

不同产区麦冬、山麦冬 rDNA-ITS 序列分析

黄玉吉<sup>1</sup>, 陈菁瑛<sup>1</sup>, 苏海兰<sup>1</sup>, 黄颖桢<sup>1</sup>, 万学锋<sup>1,2</sup>

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003;  
2. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002)

摘 要: 利用特异性引物进行 PCR 扩增和克隆、测定不同产区麦冬和山麦冬原植物的 18S~ 26S r DNA- ITS 区碱基序列, 结果得到供试的 7 个不同产区麦冬和山麦冬植株样品 rDNA 的 ITS 及 5 8S rDNA 全序列、18S 和 26S rDNA 部分序列, 序列长度在 696~ 711 bp。通过分析比较各 ITS 序列, 表明不同产区麦冬和山麦冬 rDNA ITS 区存在差异, 可为其分子鉴别提供了依据。

关键词: 麦冬; 山麦冬; rDNA- ITS

中图分类号: R 284 1 文献标识码: A

rDNA-ITS of *Radix ophiopogonis* and *Radix liriopes* from different regions

HUANG Yurji<sup>1</sup>, CHEN Jingying<sup>1</sup>, SU Hailan<sup>1</sup>, HUANG Yingzhen<sup>1</sup>, WAN Xuefeng<sup>1,2</sup>  
(1. Institute of Agrobiological Resources, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract:** The 18S- 26S rDNA- ITS base sequences of *Radix ophiopogonis* and *Radix liriopes* from different geographical regions were compared by using the specific PCR ITS. The complete sequences of ITS and 5 8S rDNA, as well as partial sequences of 18S rDNA and 26S rDNA, in the range of 696- 711 bp for the seven samples were obtained. By comparing the sequences, it was apparent that the ITS sequences of *R. ophiopogonis* and *R. liriopes* from different regions varied. Our analytical results provided a basis for molecular identification of the species.

**Key words:** *Radix ophiopogonis*; *Radix liriopes*; rDNA- ITS

麦冬, 别名寸冬、麦门冬和沿阶草等, 在我国大部分地区都有野生分布和栽培, 以干燥块根入药, 为养阴生津之要药, 泽枯润燥之上品。《中国药典》(1995 年版) 收载有百合科沿阶草属植物麦冬 [*O. japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl.]、山麦冬属短葶山麦冬 [*L. muscari* (Decne.) Bailey] 及湖北麦冬 [*L. spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma] 等 3 种<sup>[1- 2]</sup>, 它们分别是目前国内主流商品麦冬类药材杭麦冬、川麦冬、福建麦冬和湖北麦冬的基源植物。对于它们之间的鉴别通常采用植株形态、药材性状、显微、理化等方法。传统的外观分类法判断植物种类虽直观、简单、迅速, 但要求研究者具有丰富的判断经验和分类知识, 由于麦冬类药材, 其植株形态类型丰富, 依据形态学差异的分类方法也存在着争议; 理化分析往

往需要把待测物质从药材中提取出来; 染色体、同工酶技术在测定的过程中也受到很多不定因素的干扰。

高等植物的核糖体 DNA (ribosomal, rDNA) 是由串联重复排列的单位组成, 每个单位包括编码区和内转录间隔区, 编码区包括 18S、5 8S 和 26S 基因, 序列高度保守; 编码区之间为内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS), 依顺序分为第一转录间隔区 (ITS1) 和第 2 转录间隔区 (ITS2)。ITS 区域序列进化速率较编码区快, 其速率与近缘种进化比较一致, 可以提供较丰富的变异位点和信息位点, 目前已成为在序列水平上探讨科内属间及属下种间关系十分有效的手段<sup>[3- 4]</sup>。在中药材领域, 已有对莲<sup>[5]</sup>、当归<sup>[6]</sup>、太子参<sup>[7]</sup>等 rDNA- ITS 序列分析或比较的相关报道。本研究拟利

收稿日期: 2009- 07- 21 初稿; 2009- 11- 01 修改稿  
作者简介: 黄玉吉 (1981- ), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 植物生物技术  
通讯作者: 陈菁瑛 (1966- ), 女, 研究员, 主要从事植物生物技术与中药资源研究及中药材 GAP 生产 (E-mail: cjjy6601@ 163. com)  
基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAI06A11- 03); 福建省农业科学院青年科技人才创新基金项目 (A2007QJ02)

用 ITS 序列分析, 比较浙江、四川、湖北、福建麦冬不同基源植物之间 rDNA-ITS 碱基序列的差异及规律, 探讨它们的分类地位和系统发育关系, 为麦冬的指纹图谱鉴别提供分子标记; 同时, 为麦冬资源的保存、利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试材取自浙江 (庵东、崇寿)、四川 (三台)、湖北 (襄樊、新堰)、福建 (泉州、莆田) 等不同产区的麦冬、山麦冬的植株。

### 1.2 麦冬基因组 DNA 提取

于 1.5 mL 离心管中, 将 0.1 g 麦冬叶片用液氮磨成细粉末, 加入 600  $\mu$ L 预热的 CTAB 提取缓冲液 (50 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris  $\cdot$  HCl, pH 8.0; 20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA; 2% CTAB; 1.4 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl; 临用前加入 2%  $\beta$ -巯基乙醇), 混匀后置于 65  $^{\circ}$ C 水浴中温育 45 min, 期间混匀数次; 4  $^{\circ}$ C 下 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 将上清转移到新的 1.5 mL 离心管; 上清加入等体积预冷的氯仿: 异戊醇 (24: 1), 将离心管缓慢颠倒几分钟, 使管内充分混匀; 4  $^{\circ}$ C 下 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 将上清小心转移到新的 1.5 mL 离心管中; 加 2/3 体积预冷的异丙醇, 缓慢混匀, 置于 -20  $^{\circ}$ C 下 30 min; 4  $^{\circ}$ C 下 13 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 弃上清, 用 1 mL 预冷的 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次; 加 100  $\mu$ L 灭菌过的 ddH<sub>2</sub>O, 溶解 DNA。

### 1.3 麦冬 18S~26S rDNA 引物设计

根据 Lee 等<sup>[8]</sup> 的文献资料, 在 18S 和 26S 区域间用 Premier Premier5.0 来设计引物扩增 ITS1 和 ITS2 序列, 引物由上海英骏生物公司合成, 上游引物 P<sub>1</sub> 序列为: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', 下游引物 P<sub>2</sub> 序列为: 5'-TCCTCCGCTTATTGA TATGG-3'。

### 1.4 目的片段 18S~26S rDNA 的 PCR 扩增

PCR 反应体系体积为 50  $\mu$ L: 其中模板 100 ng, 2 mM dNTP 5  $\mu$ L, 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ L; *Taq* 酶 2 U; 引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 各 20 pmol。PCR 扩增程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 1 min; 56  $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 28 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 用含 GoldView 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 在凝胶成像系统上观察。

### 1.5 连接反应

用凝胶回收试剂盒回收纯化扩增得到的片段, 用 T 载体连接, 按 PGEM T-easy Vector 试剂盒提

供的方法进行。

### 1.6 转化

将 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 解冻后放置于冰上, 加入 5  $\mu$ L 的 T 载体连接液, 轻轻摇匀后, 冰上放置 30 min, 42  $^{\circ}$ C 水浴中热击 90 s, 后迅速置于冰上冷却 3~5 min; 向管中加入 1 mL LB 液体培养基 (不含 Amp), 混匀后 37  $^{\circ}$ C 下震荡培养 1 h, 使细胞恢复正常生长状态; 取上述菌液 100  $\mu$ L 涂布于含 Amp、X-GAL 和 IPTG 的筛选平板上, 于 37  $^{\circ}$ C 下培养 8~12 h。

### 1.7 菌落扩繁

用无菌牙签挑取白色单菌落接种到 5 mL LB 液体培养基 (含 50 (g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> Amp) 中, 37  $^{\circ}$ C 培养约 8~12 h 至对数生长期。

### 1.8 菌落鉴定

取菌落的扩繁液 1  $\mu$ L 为模板, 用引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增, 反应体系同目的片段扩增体系。

### 1.9 测序

将每个样品的 5 个重复克隆阳性转化液寄往上海英骏生物技术有限公司进行测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的片段 PCR 扩增结果

供试的植株样品基因组 DNA 进行 18S~26S rDNA-ITS 段 PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示。7 个样品均扩增出约 700 bp 的产物, 电泳条带清晰, 无非特异性条带。

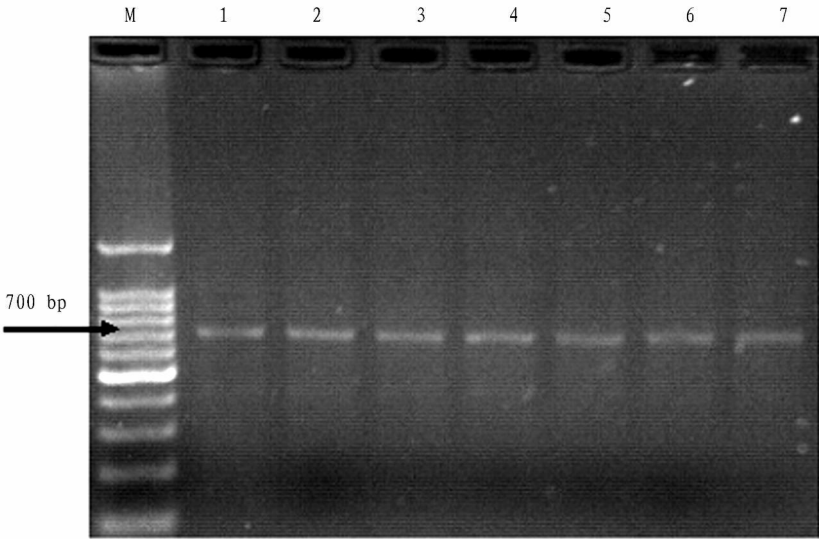
### 2.2 阳性鉴定结果

直接用目的片段的引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 对白色菌落的扩繁液进行 PCR 扩增, 结果如图 2 所示, 7 个样品均扩增出清晰条带来, 表明白斑呈阳性, 即目的片段已转入大肠杆菌。

### 2.3 测序结果

将各样品克隆阳性转化液寄往上海英骏生物技术有限公司进行测序。测定得到供试的 7 个不同产区麦冬和山麦冬 rDNA 的 ITS1、ITS2 及 5.8S rDNA 全序列, 18S 和 26S rDNA 部分序列, 序列长度在 696~711 bp; 其中 ITS1 为 227~246 bp, 5.8S 为 143 bp, ITS2 为 223~230 bp, GC 含量分别为 65.87%、65.58%、65.30%、69.06%、69.20%、68.25%、65.30%。浙江崇寿、浙江庵东、四川三台、湖北襄樊、福建泉州、福建莆田等来源的麦冬植株样品的 18S~26S rDNA-ITS 区序列结果已登录到美国国家生物技术信息中心 NCBI 网站上,

序列号分别为: EU930852 (浙江庵东麦冬)、EU930853 (浙江崇寿麦冬)、EU930854 (川麦冬)、EU930855 (福建泉州麦冬)、EU930856 (福建莆田麦冬)、EU930857 (湖北麦冬)。



注: M 为 Marker; 1 为四川麦冬; 2 为浙江崇寿麦冬; 3 为浙江庵东麦冬; 4 为湖北襄樊麦冬; 5 为湖北新堰麦冬; 6 为福建泉州麦冬; 7 为福建莆田麦冬。图 2 同。

图 1 麦冬 18S~ 26S rDNA ITS 序列 PCR 扩增图  
Fig 1 PCR amplification of 18S- 26S rDNA of *R. Ophiopogonis*

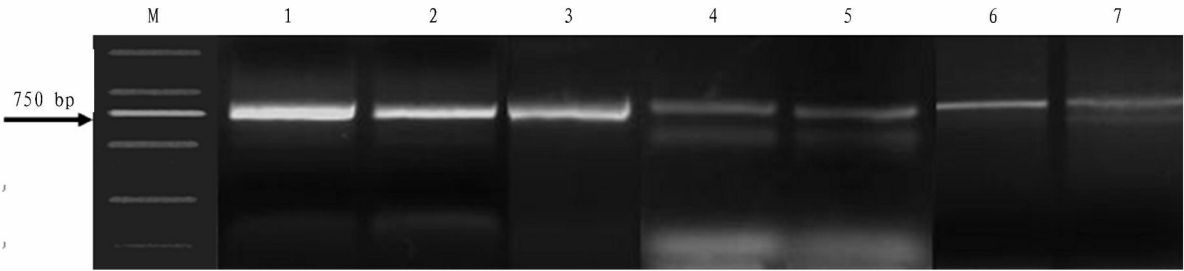


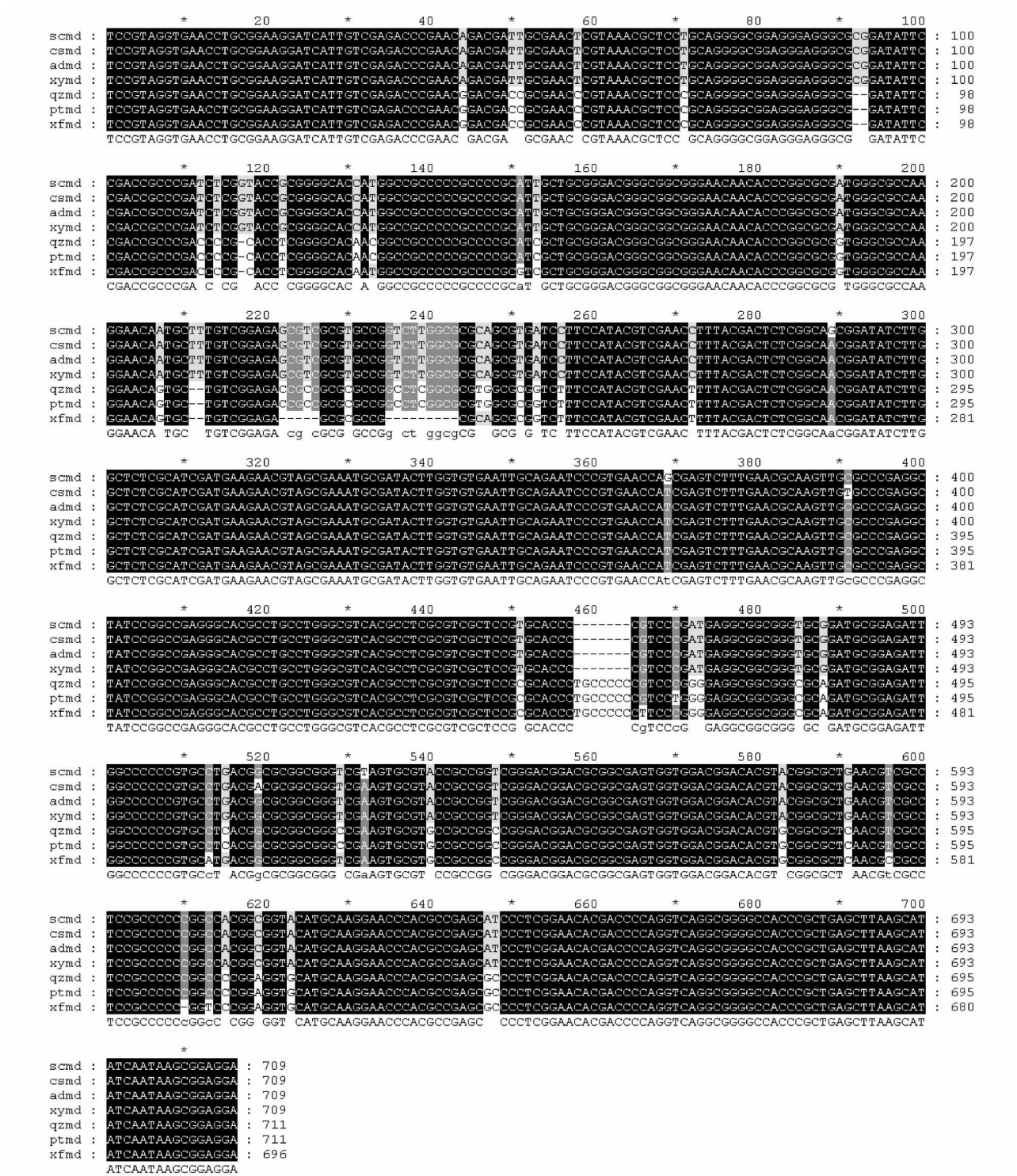
图 2 引物 P1、P2 对 DH5α 转化菌液扩增图  
Fig 2 Amplification of transformation of DH5α with primers P1 and P2

所得序列用 clustalx1.8 同源对齐,必要时进行手工排序,比对结果(图 3)是:川麦冬与浙麦冬 ITS 区序列在第 289、369 和 532 位上各相差 1 个碱基,分别为 G-A、G-T、T-A;浙江崇寿和浙江庵东两地的麦冬 ITS 区序列在第 391 位和第 519 位上各相差 1 个碱基,分别是 T-C 及 A-G;福建泉州麦冬和福建莆田麦冬序列基本一致,仅在第 470 位碱基上相差 1 个碱基(C-T);取自湖北新堰的麦冬 ITS 区序列与浙江崇寿麦冬序列完全一致;泉州麦冬和襄樊麦冬 ITS 序列变异位点较多,可提供丰富的系统学信息,差异位点有第 133 位(C-T)、151 位(A-G)、246 位(T-C)、247 位(G-A)、466 位(G-T)、513 位

(C-A)、515 位(C-G)、529 位(C-T)、596 位(T-C)和 613 位(C-T),在 ITS1 区,襄樊麦冬有“CCGCC”,“GCCTCGGCG”两段碱基缺失;沿阶草属麦冬和山麦冬区别:ITS1 区段的第 44 位(A-G)、第 50-51 位(TT-CC)、第 58 位(T-C)、第 71 位(T-C)、第 112 位(T-C)、第 114 位(T-C)、第 118 位(T-C)、第 122 位(G-T)、第 131 位(C-A)、第 153 位(T-C)、第 190 位(A-G)、第 207 位(A-G)、第 230 位(T-C)、第 251 位(T-C)、第 253 位(A-G)、第 256 位(C-T)、第 272 位(C-T),ITS2 区段的第 451 位(T-C)、第 472-473 位(AT-GG)、第 485 位(T-C)、第 488 位(G-A)、

第 540 位 (A- G)、第 548 位 (T- C)、第 583 位 (A- G)、第 591 位 (G- C)、第 615 位 (A- C)、第 619 位 (C- A)、第 623 位 (A- G)、以及 26S 区段第 647- 648 位 (AT- GC)、另外, 在 ITS1

区段上, 川麦冬和浙麦冬有一“CG”, 而山麦冬缺失; 在 ITS2 区上, 山麦冬有一“TGCCCCC”序列, 而沿阶草属的川麦冬和浙麦冬却没有该段序列。



注: scmd 为四川麦冬; csmd 浙江崇寿麦冬; admd 浙江庵东麦冬; xymd 湖北新堰麦冬; qzmd 福建泉州麦冬; ptmd 福建莆田麦冬; xfmd 湖北襄樊麦冬。图 4 同。

图 3 麦冬 ITS 序列排列  
Fig 3 Arrangement of ITS sequences of *R. Op hiopogonis*

2 4 系统发育树构建

用软件 MEGA4 0 各样品 ITS 区序列的差异性进行分析, 根据 UPGMAM 法构建系统发育树 (图 4), 浙江崇寿、浙江庵东、四川麦冬、湖北新堰麦冬聚为一支, 湖北襄樊麦冬、福建泉州麦冬、福建莆田麦冬聚为另外一支, bootstrap 可信度分析在 87% 以上。浙江庵东和湖北新堰的麦冬 ITS 序列完全一致, 很可能是同一品种, 它们与浙江崇寿及四川麦冬亲缘关系较近, 这 4 个地区的麦冬可能为同一品种在不同地区经过长时间人工驯化栽培而有所差异。福建泉州麦冬和福建莆田麦冬 ITS 序列一致, 为同一品种, 与湖北襄樊麦冬亲缘关系比较近, 可能是这几个地区间引种所致。

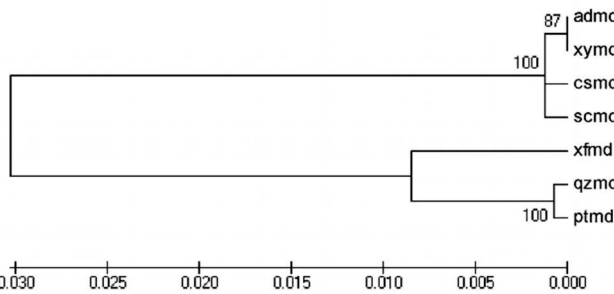


图 4 不同产区麦冬系统发育树

Fig 4 Phylogenetic tree of *R. Op hiopogonis* from different geographical regions

3 讨 论

据调查, 全国各地以麦冬或野麦冬为名的沿阶草属 18 种 (变种) 和山麦冬属 8 种 (变种), 其中有 16 种具块根并有价值。由于种类繁多, 质量参差不一, 市场上存在着将萱草及淡竹叶块根充当麦冬用的假麦冬。中药材通常采用植株形态、药材性状、显微、理化等方法进行鉴别, 但常规的鉴别方法存在一定弊端。传统的外观分类法判断植物种类虽直观、简单、迅速, 但要求研究者应具有丰富的判断经验和分类知识, 而对于麦冬类药材, 其植株形态类型丰富, 依据形态学差异的分类方法存在着争议, 如日本学者原宽认为山麦冬的有无地下走茎、叶片宽度、花序长短程度不同及花萼是否高于叶片等问题, 给依据植物学常规分类方法的物种鉴定带来困难。理化分析往往需要把待测物质从药材中提取出来。而染色体、同工酶技术在测定的过程中也受到很多不定因素的干扰。本研究通过测定主要产区麦冬和山麦冬 18S~ 26S rDNA-ITS 区序列,

从分子水平上揭示了麦冬原植物间的差异, 其结果重复性和准确性都较高, 可为其原植物指纹图谱的鉴别提供分子依据。

本试验测序所得结果, 麦冬和山麦冬的 ITS 区碱基序列有较多位点的差异, 其中在 ITS2 区, 麦冬较山麦冬缺失一段碱基 (“TGCCCC”); 而对山麦冬, 湖北襄樊的麦冬较福建麦冬在 ITS1 区也有两段碱基缺失 (“CCGCC” 和 “GCCTCG-GCG”)。这碱基段的差异可以作为分子鉴别的依据, 前者用于区分麦冬和山麦冬, 后者则可以用于鉴别福建麦冬和湖北麦冬。

本研究中, 所构建的系统发育树将沿阶草属的浙麦冬与川麦冬聚为一支, 而将山麦冬属的短萼山麦冬和湖北麦冬聚为另一支, 这与药典上的规定一致。取自湖北新堰的植物样品 ITS 区测序结果与取自浙江庵东的一样, 系统发育树也聚同一支, 这可能是当地的药农从浙江引种所致。这也从形态上得以体现, 取自湖北新堰的样品, 植株较矮, 叶片绿色, 较细, 无明显的地下走茎, 形态特征与浙麦冬相似; 而湖北麦冬植株较高, 叶片黄绿, 较宽, 有明显的地下走茎, 其典型特征是植株开花后不结果实, 而是在花腋处长出小植株。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典 (2005 年版): 一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[2] 尤海清, 李松, 陈菁瑛. 短萼山麦冬主要数量性状变异及因子分析 [J]. 福建农业学报, 2008, 23 (1): 53- 57.

[3] 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.

[4] BALDWIN B G, SANDERSON A M J, PORTER J M, et al. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny [J]. Ann Missouri Bot Gard, 1995, 82: 247- 277.

[5] 林珊, 郑伟文, 吴锦忠, 等. 不同来源莲 rDNA ITS 的 PCR 扩增、克隆及序列分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (8): 671- 675.

[6] 赵国平, 新关稔, 石川隆二, 等. 中日当归属药用植物 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2006, 37 (7): 1072- 1076.

[7] 余永邦, 秦民坚, 梁之桃, 等. 不同产区太子参的 rDNA ITS 区序列的比较 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12 (4): 1- 5.

[8] LEE S B, RASMUSSEN S K. Molecular markers in some medicinal plants of the Apiaceae family [J]. Euphytica, 2000, 114: 87- 91.

(责任编辑: 翁志辉)