

不同丹参种质的 rDNA ITS 序列分析

刘灵娣, 谢晓亮, 温春秀, 田伟, 刘铭, 高雪飞

(河北省农林科学院 经济作物研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要:为测定丹参核糖体 DNA 的 ITS 序列, 研究比较了 28 份不同来源丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)种质的 ITS 序列。结果表明:丹参 rDNA 的 ITS1、ITS2 及 5.8S rDNA 的完全序列(长度范围在 600~619 bp 之间), ITS1 为 227~228 bp, 5.8S 为 166 bp, ITS2 为 206~224 bp; ITS 区的变异主要发生在内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 区, 其中 ITS1、ITS2 区的变异位点为 31 和 25, 分别占各自区段位的 13.5% 和 11.2%; ITS 序列在丹参种内比较保守, 有些丹参种质之间较小的差异, ITS 序列可以作为丹参种质分子鉴定的依据。

关键词:丹参; ITS 序列; 分子鉴定

中图分类号:S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)20-0146-03

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)为唇形科鼠尾草属多年生草本植物, 以干燥根及根茎入药, 具有祛瘀止痛、活血通经等功效^[1-3]。丹参主要分布于辽宁、河北、河南、山东等省区, 各地虽有栽培品种, 但质量参差不齐, 给丹参种质评价及选优工作造成了障碍, 因此, 为了充分利用丹参种质资源, 寻求一种有效的分子标记方法对不同丹参种质进行快速鉴定, 对丹参种质优劣评价将具有指导意义。

前人对于丹参的鉴定基于生物学性状^[4]、显微结构^[5]、分子标记^[6-7]等。核糖体 DNA 中的内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)序列可以提供较丰富的信息位点。2005 年汪红等^[8]首次研究了丹参 ITS 片段遗传多样性, 并分析了该片段在丹参药材 DNA 分子鉴别和鼠尾草属植物系统研究中的意义, 之后, 2007 年王迎等^[9]也对鼠尾草属药用植物及其近缘种的 ITS 序列进行了分析。该研究拟通过 PCR 直接测序的方法对 28 份丹参种质核基因组 ITS 区序列特点进行分析, 以期对丹参种质的分子鉴定和育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为采自河北、山东、河南、甘肃、陕西等丹参主产区的主要类型 28 份(表 1)。

第一作者简介:刘灵娣(1978-), 女, 河北定州人, 博士, 助理研究员, 现主要从事药用植物栽培育种研究工作。E-mail: nkyliulingdi@126.com.

责任作者:谢晓亮(1962-), 男, 河北清苑人, 博士, 研究员, 现主要从事药用植物栽培育种研究工作。

基金项目:河北省科技支撑计划资助项目(09396428D)。

收稿日期:2012-05-29

表 1 丹参种质来源

Table 1 *Salvia miltiorrhiza* Bge with different sources

名称 Name	来源及类型 Source	名称 Name	来源 Source
Danshen1	河南方城普通 Henan Fangcheng	Danshen 16	河北西安乡普通 Hebei Xian
Danshen 2	河北安国矮茎 Hebei Anguo	Danshen 17	山东临朐圆叶播种苗 Shandong Linqu
Danshen 3	河南卢氏普通 1 Henan Lushi	Danshen 18	陕西洛南普通 Shaanxi Luonan
Danshen 4	陕西商洛普通 Shaanxi Shangluo	Danshen 19	河北井陉野生 Hebei Jingxing
Danshen 5	河南卢氏普通 2 Henan Lushi	Danshen 20	河北安国高茎 Hebei Anguo
Danshen 6	山东临朐株选苗 Shandong Linqu	Danshen 21	河北安国播种苗 Hebei Anguo
Danshen 7	山东临朐脱毒苗 Shandong Linqu	Danshen 22	河北安国普通 Hebei Anguo
Danshen 8	甘肃岷县普通 Gansu Minxian	Danshen 23	河北安国高茎 Hebei Anguo
Danshen 9	山东临朐狭叶播种苗 Shandong Linqu	Danshen 24	河南灵宝普通 1 Henan Lingbao
Danshen 10	河南兖州普通 Henan Yuzhou	Danshen 25	山东临朐播种苗 2 Shandong Linqu
Danshen 11	甘肃陇西普通 Gansu Longxi	Danshen 26	河南灵宝普通 2 Henan Lingbao
Danshen 12	山东临朐播种苗 1 Shandong Linqu	Danshen 27	甘肃陇西细叶 Gansu Longxi
Danshen 13	河北安国播种苗 Hebei Anguo	Danshen 28	河北安国传统 Hebei Anguo
Danshen 14	山东蒙阴白花 Shandong Mengyin		
Danshen 15	山东莒县普通 Shandong Juxian		

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 丹参总 DNA 采用 CTAB 法进行提取, 取新鲜幼嫩叶片 0.5 g, 液氮研磨, 加入

500 μL CTAB 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 20 mmol/L EDTA pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 1% β -巯基乙醇, 2% CTAB), 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 期间不时颠倒混匀; 用等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)抽提 2 次; 上清液加入等体积的异丙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min(以下同); 沉淀用 500 μL 的 SSTE(1 mol/L NaCl, 0.5% SDS, 10 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0)溶解, 用等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)抽提 1 次, 上清液转移至微量离心管中, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 5.2), 2 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 30 min 后离心, 弃去上清, 沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次, 弃去上清, 室温干燥后用适量 DEPC 处理的无菌水悬浮, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增与测序 根据已报道的唇形科鼠尾草属植物的 ITS 区序列, 在 18S 和 26S 区域间用 Premier 5.0 来设计引物扩增 ITS1 和 ITS2 序列, 引物由上海生工生物公司合成, 上游引物 P1 序列为: 5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3', 下游引物 P2 序列为: 5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3'。PCR 扩增: 将下列组分依次加入 0.5 mL 离心管中: 基因组 DNA 1 μL , 加 10 \times buffer 2.5 μL (含 15 mmol/L MgCl_2), 10 mmol/L dNTPs 1.0 μL , 每 1 个引物 1.0 μL (每个 20 $\mu\text{mol/L}$), 0.3 μL Taq DNA 聚合酶(5 $\mu\text{mol/L}$), 用无菌水补足到 25 μL 。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 在凝胶成像系统上观察结果。

1.3 数据分析

用软件 Mage 4.0 对各样品 ITS 区序列特征进行分析统计, 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物测序与序列分析

对供试的 28 个丹参品系植株样品基因组 DNA 进行 18S~26S rDNA-ITS 段 PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 28 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。直接用目的片段引物 P1、P2 对提取出来的质粒进行 PCR 扩增, 挑选阳性克隆。每个丹参种质随机挑取 1~2 个克隆测序。得到供试的 28 个不同丹参种质 rDNA 的 ITS1、ITS2 及 5.8S rDNA 全序列, 长度范围在 600~619 bp, 其中 ITS1 为 227~228 bp, 5.8S 为 166 bp, ITS2 为 206~224 bp。各样本的 ITS 长度及 G+C 含量见表 1。当空位(Gap)作为缺失处理时, ITS 区全序列排序后的长度为 624 位点, 其中 5.8S rDNA 变异较小, 变异位点 8 个, 占 5.8S 区位点的 4.8%, ITS 区的变异主要发生在内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 区。ITS1、ITS2 区的变异位点为 31 和 25, 分别占各自区位点的 13.5% 和 11.2%。内转录间隔区(ITS1+

ITS2)对位排列后总长度为 452 bp, 共有 56 个变异位点, 占总位点比例达到 12.4%, 用邻位相接法(NJ)构建系统树(图 1)。

表 2 丹参 28 个品系的 ITS 区序列长度和 (G+C) 含量

Table 2 Length and G+C content of ITS1, 5.8S and ITS2 of *Salvia*

序号 No.	ITS1		5.8S		ITS2		ITS	
	长度 Length/bp	(G+C) /%	长度 Length/bp	(G+C) /%	长度 Length/bp	(G+C) /%	长度 Length/bp	(G+C) /%
1	227	66.5	166	53.6	221	66.5	614	63.0
2	228	64.5	166	53.6	220	67.3	614	62.5
3	228	64.9	166	53.6	206	66.0	600	62.2
4	228	60.1	166	49.4	221	66.5	615	59.5
5	228	64.5	166	53.6	222	67.1	616	62.5
6	228	64.5	166	53.6	222	67.1	616	62.5
7	228	64.5	166	53.6	221	67.0	615	62.4
8	228	64.9	166	53.6	221	67.4	615	62.8
9	228	64.9	166	53.6	221	67.4	615	62.8
10	228	64.9	166	53.6	221	67.4	615	62.8
11	228	64.9	166	53.6	221	67.4	615	62.8
12	228	64.5	166	53.6	221	67.0	615	62.4
13	228	64.9	166	53.6	221	66.1	615	62.3
14	228	60.1	166	49.4	221	66.1	615	59.3
15	228	64.5	166	53.6	222	66.2	616	62.2
16	228	64.9	166	53.6	222	67.1	616	62.7
17	228	64.5	166	53.6	222	66.7	616	62.3
18	228	64.5	166	53.6	222	67.1	616	62.5
19	228	68.0	166	53.6	221	67.0	615	63.7
20	228	64.5	166	53.6	224	67.0	618	62.5
21	228	64.5	166	53.6	223	65.0	617	61.8
22	228	64.5	166	53.6	218	66.5	612	62.3
23	228	64.5	166	53.6	222	66.7	616	62.3
24	228	64.5	166	53.6	217	67.7	611	62.7
25	228	64.5	166	53.6	222	66.7	616	62.3
26	228	64.5	166	53.6	222	66.7	616	62.3
27	228	64.5	166	53.6	223	67.3	617	62.6
28	228	64.5	166	53.6	222	66.7	616	62.3

2.2 丹参各种质类型 rDNA ITS 序列结果分析

以 ITS 序列为数据, 通过 UPGMA 法建立的系统树进行聚类可以分成四大类群, 第一类群包括陕西商洛丹参和山东蒙阴丹参。第二类群为山东临朐丹参。第三类群包括河北安国和甘肃陇西丹参。第四类群分为 6 个亚类, 记为亚类 I 至亚类 VI, 其中亚类 I 包括河南卢氏丹参、河北西安国乡丹参、山东临朐 2 种类型丹参; 亚类 II 包括甘肃岷县丹参、甘肃陇西丹参、河南禹州丹参、山东临朐丹参、河南方城丹参、河南卢氏丹参和河北安国丹参; 亚类 III 包括山东莒县丹参; 亚类 IV 包括陕西洛南丹参 3; 亚类 V 包括河北井陉丹参、山东临朐 2 种类型丹参、河南灵宝丹参和河北安国 2 种类型丹参; 亚类 VI 包括河北安国 3 种类型丹参和河南灵宝丹参。

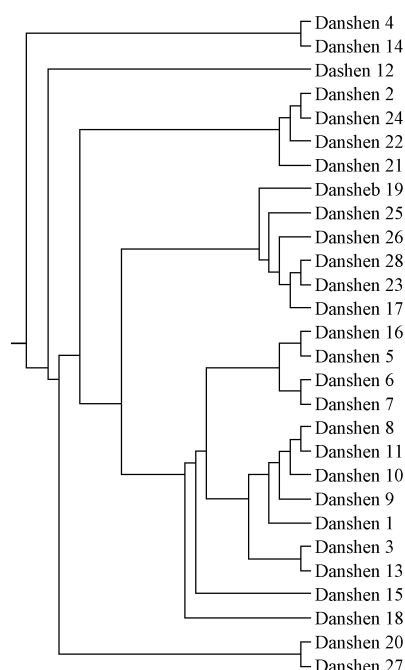


图1 UPGMA 聚类树

Fig. 1 UPGMA clustering tree

3 讨论

丹参的生态适应性强,在我国广泛分布。同时,丹参又是异花授粉植物,因此保持了较高的遗传变异水平。ITS 序列等分子标记是直接根据生物 DNA 的多态特征,通过序列对比分析得到相当稳定的信息位点,结果更为客观和准确。在种内,ITS 序列对于揭示异域分布或间断分布居群间的关系具有很大潜力^[10]。许亮等^[11]对牛蒡子及其伪品的 ITS 序列进行分子鉴定,研究认为根据 ITS 序列能有效区分牛蒡子与伪品。汪红等^[8]研究认为丹参种内 ITS1 序列差异百分率为 0~0.9%,ITS2 为 0~0.5%。王迎等^[9]采用分子系统学方法分析鼠尾草属药用植物及其近缘种的亲缘关系,显示 5.8S rDNA 序列相当保守,而 ITS 区段则在亚属间差异

明显。该研究利用 rDNA ITS 序列方法分析 28 份丹参种质的遗传多样性,表明 ITS 区序列差异在 12.4%,相对比较丰富。类群四类型最多,大部分为河北丹参、河南丹参和山东丹参,表明这 3 个地方丹参种质交流栽培广泛。河南丹参与河北丹参有一定的遗传相似性。种群四的不同亚群,能将不同产地的丹参很好地区分开来,一个亚群内多为同一产地丹参。

该研究结果表明采用 rDNA-ITS 方法,可以将 28 个丹参材料明确划分,表明此方法在丹参资源材料识别与区分上表现出的高分辨率,足以用于丹参种内分化、演化及其与地理分布间关系的研究。ITS 序列分析在丹参快速分类鉴定方面具有很强优势,此技术可以作为鉴别丹参不同类型间遗传变异的手段。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 中国药典[M]. 1 部. 北京: 化学工业出版社, 1995: 63.
- [2] 董继萃,徐纳李. 乙酰丹酚酸 A 对大鼠大脑中动脉血栓所致局部缺血性损伤的保护[J]. 药学报, 1996, 30(3): 6-9.
- [3] 胡义杨,刘平,刘成,等. 丹酚酸 A 抗四氯化碳中毒致大鼠肝损伤和肝纤维化作用[J]. 中国药理学, 1997, 18(5): 478-480.
- [4] 舒志明,梁宗锁,孙群,等. 不同丹参种质生物学性状比较与评价[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2007, 10(2): 24-29.
- [5] 舒志明,梁宗锁,曹翠兰,等. 不同丹参品种主要器官的显微结构比较[J]. 西北农业学报, 2005, 14(5): 61-65, 78.
- [6] 唐晓清,王康才,陈喧,等. 丹参不同栽培农家类型的 AFLP 鉴定[J]. 药物生物技术, 2006, 13(3): 182-186.
- [7] 温春秀,吴志明,田伟,等. 丹参种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 122-125.
- [8] 汪红,王强. 丹参及鼠尾草属植物的 rDNA ITS 序列分析[J]. 中草药, 2005, 36(9): 1381-1385.
- [9] 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]. 药学报, 2007, 42(12): 1309-1313.
- [10] 刘杨楠,许亮,窦德强,等. 不同产地牛蒡 rDNA ITS 的 PCR 扩增、克隆及序列分析[J]. 中药材, 2010, 33(1): 26-28.
- [11] 许亮,窦德强,王冰,等. 牛蒡子及其伪品的 ITS 序列分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 338-341.

rDNA ITS Sequence Analysis of Different Germplasm of *Salvia miltiorrhiza* Bge

LIU Ling-di, XIE Xiao-liang, WEN Chun-xiu, TIAN Wei, LIU Ming, GAO Xue-fei

(Institute of Economic Crop Research, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050051)

Abstract: In order to study rDNA ITS sequence of *Salvia*, the rDNA ITS sequence of twenty-eight *Salvia* germplasm from different area were analyzed. The results showed that the length of rDNA ITS gene sequence of *Salvia* was 600~619 bp, including ITS1 (227~228 bp), 5.8S (166 bp) and ITS2 (206~224 bp). There were thirty-one variable sites in the ITS1 area (it was 13.5% of total site), twenty-five variable sites in the ITS2 area (it was 11.2% of total site). The ITS1 and ITS2 gene fragments were conservative at specific level in *Salvia*, while there were less difference among some germplasm, so they could be molecular marker for authentication of *Salvia*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge; different germplasm; rDNA ITS sequence