

基于 ITS 序列的不同产地裂叶荆芥系统发育分析

刘红彬¹, 顾小龙², 张海红¹, 张丹参¹

(¹河北北方学院药理学系, 张家口 075000; ²河北北方学院动物科技学院, 张家口 075000)

摘要: 采用 PCR 法扩增来自国内 5 个不同产地的裂叶荆芥 ITS 全序列, 测序后以产自河北的裂叶荆芥代表中国裂叶荆芥与来自不同国家的裂叶荆芥 ITS 序列进行比较, 构建分子系统发育树, 探讨国内 5 个不同产地及不同国家的裂叶荆芥的亲缘关系和系统进化。结果表明: 国内 5 个不同产地的裂叶荆芥 ITS1 和 ITS2 序列均有较高的 G/C 含量; 5 个产地的裂叶荆芥的扩增序列长度均为 749bp, 且序列完全相同; 其中 ITS1 序列长 231bp, 5.8S 序列长 168bp, ITS2 序列长 236bp。中国裂叶荆芥与日本、韩国裂叶荆芥 ITS 序列一致性为 100%, 与美国裂叶荆芥 ITS 序列一致性为 99.0%。与美国裂叶荆芥相比, 中国裂叶荆芥 ITS 序列有 7 个碱基发生变异。来自不同国家的裂叶荆芥形成单系群和 2 个分支(中、日、韩 3 国为 1 个分支, 美国单独形成 1 个分支)。ITS 序列的一致性表明国内 5 个不同产地裂叶荆芥为同一个种。

关键词: 裂叶荆芥; 产地; ITS; PCR; 测序; 系统发育分析

Phylogenetic Analysis of *Schizonepeta tenuifolia* from Different Producing Areas Based on ITS Sequences

LIU Hong-bin¹, GU Xiao-long², ZHANG Hai-hong¹, ZHANG Dan-shen¹

(¹School of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000;

²College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract: The genetic relationship and evolutionary system of *Schizonepeta tenuifolia* from 5 different producing areas in China were analyzed based on the ribosome ITS1 and ITS2 sequences. Their complete ITS and 5.8S sequences on the ribosome region were amplified by PCR and were analyzed by software Clustal X(2.0) Multiple Sequence Alignments and Neighbor Joining. ITS sequence of *S. tenuifolia* from Hebei Province representing Chinese *S. tenuifolia* was compared with those from United States, Japan, and Korea to construct phylogenetic tree. The results showed G/C contents of ITS1 and ITS2 sequences of *S. tenuifolia* from 5 different producing areas were high. ITS length was all 749bp for *S. tenuifolia* from 5 different producing areas with the same ITS sequence. Lengths of ITS1, 5.8S, and ITS2 were 231bp, 168bp, and 236bp respectively. The ITS sequence similarity was 100% among *S. tenuifolia* from China, Japan, and Korea; and 99% between those from China and America. Compared with *S. tenuifolia* from America, *S. tenuifolia* from China had 7 bases mutation. On the base of ITS sequence data, *S. tenuifolia* from different counties constructed a monophyletic group with 2 branches, one was consisted of *S. tenuifolia* from China, Japan, and Korea, the other one was only consisted of that from America. ITS sequence similarity suggested that *S. tenuifolia* from 5 different producing areas belonged to one species.

Key words: *Schizonepeta tenuifolia*; Producing area; ITS; PCR; Sequence; Phylogenetic analysis

中药荆芥为唇形科 (*Labiatae*) 植物裂叶荆芥 (*Schizonepeta tenuifolia*) 的干燥地上部分, 具有祛风

解表、宣毒透疹、散瘀止血之功效^[1], 主治风寒感冒、咽喉肿痛及多种皮肤病, 为中医临床常用药物。

收稿日期: 2011-12-24 修回日期: 2012-03-26

基金项目: 河北省中医药管理局课题 (2011100); 河北省教育厅课题 (Z2010117)

作者简介: 刘红彬, 硕士, 讲师, 主要从事中药材质量控制研究。E-mail: snowwhite_lhb@163.com

通信作者: 张丹参, 博士, 教授, 主要从事神经药理学研究。E-mail: ds2011@yahoo.com.cn

现代药理研究证明,荆芥还具有抗菌消炎和解热镇痛的作用^[2-3]。裂叶荆芥在我国大部分地区有分布,多系栽培,主产地为河北、江苏、浙江、安徽、江西、湖北等地。近年来对荆芥的研究集中在化学成分、炮制和药理作用等方面^[4-7],对种质资源的分子研究较少,仅见高峰^[8]利用简单重复序列间标记技术(ISSR)考察了9个产地裂叶荆芥的遗传多样性。

高等植物编码核糖体 RNA 的基因是高度重复的串联序列,其中编码 18S、5.8S、26S 的 rDNA 为 1 个转录单位,在该转录单位中,ITS (internal transcribed spacer, ITS) 是介于 18S 和 5.8S 之间(ITS1)以及 5.8S 和 26S 之间(ITS2)的非编码转录区,其转录产物在 rRNA 的加工过程中被切掉。ITS 序列为中度保守序列,其具有进化速率快,片段长度小(在大多数被子植物中都小于 700bp),由于协同进化使这个片段在不同的重复单元之间具有一致性较高等优点^[9],近年来被广泛应用于解决较低分类单元层次上的植物系统发育问题,包括近缘属间关系、属下种间的关系,甚至种下居群间的关系^[10-13]。为了更好地开发、利用和保护裂叶荆芥的种质资源,本研究提取产自河北、湖北、山西、江苏及安徽等省的裂叶荆芥种子 DNA,采用 PCR 克隆测序技术,测定 5 个产地栽培的裂叶荆芥 ITS 序列并分析亲缘关系,同时与产自美国、日本、韩国的裂叶荆芥进行比较,为探讨不同产地裂叶荆芥间的亲缘关系提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料裂叶荆芥种子分别采自河北安国、湖北随州、安徽阜阳、山西临汾、江苏江都,均为当地主栽品种。裂叶荆芥种子经河北北方学院马淑兰教授鉴定。

1.2 试剂

琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒 Ver. 3.0、克隆载体 pMD 18-T、大肠杆菌感受态细胞 JM109 均购自大连宝生物公司。

1.3 裂叶荆芥种子基因组 DNA 提取

分别称取 5 个产地裂叶荆芥种子 100mg,经液氮冷冻研磨,CTAB 法提取 DNA。

1.4 PCR 扩增

根据 Stanford 等^[14]报道的扩增唇形科 ITS 序列保守引物设计而成。上游引物 P1:5'-CCTTAT-CATTAGAGGAAGGAG-3',下游引物 P2:5'-TCCTC-

CGCTTATTGATATGC-3',扩增体系:10 × PCR buffer (Mg²⁺) 5μl, dNTP mixture (10pmol/ul) 4μl, 上下游引物 (10pmol/μl) 各 2μl, Taq DNA 聚合酶 0.3μl, 模板 DNA 1μl, 补加灭菌 ddH₂O 至总体积 50μl。反应条件:94℃ 预变性 4min, 94℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳,紫外透射仪观察并拍照。

1.5 PCR 产物测序

PCR 产物与 T 载体连接,经蓝白斑筛选,每个产地挑选 5 个阳性克隆,北京奥科鼎盛生物公司测序。

1.6 序列比对及遗传距离分析

以河北产裂叶荆芥代表中国裂叶荆芥,经 BLAST 搜索 ITS 序列,下载所有搜索到的裂叶荆芥 ITS 全序列,分别为:美国裂叶荆芥 ITS 序列(DQ667313)、日本裂叶荆芥 ITS 序列(AB557591)和韩国裂叶荆芥 ITS 序列(EU383034)。使用 DNASTAR 软件对中、美、日、韩 4 国裂叶荆芥 ITS 序列进行比对和遗传距离分析。

1.7 系统发育分析

以中、美、日、韩 4 国裂叶荆芥 ITS 序列为内群,以唇形科另外 4 个属植物:藿香属(*Agastache*, 9 条序列)、青兰属(*Dracocephalum*, 1 条序列)、扁柄草属(*Lallemantia*, 1 条序列)及荆芥属(*Nepeta*, 22 条序列)植物为外群,共 37 条序列,用 ClustalX 2.0 软件进行多序列比对,比对参数为:空位开放罚分 15;空位延伸罚分 6.66;DNA 转换权重 0.5;延迟趋异序列 30%。比对结果用软件 Mega 4.1 的邻接法(Neighbor-Joining)绘制系统发育树。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物电泳结果

ITS 是介于 18S 和 26S 之间的非编码转录区,而编码 18S、26S 的序列为高度保守区,可根据高度保守的 18S 和 26S 序列设计引物扩增 ITS 区。设计的保守引物中,上游引物 P1 与 18S 序列结合,下游引物 P2 与 26S 序列结合,因此 PCR 扩增区域包括 ITS-1、5.8S rDNA 和 ITS-2 全序列及 18S rRNA 基因 3' 端和 26S rRNA 基因 5' 端部分碱基序列。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果显示,来自 5 个不同产地的栽培裂叶荆芥均获得单一清晰目的条带,无非特异性条带出现,表明该对引物(P1/P2)对裂叶荆芥样品基因组 DNA 有很好的扩增(图 1)。

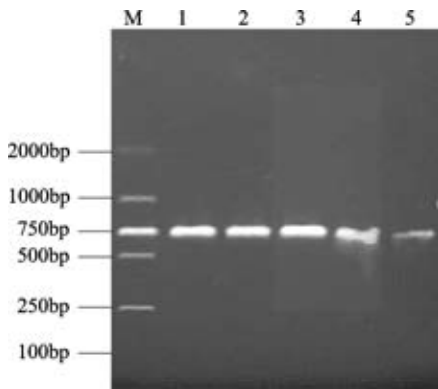


图 1 5 个不同产地裂叶荆芥 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of *S. tenuifolia* from 5 different producing areas

1:河北省;2:湖北省;3:安徽省;4:山西省;5:江苏省;M: DL2000 Marker
1: Hebei Province; 2: Hubei Province; 3: Anhui Province;
4: Shanxi Province; 5: Jiangsu Province;
M: DL2000 Marker

2.2 裂叶荆芥 ITS 序列长度和变异分析

测序结果表明 5 个产地的裂叶荆芥样品扩增序列长度均为 749bp(包括 18S rRNA 基因 3' 端部分碱基序列、26S rRNA 基因 5' 端部分碱基序列、ITS-1、5.8S rDNA、ITS-2),其中 ITS 区(包括 ITS-1、5.8S rDNA、ITS-2)序列长 635bp,比对后发现

表 1 不同国家裂叶荆芥 ITS 序列的长度和 G/C 含量

Table 1 Length and G/C content of ITS sequences of *S. tenuifolia* from different countries

国家 Countries	ITS		ITS1		ITS2		序列号 Code
	长度(bp)	G/C(%)	长度(bp)	G/C(%)	长度(bp)	G/C(%)	
中国	635	64.25	231	63.97	236	67.37	JN802670
日本	635	64.25	231	63.97	236	67.37	AB557591
韩国	635	64.25	231	63.97	236	67.37	EU383034
美国	635	63.15	231	67.10	236	65.68	DQ667313

2.4 不同国家裂叶荆芥 ITS 序列变异位点比对分析

比对结果显示,中、日、韩 3 国裂叶荆芥的 ITS 序列(包括 5.8S rDNA)完全相同。与美国裂叶荆芥相比,中国裂叶荆芥 ITS 序列的 7 个位点发生碱基变异,其中 1 个位点发生碱基颠换,另外 6 个位点发生碱基转换。ITS1 的变异位点有 2 个,ITS2 有 4 个,5.8S 有 1 个,无插入或缺失变异。其中第 80 位 C/T 转换(ITS1 区)、第 163 位 G/T 颠换(ITS1 区)、第 433 位 C/T 转换(5.8S 区)、第 497 位 G/A 转换(ITS2 区)、第 539 位 C/T 转换(ITS2 区)、第 604 位

5 个产地的裂叶荆芥样品扩增序列完全相同。根据 GenBank 中与裂叶荆芥同科不同属植物土藿香(*Agastache rugosa*, DQ132861)确定裂叶荆芥核糖体 DNA 内转录区 ITS1 和 ITS2 与 3 个编码区 18S、5.8S、26S 的界限,其中 ITS1 区位于所测序列的第 67~297 位,长 231bp;5.8S 区位于第 298~465 位,长 168bp;ITS2 区位于第 466~701 位,长 236bp。河北裂叶荆芥 ITS 序列已提交至 GenBank,序列号 JN802670。

2.3 不同国家裂叶荆芥 ITS 序列长度和 G/C 量分析

由于 5 个产地裂叶荆芥 ITS 序列完全一致,以河北产裂叶荆芥代表中国裂叶荆芥与美、日、韩 3 国的裂叶荆芥 ITS 序列进行比对。DNASTAR 软件比对结果显示,各国 ITS 序列全长均为 635bp,G/C 量较高,为 63.15%~64.25%;ITS1 和 ITS2 片段长度分别为 231bp 和 236bp;中、日、韩 3 国裂叶荆芥 ITS1 的 G/C 量(63.97%)低于 ITS2(67.37%),但美国裂叶荆芥 ITS1 的 G/C 量(67.10%)高于 ITS2(65.68%);中、日、韩 3 国裂叶荆芥 ITS1 的 G/C 量(63.97%)低于美国裂叶荆芥(67.10%),但 ITS2 的 G/C 量(67.37%)高于美国裂叶荆芥(65.68%)(表 1)。

C/T 转换(ITS2 区)、第 677 位 G/A 转换(ITS2 区)(图 2)。

2.5 不同国家裂叶荆芥 ITS 序列遗传距离分析

DNASTAR 软件遗传距离分析结果显示:来自中国不同产地及不同国家的裂叶荆芥 ITS 序列一致性高,从 99.0% 到 100%。国内 5 个不同产地的裂叶荆芥 ITS 序列一致性为 100.0%。中、日、韩 3 国裂叶荆芥 ITS 序列一致性为 100.0%;中国裂叶荆芥与美国裂叶荆芥 ITS 序列一致性为 99.0%(图 3)。

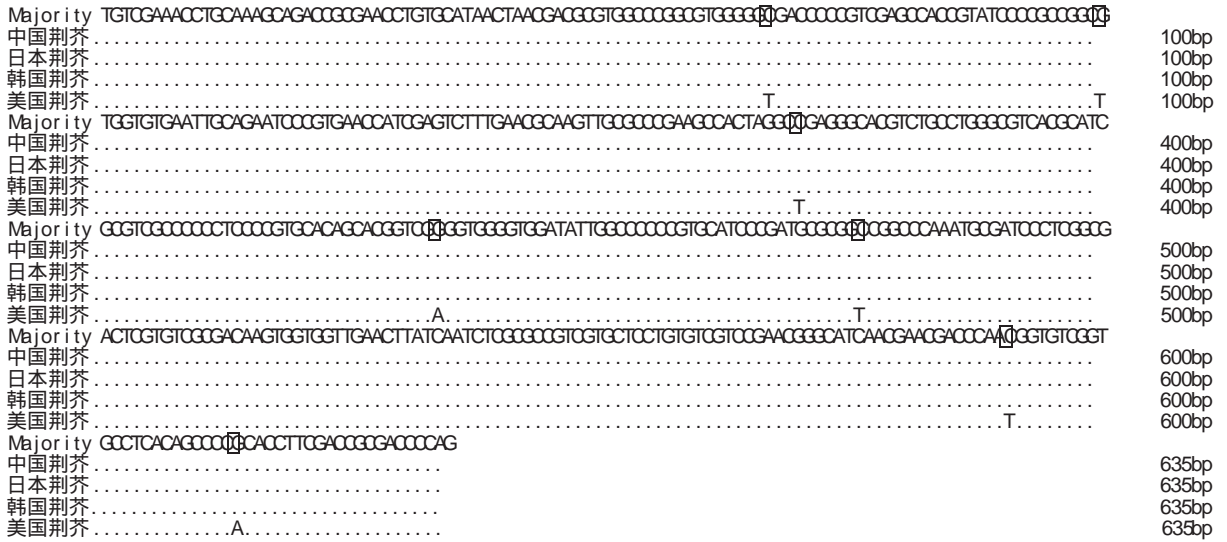


图 2 不同国家裂叶荆芥 ITS 序列比对

Fig. 2 Alignment of ITS sequence of *S. tenuifolia* from different countries

		相似性百分比 Percent Identity				
趋异百分比 Divergence		1	2	3	4	
	1		99.0	99.0	99.0	1
2	1.0		100.0	100.0	2	
3	1.0	0.0		100.0	3	
4	1.0	0.0	0.0		4	
		1	2	3	4	

图 3 不同国家裂叶荆芥 ITS 序列遗传距离分析

Fig. 3 Genetic distance of ITS of *S. tenuifolia* from different countries

1: 美国; 2: 日本; 3: 韩国; 4: 中国
1: America; 2: Japan; 3: Korea; 4: China

2.6 不同国家裂叶荆芥 ITS 序列系统发育分析

基于 ITS 序列的裂叶荆芥系统发育树显示, 来自中、日、韩、美 4 国的裂叶荆芥以 99% 的置信度形成单系群, 该单系群分为 2 个分支, 中、日、韩 3 国的裂叶荆芥形成 1 分支 I, 美国的裂叶荆芥单独形成 1 分支 II (图 4)。

3 讨论

ITS 为中度保守序列且长度不大, 在种内具有较高的保守性, 同时进化速率较快, 在不同种间又有不同程度的变异, 不仅广泛用于物种间的鉴定, 而且也被用于种内居群间的差异性分析。马小军等^[15]报道黑龙江栽培参和朝鲜栽培参 ITS 区序列完全一致, 但与湖北栽培参有 3 个碱基不同; 陈随清等^[16]分析了 7 种栽培果型山茱萸 ITS 区序列, 发现其中 4

种 ITS 序列完全一致, 其余 3 种有较小差异; 申彦晶等^[17]分析了 9 个居群白木香 ITS 序列, 发现其中 6 个居群 ITS 序列完全一致, 其余 3 个居群 ITS 序列有 6 个位点的变异。本研究结果表明, 取自国内 5 个不同产地的裂叶荆芥 ITS 序列完全一致, 可能为同一个主种, 原因很可能是裂叶荆芥在不同产地(省)间的相互引种。

屈良鸽等^[18]对不同生物类群的 ITS 序列进行比较后得出, 被子植物大多数科属的 ITS 序列的种间差异值为 1.2% ~ 10.2%。本研究中来自国内 5 个产地的裂叶荆芥与来自日本及韩国的裂叶荆芥 ITS 序列一致性为 100%, 且无变异, 而与来自美国的裂叶荆芥 ITS 序列比较, 有 7 个碱基的变异, 差异值 1.0%, 这种变异未超过一个种范围内的变异。植物的分布和系统发育一般与地理位置存在一定的关系^[14], 由系统发育树可知, 裂叶荆芥的聚类结果与实际地理位置相符。中、美、日、韩 4 国的裂叶荆芥根据地理位置分为 2 个分支, 说明裂叶荆芥的种间变异主要受地理位置的影响。

裂叶荆芥属植物共 3 个种, 分别是裂叶荆芥、多裂叶荆芥 (*S. multifida*) 和小裂叶荆芥 (*S. annua*)。由于 Genbank 中没有多裂叶荆芥或小裂叶荆芥的 ITS 序列, 故在选择外群时, 以唇形科其他属中药植物作为外群, 包括藿香属、荆芥属、青兰属和扁柄草属植物。系统发育树显示, 裂叶荆芥与藿香的亲缘关系较近, 而与荆芥的亲缘关系较远。

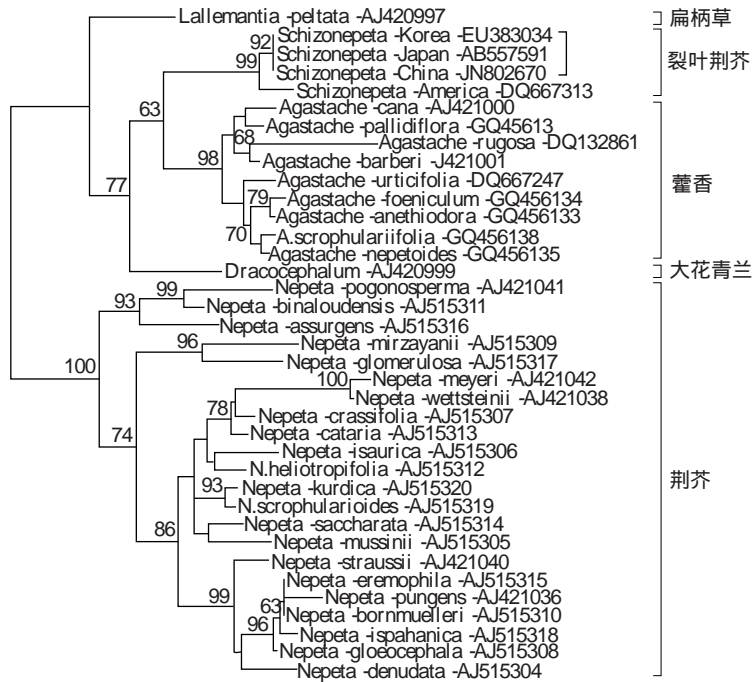


图 4 裂叶荆芥 ITS rDNA 系统发育分析 - NJ 法

Fig. 4 Phylogenetic tree of *S. tenuifolia* from different countries at ITS - NJ method

分支 I : 韩国、日本、中国; 分支 II : 美国

Branch I : Korea, Japan, China; Branch II : America

综上所述,本研究比较产自国内 5 个省份的栽培裂叶荆芥 ITS 序列的差异,分析裂叶荆芥的地理分布与 ITS 序列的相关性。但因仅选取 5 个省份的栽培裂叶荆芥进行系统发育分析,而野生裂叶荆芥与栽培裂叶荆芥之间的遗传变异程度,以及裂叶荆芥与多裂叶荆芥和小裂叶荆芥的系统发育关系还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 913-916
- [2] 李君晖, 曾南, 沈映君. 荆芥的药理作用[J]. 四川生理科学杂志, 2004, 26(3): 133-136
- [3] 葛卫红, 郭建友, 沈映君, 等. 荆防挥发油对炎症相关因子表达和调节的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1777-1779
- [4] 刘红彬, 李慧玲, 顾小龙, 等. 不同生长期裂叶荆芥叶中总黄酮的微波提取及含量测定[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1439-1441
- [5] 谢练武, 戴世鲲, 王广华, 等. 裂叶荆芥不同部位香精油组成研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009(21): 976-979
- [6] 张丽, 包贝华, 孙磊, 等. 正交优选法筛选荆芥炭炮制的最佳工艺[J]. 中草药, 2005, 36(3): 370-372
- [7] 卢金福, 张丽, 冯有龙, 等. 荆芥内脂类提取物对大鼠足趾汗杂及血液流变学的影响[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(6): 502-504
- [8] 高峰. 荆芥种质资源评价与种子质量标准研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2007: 17-25
- [9] Wang J B, Zhang W J, Chen J K. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms[J]. Acta Phytotaxon Sin, 1999, 37(4): 407-416
- [10] 龚汉雨, 刘如亮, 董正伟, 等. 药用野生稻复合体 ITS1 和 ITS2 序列变异及其系统进化分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 442-447
- [11] 田保华, 梁毅, 陈丽, 等. 洋葱大葱间杂种鉴定方法建立与应用[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 657-661
- [12] Yang Z Y, Chao Z, Huo K K, et al. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China[J]. Phytomedicine, 2007, 14(6): 416-423
- [13] 黄晨阳, 陈强, 邓旺秋, 等. 中国栽培白灵菇学名的订正[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 825-827
- [14] Stanford A M, Harden R, Parks C R. Phylogeny and biogeography of Jugland (Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data[J]. Am J Bot 2000, 87(6): 872-882
- [15] 马小军, 汪小全, 肖培根, 等. 野山参与栽培参 rDNA 内转录间隔区 (ITS) 序列比较[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(4): 206-209
- [16] 陈随清, 潘成学, 卢小蕾, 等. 山茱萸不同栽培品种的 rDNA ITS 序列分析[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(1): 72-75
- [17] 申彦品, 谭雪梅, 赵翊, 等. 我国不同地区白木香核糖体 DNA 内转录间隔区碱基序列分析[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(4): 539-541
- [18] 屈良鹤, 陈月琴. 生物分子分类检索表-原理与方法[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(1): 1-6