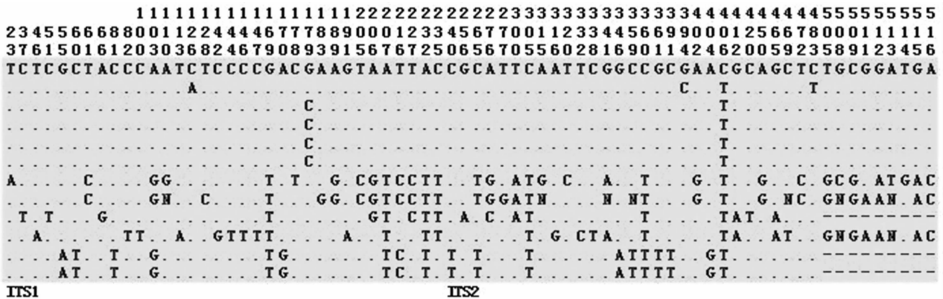
gzh	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAGACCCATAAAG	[69]
ych	[69]
gzh	GATTGGATGACCCCTTGATAACCCGTGGACATGTGGCAGCGTCAGCTGCCTATAAATGCCATTGCGCCCGG	[138]
ych	[138]
gzh	TGCCCCCTTCTCGATCGGAGCATCAAAATGGGTGGATGCAACCTATCAATTGGGCGCCGCGCCGCCCA	[207]
ych A	[207]
gzh	AGGAAGCGTTGTGACGAGCATTGACGACTATCCGTAGGAGCTCGAAGGGCTTAACGGTGCGTTGTGT	[276]
ych	[276]
gzh	GCTTTTGAAATACTGTATGACTCCCGGCAATGGATATCTTGGCTCTTGCATCGATGAAGAGCGCAGCGA	[345]
ych	[345]
gzh	AATGCGATACGTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGA	[414]
ych	[414]
gzh	GGCCAATTGGCTGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTACATCGCTTCATCCCGGCCACCTCGC	[483]
ych	[483]
gzh	AGGTGGGGTGATTGTGCCGGTTGAATGTGGAGATTGGCCCTTCGTGCAAACATTGTGCGGCGGGTTG	[552]
ych	[552]
gzh	AAGCGCGGATGGCTCTCCTCTCGGCCGATGCGTGACAAAGGGGTGGTTGGATGCTGCCGGTTGGCCAC	[621]
ych C	[621]
gzh	ATCGTCATGTCATTGGCCTTGAGGATGGCGTGCACACATCGATAATAGTGCACCGACGGATTGCTT	[690]
ych	.. T	[690]
gzh	GTAGGTGGCACATCGAAATGCGACCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCTGAGTTAAGCATATCAATAA	[759]
ych T	[759]
gzh	GCGGAGGA	[767]
ych -	[767]

gzh为赣州样本；ych为宜春样本；·为相同；-为缺失

图3 盘龙参2个样本的rDNA ITS序列

表 2 缙草属 ITS1、ITS2 序列的长度和 G + C 含量

序号	GenBank 号	ITS1			ITS2		
		长度 (bp)	G + C (bp)	(G + C) 含量 (%)	长度 (bp)	G + C (bp)	(G + C) 含量 (%)
1	盘龙参(江西赣州)	235	66 + 61	54.04	283	96 + 73	59.72
2	盘龙参(江西宜春)	234	66 + 60	53.85	283	95 + 72	59.01
3	AB740173	235	65 + 62	54.04	283	96 + 72	59.36
4	AB740174	235	65 + 62	54.04	283	95 + 72	59.01
5	AB740175	235	65 + 62	54.04	283	96 + 72	59.36
6	AB740176	235	65 + 62	54.04	283	96 + 72	59.36
7	AJ539489	239	70 + 63	55.65	257	87 + 61	57.59
8	AF301443	235	69 + 65	57.02	367	121 + 89	57.22
9	HE575517	235	67 + 59	53.62	257	81 + 60	54.86
10	AF301441	235	65 + 54	50.64	367	116 + 91	56.40
11	HE575518	214	60 + 56	54.21	257	83 + 56	54.08
12	AY364888	245	68 + 62	53.06	256	82 + 56	53.91
平均值				54.02			56.97



·为相同，-为缺失

图4 缙草属植物的ITS序列变异位点

表 3 基于 ITS1、ITS2 序列的绶草属各样本遗传距离

序号	样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	盘龙参(江西赣州)	0.000											
2	盘龙参(江西宜春)	0.009	0.000										
3	AB740173	0.004	0.009	0.000									
4	AB740174	0.004	0.009	0.000	0.000								
5	AB740175	0.004	0.009	0.000	0.000	0.000							
6	AB740176	0.004	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000						
7	AJ539489	0.052	0.057	0.052	0.052	0.052	0.052	0.000					
8	AF301443	0.052	0.057	0.052	0.052	0.052	0.052	0.013	0.000				
9	HE575517	0.040	0.045	0.040	0.040	0.040	0.040	0.045	0.045	0.000			
10	AF301441	0.047	0.052	0.047	0.047	0.047	0.047	0.068	0.068	0.047	0.000		
11	HE575518	0.040	0.045	0.040	0.040	0.040	0.040	0.052	0.052	0.054	0.061	0.000	
12	AY364888	0.040	0.045	0.040	0.040	0.040	0.040	0.052	0.052	0.054	0.061	0.000	0.000

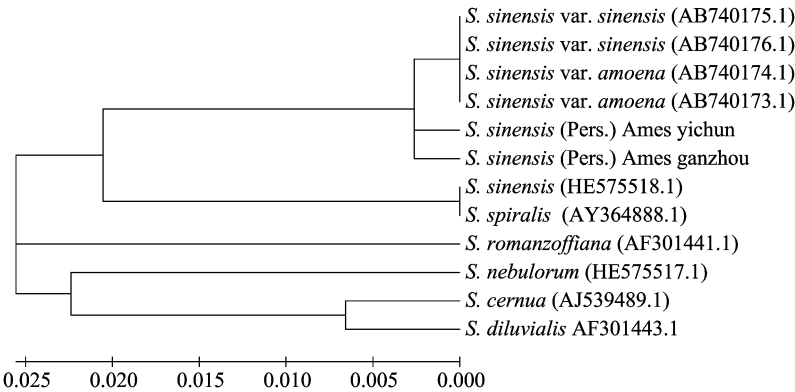


图5 基于ITS1+ITS2序列的绶草属样本NJ系统树

间的分子系统关系。ITS 序列作为一种基于测序的标记技术已应用于药用植物的品种鉴定、亲缘关系确定、植物分类等方面。张宏意等利用 ITS 片段遗传差异鉴定何首乌道地性与野生资源差异,对野生资源品种鉴定具有较好的分辨率^[7];刘忠等利用 ITS 序列分析五味子科的分类关系,发现基于 ITS 序列的分析结论与形态学分析相吻合,为五味子科植物系统发育关系及分类关系界定提供了有效方法^[8];石志刚等对宁夏枸杞资源基于 rDNA ITS 序列的遗传多样性研究表明,ITS 序列在宁夏枸杞中具有较多的变异位点,能直观展示枸杞的遗传变异^[9]。

本研究将 ITS 序列用于江西省 2 个不同生态居群的盘龙参差异分析,并与 GenBank 中同属物种在该基因上的差异性进行比较,发现在 rDNA ITS 序列上,江西赣州与宜春 2 个样本序列差异极小,ITS 序列中仅有 4 个碱基发生变异,分别是 C-A、G-C、C-T、C-T,遗传距离仅为 0.009。与江西样本遗传关系最近的是来源于日本的 4 个盘龙参种内变种,这 4 个变种的 ITS 序列完全相同。与兰科石斛属的 ITS 片段比较,绶草属 ITS 变异位点的比率偏低^[10]。对于濒危的绶草属盘龙参植物来讲,ITS 序列在该植物中变异程度小,盘龙参的濒危可能与 DNA 遗传变异小有直接关系。对于药用植物盘龙参濒危机制的解释,需要多样本、多个基因序列分析结果来进行佐证,本研究仅有 2 个样本,且来源于 1 个省份,样本少,需要扩大样本量进一步验证。

参考文献:

[1]《中华本草》编委会. 中华本草:第 8 卷[M]. 上海:上海科学技术出版,1999:755-757.

[2]Peng J Y,Xu Q W,Xu Y W,et al. A new anticancer dihydroflavanoid from the root of *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl[J]. Natural Product Research,2007,21(7):641-645.

[3]林道清,梁 鸿,檀庆忠,等. 福建青云山风景区珍稀濒危植物资源及其保护[J]. 亚热带植物科学,2003,32(1):39-42,46.

[4]董必慧,杨小兰. 沿海滩涂濒危物种绶草的生长利用特性和保护策略[J]. 江苏农业科学,2006(3):193-195.

[5]李家敏,周秀玲,喻 鹏. 基于 SRAP 分析的盘龙参 DNA 提取[J]. 种子,2012,31(12):32-34,46.

[6]Chen S,Yao H,Han J P,et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One,2010,5(1):e8613.

[7]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.

[8]刘 忠,汪小全,陈之端,等. 五味子科的系统发育:核糖体 DNA ITS 区序列证据[J]. 植物学报,2000,42(7):758-761.

[9]石志刚,安 巍,焦恩宁,等. 基于 nrDNA ITS 序列的 18 份宁夏枸杞资源的遗传多样性[J]. 安徽农业科学,2008,36(24):10379-10380.

[10]徐 红,李晓波,丁小余,等. 中药黄草石斛 rDNA ITS 序列分析[J]. 药学报,2001,36(10):777-783.