

基于 ITS 序列云南老虎须( *Tacca chantrieri*) 居群遗传多样性的探讨

赵月梅<sup>1 2</sup> 张玲<sup>2\*</sup> (1. 商洛学院生物医药工程系, 中国中医研究院商洛中药材 GAP 科研工程中心, 陕西商洛 726000; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303)

**摘要** [目的]研究9个云南老虎须居群的亲缘关系,为该种质资源的合理利用和保护提供理论依据。[方法]利用ITS序列分析技术,对采自云南省的9个老虎须居群共118个样品进行遗传多样性研究。[结果]9个老虎须居群的样品的ITS序列被分成了2个大组,滇南4个居群聚为一组,滇东南的5个居群聚为另一组。9个居群共6个单倍型,两组之间无重合单倍型。[结论]老虎须的遗传多样性很低,遗传变异主要存在于居群之间。这可能是由于云南分布的老虎须是以自交为主的植物,因此对老虎须进行迁地保护时应该是尽量引种多个居群。  
**关键词** 老虎须; ITS 序列; 遗传多样性  
**中图分类号** R282.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2011)34-21014-02

**Discussion on Genetic Diversity of *Tacca chantrieri* Population in Yunnan Province Based on ITS Sequence Analysis**  
**ZHAO Yue-mei et al** (Biological Medicine Engineering Department of Shangluo University, Shangluo GAP Research Engineering Center for Traditional Chinese Medicine, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Shangluo, Shaanxi 726000)  
**Abstract** [Objective] The study aimed to investigate the genetic relationship among 9 populations of *Tacca chantrieri* in Yunnan Province and provide the theoretical basis for the rational utilization and protection of the germplasm resources. [Method] The ITS sequence analysis technology was used to make for the research on the genetic diversity of 118 samples collected from 9 populations of *Tacca chantrieri* in Yunnan Province. [Result] The samples from 9 populations were divided into 2 groups: one included 4 populations from the south of Yunnan Province; another included the rest 5 populations from the southeast of Yunnan Province. There were 6 haplotypes in 9 populations and there was noncoincidence haplotype between 2 groups. [Conclusion] *T. chantrieri* showed a very low genetic diversity, the genetic variation was mainly among populations. This may be attributed to that the *T. chantrieri* distributed in Yunnan Province is the plant with the self-pollination as the main. Therefore, the more populations should be introduced as far as possible when *T. chantrieri* was made for the off-site preservation.  
**Key words** *Tacca chantrieri*; ITS sequence; Genetic diversity

老虎须(*T. chantrieri*)又名蒟蒻薯、大叶屈头鸡、老虎汤、老虎花、山大黄<sup>[1]</sup>,分类学上属于薯蓣科(Dioscoreaceae)蒟蒻薯属(*Tacca*)是热带雨林中一种引人注目的多年生草本植物。其花型、花色独特,胡须状的小苞片长几十厘米,紫黑色,飘逸下垂,形如胡须,整个花序看上去像一张老虎的面孔,故名为“老虎须”。老虎须根茎入药,性凉味苦,能清热解毒,消炎止痛,主治胃及十二指肠溃疡、高血压、肝炎、胃痛、烫伤烧伤、疮疡等,具有重要的药用价值<sup>[2]</sup>。老虎须分布区很广,主要在印度东北部、孟加拉、缅甸、泰国、老挝、越南、柬埔寨、马来半岛和我国滇、桂、粤、琼等省区。由于它具有特殊的花型、花色等特点已被园艺工作者大量运用于园林营造,同时由于其重要的药用价值也促使其被过度采挖,加之目前自然环境日益遭到破坏,使得老虎须的生境也处于濒危状态。至1992年该物种被国家列为保护植物<sup>[3]</sup>。

转录间隔区(ITS)存在于高度重复的核糖体DNA中,位于18S和26S基因之间,由5.8S基因分为ITS1和ITS2两个区段,ITS序列变异较快,可以提供丰富的变异位点和信息位点,已经被证实它是许多植物类群系统分类与进化的重要分子标记<sup>[4]</sup>。笔者通过对云南省9个居群的老虎须样品的ITS序列变异性的比较来研究这些老虎须样品在进化上的亲缘关系,以期为该物种的合理利用和保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 研究选取了云南省老虎须分布区的共9个

**基金项目** 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-Z-0904)和科技部大科学装置工程项目(2009-LSF-GBOWS-01)。  
**作者简介** 赵月梅(1982-),女,辽宁锦州人,助教,硕士,从事植物谱系地理方面的研究。\*通讯作者,博士,副研究员,硕士生导师,E-mail: zhangl@xtbg.org.cn。  
**收稿日期** 2011-02-07

居群的样品,材料来源见表1。

表1 老虎须居群信息  
Table 1 Population descriptions of *T. chantrieri*

| 编号<br>No. | 种群缩写<br>Abbreviation | 取样数<br>Sample size | 地理位置<br>Position    | 海拔<br>Altitude<br>m | 单倍型组成<br>Haplotype composition |
|-----------|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|
| 1         | 坝沙河 BSH              | 14                 | 22°53' N, 101°56' E | 680 ~ 960           | H1                             |
| 2         | 古林箐 GLQ              | 10                 | 22°45' N, 103°58' E | 700 ~ 1 200         | H3                             |
| 3         | 芹菜塘 QCT              | 10                 | 22°40' N, 104°01' E | 680 ~ 780           | H3                             |
| 4         | 野象谷                  | 14                 | 22°10' N, 100°51' E | 760                 | H2                             |
| 5         | 田蓬 TP                | 10                 | 23°12' N, 105°32' E | 900                 | H4                             |
| 6         | 望天树 WTS              | 20                 | 21°37' N, 101°35' E | 680                 | H1                             |
| 7         | 小黑江 XHJ              | 20                 | 23°21' N, 100°55' E | 800                 | H1                             |
| 8         | 麻栗坡 MLP              | 10                 | 22°58' N, 104°51' E | 800                 | H5                             |
| 9         | 德隆 DL                | 10                 | 23°17' N, 105°50' E | 600                 | H6                             |

1.2 DNA 的提取 DNA 提取采用CTAB法提取全基因组DNA<sup>[5]</sup>,将DNA溶于TE溶液中,终浓度大约为50 ng/μl。

1.3 ITS 序列的扩增与测定 PCR 扩增反应在PERKIN ELMER(PE)9700型PCR仪上进行。ITS片段扩增反应程序采用:97℃预变性3 min,95℃变性2 min,54℃退火1.5 min,72℃延伸1 min。32个循环后,72℃延伸7 min。扩增反应采用20 μl的反应体系:包括30~60 ng的模板DNA,2 μl 10× buffer,0.5单位的Taq DNA聚合酶(5 U/μl),1.5 μl的MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L),1.5 μl的dNTPs(10 mmol/L),正反向引物各2 μl(5 μmol/L),再添加蒸馏水至20 μl。采用通用引物ITS5:(5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3'),ITS4:(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(引物由上海生物工程公司合成);扩增得到的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后,用上海生物工程技术服务有限公司的纯化试剂盒纯化并测序。鉴于ITS5端存在着测序难度,所以采用ITS4端单

向测序。

**1.4 序列分析** 采用 BIOEDIT<sup>[6]</sup> 进行序列查看; 用 Clustal X 2.0<sup>[7]</sup> 进行序列比对并人工校正, 用 DnaSP 计算单倍型类型、单倍型多样性( *h* ) 和核苷酸多样性(  $\pi$  ); 用 MEGA 4.0<sup>[8]</sup> 进行系统发育分析, 并以自展法进行检测, 共循环 1 000 次; 采用邻接法( Neighbor-Joining ) 构建严格一致的树; 然后用 Kimura 双参数模型构建单倍型之间序列差异的矩阵。

2 结果与分析

**2.1 老虎须 ITS 序列多态性分析** 对老虎须 ITS 片段测序, 获得 582 bp 碱基对。其中 G + C 含量为 63.3%, 118 个样本共检测到多态性核苷酸变异位点 10 个( 占全部碱基数目的 1.72% ), 信息位点 9 个( 表 2 ), 序列中 1 个插入/缺失, 其余均为碱基之间的转换或颠换, 转换/颠换( R ) 为 1.25。

表 2 老虎须 6 种单倍型 ITS 变异位点信息  
Table 2 Variable sites of the aligned sequences of the ITS in 6 haplotypes of *T. chantrieri*

| 单倍型<br>Haplotypes | 位点 Site |    |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------|---------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | 38      | 72 | 119 | 198 | 268 | 295 | 481 | 510 | 554 | 580 |
| H1                | A       | G  | G   | C   | -   | T   | G   | G   | C   | A   |
| H2                | A       | G  | G   | C   | -   | T   | C   | G   | C   | A   |
| H3                | G       | A  | C   | A   | -   | T   | C   | A   | C   | G   |
| H4                | G       | A  | C   | C   | -   | T   | C   | A   | C   | G   |
| H5                | G       | A  | C   | A   | G   | G   | C   | A   | T   | G   |
| H6                | G       | A  | C   | C   | -   | T   | C   | A   | T   | G   |

**2.2 个体间的多态性分化、遗传距离及系统树的构建** 根据对 9 个居群共 118 个样本的分析, 共产生 6 种单倍型。单倍型 H1 分布于滇南 3 个居群中, 即 H1 为 XHJ、BSH 和 WTS 3 个居群的共享单倍型; H2 为 YXG 居群特有单倍型; H3 为 GLQ 和 QCT 两个居群共享; H4 只分布于 TP 居群; H5 为 MLP 居群独有单倍型; H6 为 DL 居群独有单倍型。NJ 树中聚成两大组的各居群之间无共享单倍型( 表 1 )。单倍型之间的核苷酸变异率为 0.2% ~ 1.6% ( 表 3 ), 平均 0.75%。单倍型多样性( Haplotype diversity ) 指数和核苷酸多样性( Nucleotide diversity ) 指数分别为:  $h = 0.732$  ( 0.032 ) 和  $\pi = 0.00652$  ( 0.00027 )。由 MEGA4.0 生成的 NJ 树可知: 6 个单倍型聚成 2 大组, H3、H4、H5、H6 聚为一组( 组 I ); H1、H2 聚为另一组( 组 II )。结合单倍型所在居群的位置, 即: 位于滇东南的 5 个居群 GLQ、TP、QCT、MLP、DL 5 个居群聚为一组( 组 I ), 位于滇南的 4 个居群 BSH、XHJ、WTS、YXG 聚为一组( 组 II ) ( 图 1 )。

表 3 老虎须各单倍型间基因序列差异  
Table 3 Sequence divergence among haplotypes of *T. chantrieri*

| 单倍型 Haplotypes | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 1. H1          |       |       |       |       |       |   |
| 2. H2          | 0.002 |       |       |       |       |   |
| 3. H3          | 0.012 | 0.010 |       |       |       |   |
| 4. H4          | 0.010 | 0.009 | 0.002 |       |       |   |
| 5. H5          | 0.016 | 0.014 | 0.003 | 0.005 |       |   |
| 6. H6          | 0.012 | 0.010 | 0.003 | 0.002 | 0.003 |   |

3 讨论

该研究利用 ITS 序列变异得知该序列碱基的转换/颠换( R ) 为 1.25, 小于 2, 说明碱基替代已达到饱和<sup>[9]</sup>, 这可能是

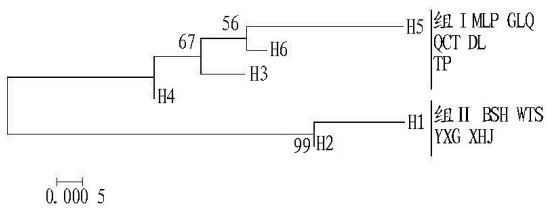


图 1 基于 ITS 区基因序列构建无根 NJ 树  
Fig. 1 Unrooted neighbour-joining (NJ) tree based on ITS sequence

由于某些位点发生了多次转换替代, 转换出现了饱和现象<sup>[10]</sup>; 序列中 G + C 含量达到 63.3%, 说明该序列保守性很强; 单倍型间的核苷酸平均变异率为 0.75%, 处于较低的遗传变异水平; 滇南的 3 个居群 BSH、WTS 和 XHJ 共同享有单倍型 H1, 滇东南的 GLQ 和 QCT 2 个居群共同享有单倍型 H3, 其余居群均为各自的独有单倍型, 而居群之内单倍型多样性均为 0, 说明变异均存在于居群之间, 所以在制定保护政策时要尽量兼顾到更多的小居群, 不能只保护数量大的居群, 以防止其遗传多样性的降低。利用 MEGA4.0 构建 NJ 树得知云南老虎须居群遗传结构的特点: 滇东南的 5 个居群 GLQ、QCT、TP、MLP 和 DL 亲缘关系较近, 聚为一组( 组 I ); 滇南的 4 个居群 XHJ、BSH、YXG 和 WTS 之间亲缘关系较近, 聚为另一组( 组 II ), 两组无共享单倍型, 遗传距离最大。这一结果与张玲等用 ISSR 得出的结论相符<sup>[11]</sup>, 有可能是与居群所在的地理和生态环境等下列原因有关: ( 1 ) 朱华针对云南热带 - 亚热带植物区系的分布格局根据植物类群上的相似性证明了滇西、滇南地区与滇东南地区原属于不同的大陆板块<sup>[12]</sup>, 因此研究中位于滇南的 4 居群亲缘关系较近, 而位于滇东南的 5 居群亲缘关系较近; ( 2 ) 老虎须是以自交为主的植物<sup>[13]</sup>, 这种繁殖方式也使得居群之间遗传变异更大, 形成共享单倍型的机会减少; ( 3 ) 老虎须多生长在林下小溪边等阴湿的环境, 这种生境导致大部分种子只能通过小溪等水路传播, 相对风力、动物等传播方式来讲, 可传播的范围要小的多。以上几点均可以导致目前云南老虎须居群之间交流的局限性。

ITS 序列解决了很多被子植物不同分类等级的遗传分化问题<sup>[14-17]</sup>, 研究结果也证明 ITS 序列适用于老虎须物种种内不同居群之间的遗传关系的研究, 因此该序列对于研究老虎须居群甚至该属的其他物种种内、种间的系统发育问题都具有一定的参考意义。

参考文献

[1] 张玲. 药蕨科植物的系统学、物种生物学与进化生态学研究[D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2006.  
[2] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.  
[3] FU L K, JIN J M. China plant red data book-Rare and endangered plants [M]. Beijing, China: Science Press, 1992: 642-643.  
[4] 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.  
[5] DOYLE J, DOYLE J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemistry, 1987, 19: 11-15.  
[6] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium

( 下转第 21036 页 )

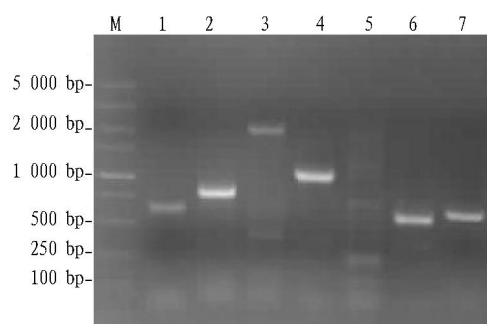
## 2 结果与分析

**2.1 菌株形态及染色特征** 在温度 37 ℃ 的 THB 固体培养基中培养 24 h 后,菌落生长良好,平板上菌落形态均为圆形、微凸、表面光滑、半透明、灰白色,直径约 0.5 ~ 1 mm。液体培养物以长链为主,有大量絮状沉淀生成于试管底部。挑取单个菌落进行革兰氏染色镜检,显微镜下呈蓝紫色,链长短不一,单个或成对分布,多数呈 3 ~ 5 个短链排列,少数为 6 ~ 10 个长链排列,为革兰氏阳性链球菌。

**2.2 溶血性试验结果** 通过点接种,分离菌株在绵阳血平板上大部分无溶血现象,菌落周围无溶血环,溶血阴性为  $\gamma$  型溶血链球菌,仅少数呈现弱的  $\alpha$  溶血(图 1)。

**2.3 种属鉴定结果** 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳图谱中在约 500 bp 处有 1 条特异性亮带,与预期片段大小相符(图 2),可确定扩增出的 PCR 产物为 16S rDNA。将 PCR 产物回收纯化后送交大连宝生物工程公司进行测序,共测得部分 16S rDNA 碱基序列为 557 bp。BLAST 结果表明所得序列与猪链球菌的同源性最高达 99%。从图 3 可以看出,该菌株属于猪链球菌 2 型。

**2.4 毒力因子的检测结果** 设计 7 对引物来检测毒力因子的分布。*ef*、*mrp* 和 *sly* 一直被认为是猪链球菌的 3 种重要毒力因子,但毒力因子 *mrp* 只在目的片段附近出现弱的表达。其他毒力因子表达明显,毒力因子分布结果为: *cps2J*<sup>+</sup>/*orf2*<sup>+</sup>/*fbps*<sup>+</sup>/*sly*<sup>+</sup>/*mrp*<sup>-</sup>/*ef*<sup>+</sup>/*gdh*<sup>+</sup>。扩增出的片段大小与预期目的基因一致(图 4)。



注: M. DL5000 Marker; 1~7 分别为 *cps2J*、*orf2*、*fbps*、*sly*、*mrp*、*ef*、*gdh*。  
Note: M. DL5000 Marker; 1~7 are *cps2J*, *orf2*, *fbps*, *sly*, *mrp*, *ef* and *gdh*.

图 4 毒力因子的 PCR 鉴定结果  
Fig. 4 Detection of the virulence genes by PCR

## 3 小结

该试验将常规菌种鉴定方法与 16S rDNA 序列分析技术相结合。16S rDNA 序列同源性分析结果表明,分离菌株与猪链球菌同源性高,同源率最高达 99%,并确定该分离菌株为猪链球菌 2 型。

猪链球菌 2 型致病力的差异与该菌株的毒力因子有着密切的联系<sup>[7]</sup>,猪链球菌的致病力存在个体差异,致病力的大小有强弱之分<sup>[8]</sup>。毒力因子 *mrp* 和 *ef* 在强毒株中检出率很高,在非致病菌株中检出率很低,因此 *mrp* 和 *ef* 常被认为是猪链球菌 2 型高致病性的标志<sup>[9]</sup>。曾巧英等<sup>[10]</sup>研究表明 *mrp* 可单独作为猪链球菌 2 型的毒力因子。该试验选取 7 种主要毒力因子对分离菌株进行 PCR 检测,除 *mrp* 的表达较弱外,均检测到其他 6 种毒力因子。赵冉等<sup>[11]</sup>研究表明在 25 株国内致病性猪链球菌 2 型分离株中 96% (24/25) 具有毒力基因型 *cps2J*<sup>+</sup>/*orf2*<sup>+</sup>/*fbps*<sup>+</sup>/*sly*<sup>+</sup>/*mrp*<sup>-</sup>/*ef*<sup>+</sup>/*gdh*<sup>+</sup>。方勤美等<sup>[6]</sup>研究表明我国猪链球菌毒力因子的主要基因型是同时具备这 7 种毒力因子。该试验中分离菌株与猪链球菌 2 型的多数致病株毒力性分布情况相一致<sup>[3]</sup>,可为下一步研究该分离菌株的致病机理奠定基础。

## 参考文献

- [1] 魏新强. 浅析猪的链球菌病[J]. 科技信息, 2010(13): 411.
- [2] 齐翀. 猪链球菌 2 型毒力相关基因的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008: 2-12.
- [3] 冯亚莉. II 型猪链球菌毒力因子基因的鉴定及其表达调控[D]. 贵阳: 贵州大学, 2007: 4-18.
- [4] 赵翠燕, 罗绿花, 谭淑红. 鸡源性链球菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 甘肃农业科技, 2009(2): 15-17.
- [5] 陈开森, 余阳, 孙爱娣. 一株马腺片球菌的分离、鉴定及其部分 16S rDNA 基因序列测定[J]. 江西医学院学报, 2009, 49(2): 41-43.
- [6] 方勤美, 黄绍谦, 俞伏. 猪链球菌 2 型福建分离株的主要毒力基因分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(1): 65-68.
- [7] 田云, AARESTRUP F M, 陆承平. 猪链球菌 2 型可能的毒力基因的发现[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 613-616.
- [8] 赵永刚, 王君玮, 王志亮. 猪链球菌 2 型四川分离株毒力基因的检测及其序列分析[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(3): 25-28.
- [9] NORTON P, ROLPH C, WARD P et al. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999, 26(1): 25-35.
- [10] 曾巧英, 陆承平. 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白诱导上皮细胞融合和凋亡[J]. 微生物学报, 2003, 43(3): 407-411.
- [11] 赵冉, 孙建和, 陆承平. 猪链球菌国内分离株毒力因子的分布特征[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2006, 24(6): 503-506, 528.

(上接第 21015 页)

um Series, 1999, 41: 95-98.

- [7] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [8] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599.
- [9] KINGHT A, MINDELL D P. Substitution bias, weighting of DNA sequences evolution and the phylogenetic position of *Fea'svip*[J]. Systematic Biology, 1993, 42(1): 18-31.
- [10] 宋宇婷, 马大龙, 隋心. 黑龙江、吉林地区松茸 ITS 序列遗传多样性分析[J]. 中国酿造, 2011(1): 133-136.
- [11] ZHANG L, LI Q, JI H T et al. Genetic diversity and geographic differentiation in *Tacca chantrieri* (Taccaceae): an autonomous selfing plant with showy floral display[J]. Annals of Botany, 2006, 98: 449-457.
- [12] 朱华, 阎丽春. 再论“田中线”和“滇西-滇东南生态地理(生物地理)对角线”的真实性和意义[J]. 地球科学进展, 2003, 18(6): 870-876.

- [13] ZHANG L, BARRETT S C H, GAO J Y et al. Predicting mating patterns from pollination syndromes: The case of “sapromyophily” in *Tacca chantrieri* (Taccaceae) [J]. American Journal of Botany, 2005, 92: 517-524.
- [14] GURUSHIDZE M, MASHAYEKHI S, BLATTNER F R et al. Phylogenetic relationships of wild and cultivated species of *Allium* section *Cepa* inferred by nuclear rDNA ITS sequence analysis[J]. Plant Systematics and Evolution, 2007, 269(3/4): 259-269.
- [15] BLATTNER F R. Phylogenetic analysis of *Hordeum* (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequence analysis[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 33: 289-299.
- [16] BALDWIN B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plant: an example from the Compositae [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1992, 1: 3-16.
- [17] KORNKVEN A B, WATSON L E, ESTES J R. Phylogenetic analysis of *Artemisia* section *Tridentatae* (Asteraceae) based on sequences from the internal transcribed spacers (its) of nuclear ribosomal DNA [J]. American Journal of Botany, 1998, 85(12): 1787-1795.