

中国不同地区蛇床的 rDNA ITS 序列分析

蔡金娜¹, 周开亚*, 徐珞珊¹, 王峥涛¹, 沈 曦, 王义权, 李晓波¹

(南京师范大学江苏省资源生物技术重点实验室, 南京 210097; ¹ 中国药科大学药学研究室, 南京 210038)

摘要 目的: 探讨不同分布区的蛇床 *Cnidium monnieri* 的 ITS 序列变异与其地理分布和化学成分的相关性。方法: 设计 2 对引物, Pf + Pb 及 P5.8S ITS1 + P5.8S ITS2, PCR 扩增产物纯化后用银染法或 ABI 310 测序。结果: 得到核糖体 DNA 中的 ITS 及 5.8S rDNA 完全序列, 18S 和 26S rDNA 部分序列, 共约 700 bp。5 个地点样品的 ITS-1 及 ITS-2 的序列大小分别为 210 ~ 217 bp 和 219 ~ 224 bp。ITS-1 碱基序列的遗传距离 0.00 ~ 1.93%, ITS-2 碱基序列的遗传距离 0.46 ~ 2.34%, ITS-1 较为保守。以 NJ 法根据 ITS-2 序列数据重建系统发生树。哈尔滨样品聚为一组, 衡水与德州样品和郑州与高淳样品各自聚为一组。结论: ITS-2 序列的变异与中国产蛇床的纬度分布相关, 而与其与蛇床化学型的关系尚需作进一步研究。

关键词 蛇床; rDNA 内转录间隔区; 纬度

蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 属伞形科植物, 为世界性分布的广布种, 不仅分布区域广, 而且生态环境幅度大, 在我国各地均有分布。该植物的果实称蛇床子, 为常用中药, 有壮阳补肾、祛风燥湿、杀虫之功效^[1]。

作者曾对在中国不同分布区域蛇床的果实(蛇床子)进行了形态组织学、孢粉学及化学等系统研究, 结果表明其在形态组织及孢粉学方面, 随分布区域的不同无显著变化, 但其所含香豆素类成分有种种内变异, 并与其地理分布有一定的相关性^[1]。近年, 根据 TLC 和 GC 分析结果结合地理分布, 进一步将蛇床按香豆素类化合物分为 3 个化学型^[2]: I 型, 以角型呋喃香豆素为主要成分, 不含蛇床子素(osthol), 分布于辽宁、黑龙江、内蒙古等温带针阔叶混交林区域; II 型, 以蛇床子素和线型呋喃香豆素为主要成分, 不含角型呋喃香豆素, 分布于福建、浙江、江苏等亚热带常绿阔叶林区域; III 型, 同时含有蛇床子素、线型和角型呋喃香豆素成分, 为混合的过渡类型, 分布于河南、河北、山西等暖温带落叶阔叶林区域。

核糖体 DNA 中的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列的进化速率较快, 且与植物生活型呈相关性^[3], 近年已被广泛用于植物种内变异和种间、近缘属间的分子系统学研究^[4-8]。

为此, 本文测定了中国蛇床 5 个居群植物的 ITS-1、5.8S rRNA 基因、ITS-2 全长序列及 18S、26S rRNA 基因的部分序列, 共约 700 bp, 探讨了 ITS 序列变异与蛇床地理分布和化学成分的相关性。

材 料 和 方 法

1 材料 均为新鲜的叶片, 除江苏高淳的样品直接采自野外, 其余均为 1997 年采集野生的果实, 当年 10 月播种于中国药科大学药用植物园, 1998 年 2 ~ 3 月发芽, 3 ~ 4 月采集叶片, 用于 DNA 提取。材料来源见表 1。

Tab 1 Samples of *Cnidium monnieri* used in the present study

Code	Locality	North latitude	Chemotype	Date of collection
HB1	Harbin, Heilongjiang	45.7°	I	980408
HB2	Harbin, Heilongjiang	45.7°	I	980408
HS	Hengshui, Hebei	37.7°	III	980326
DZ	Dezhou, Shandong	37.4°	II	980408
ZZ	Zhengzhou, Henan	34.7°	III	980408
GC1	Gaochun, Jiangsu	31.3°	II	980305
GC2	Gaochun, Jiangsu	31.3°	II	990704

2 DNA 提取 取 2.5 g 新鲜叶片在液氮中研成粉, 置 15 mL 离心管中, 加入 DNA 提取缓冲液(8 mol·L⁻¹ 脲, 0.35 mol·L⁻¹ NaCl, 0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 0.02 mol·L⁻¹ EDTA, 2% 蔗糖, 5% 酚) 5 mL 及 10% SDS 0.5 mL, 混匀, 60℃ 保温 10 min, 其间倒转数次。酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀

收稿日期: 1999-03-25

基金项目: 江苏省资源生物技术重点实验室资助课题

* 联系人 Tel: (025) 3598328, Fax: (025) 3598328,

E-mail: kyzhouj@jonline.com

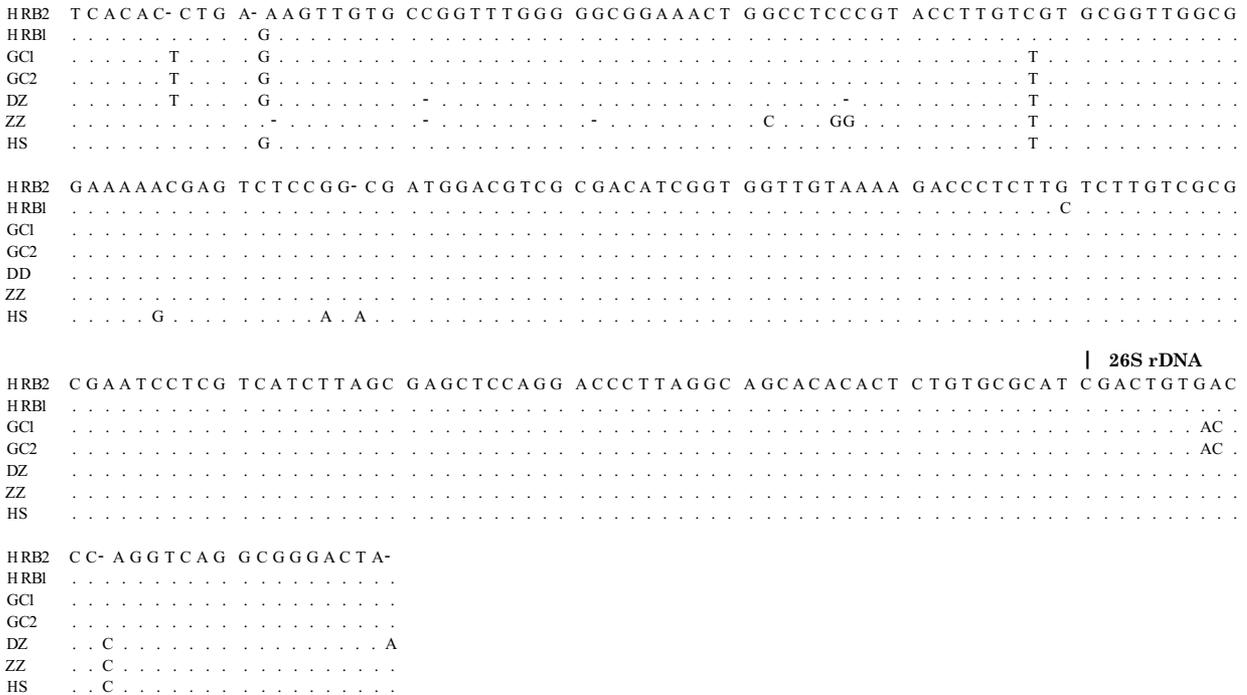


Fig 1 Alignment of ITS-1 , 5.8S rDNA and ITS-2 nucleotide sequence of 7 samples of *Cnidium monnieri* . Dots indicate sequence identity with HB2 , dashes denote deletions .

结 果

1 碱基序列的大小 共测得 5 个居群 7 个个体样品的 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,共约 700 bp(图 1)。其中 ITS-1 为 210 ~ 217 bp,5.8S rDNA 为 160 ~ 162 bp,ITS-2 为 219 ~ 224 bp(表 2)。

Tab 2 Size and G + C contents of ITS 1 , 5.8S rDNA and ITS 2 sequences of samples of *Cnidium monnieri* from different localities

Code	ITS-1		5.8S rDNA		ITS-2		Total/ bp
	Size/ bp	G + C contents/ %	Size/ bp	G + C contents/ %	Size/ bp	G + C contents/ %	
HBI	215	55.8	161	53.4	223	57.9	599
HB2	215	55.2	161	53.4	222	57.2	598
HS	214	55.1	162	53.1	224	56.7	600
DZ	215	55.8	161	53.4	221	56.6	597
ZZ	210	54.2	162	53.1	219	57.1	591
GC1	217	55.3	161	50.3	224	57.2	602
GC2	215	55.4	161	50.3	224	57.2	600

2 碱基序列的遗传距离 5 个居群间的 ITS-1 碱基序列的遗传距离在 0.00 ~ 1.93 % 范围,ITS-2 碱基序列的遗传距离在 0.46 ~ 2.34 % 范围(表 3)。ITS-1 较为保守。因此只对 ITS-2 序列数据(对位排列 225 个位点)用邻结法(NJ)重建系统树。

Tab 3 Values (× 100 sites) of pairwise sequence divergence between samples in ITS 1 (below) and ITS 2 (above) with Kimura 2- parameter distance

OTUs	HB2	HBI	HS	DZ	ZZ	GC1	GC2
HB2		0.0092	0.0140	0.0046	0.0186	0.0093	0.0093
HBI	0.0000		0.0234	0.0139	0.0186	0.0092	0.0092
HS	0.0048	0.0048		0.0093	0.0233	0.0140	0.0140
DZ	0.0000	0.0000	0.0048		0.0139	0.0046	0.0046
ZZ	0.0144	0.0144	0.0193	0.0144		0.0092	0.0092
GC1	0.0093	0.0093	0.0144	0.0093	0.0144		0.0000
GC2	0.0000	0.0000	0.0047	0.0000	0.0048		

讨 论

蛇床植物 5 个居群间的 ITS-1 及 ITS-2 的碱基序列存在一定差异,说明广布种蛇床种内存在着不同的分化类型。提示 ITS 序列不仅适用于较高分类等级的系统分类研究,也能反映种内变异及多态性。哈尔滨和高淳各测了 2 个样品,结果表明同居群不同个体间的序列变异较小。

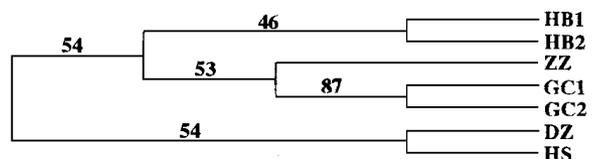


Fig 2 Phylogenetic tree reconstructed using NJ with Kimura distance based on ITS-2 nucleotide sequence of 7 samples of *Cnidium monnieri* .

根据 ITS-2 建立的系统发生树(图 2), 蛇床的 7 个样品分为 3 组, 即哈尔滨居群聚为一组, 分布的纬度最高; 衡水与德州居群聚为另一组, 分布的纬度居中; 郑州与高淳居群也聚为一组, 分布的纬度最低。说明 ITS-2 序列的变异与蛇床的纬度分布相关。这 3 个组之间, 哈尔滨组与郑州-高淳组首先聚合。然后, 这两个组与衡水-德州组相聚。提示在进化过程中, 有一个支系向南、北两个方向扩散, 并分化形成了前两个组。

哈尔滨组属化学型的 I 型。然而, 郑州-高淳组和衡水-德州组内都既有 II 型, 也有 III 型。即北纬 31° ~ 37° 范围内有 II 型和 III 型并存。而且作者在蛇床香豆素类成分的种内变异的研究中, 发现在郑州和济南所采的样品, 在潮湿生境的属于 II 型, 而在干燥生境的属于 III 型, 提示香豆素类成分的变化可能与生境相关。所以, 蛇床的 ITS 序列与其化学型的关系, 尚需对不同地点、不同生境的蛇床样品作进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 蔡金娜, 徐国钧, 金蓉鸾, 等. 蛇床子类专题研究. 见: 徐国钧, 徐珞珊. 常用中药材品种整理和质量研究. 南方协作组, 第一册, 福州: 福建科技出版社, 1994. 648 ~ 672
- 2 蔡金娜, 张亮, 王峥涛, 等. 国产蛇床中香豆素类成分的

- 种内变异及其规律. 药学报, 1999, 34: 767
- 3 汪小全, 李振宇. rDNA 片断的序列分析在苦苣苔亚科系统学研究中的应用. 植物分类学报, 1998, 36: 97
- 4 Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*. 1995, 82: 247
- 5 Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implication for biogeography and concerted evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6813
- 6 Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier MF, et al. Molecular phylogeny of the Genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. *Mol Biol Evol*, 1998, 15: 345
- 7 Buckler ES IV, Holtsford TP. Zea systematics ribosomal ITS evidence. *Mol Biol Evol*, 1996, 13: 612
- 8 Coleman AW, Jeffrey CM. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. *J Mol Evol*, 1997, 45: 168
- 9 Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. A new approach for the identification of a Chinese Traditional Medicine, "Chuanxiong" by 18S ribosomal RNA gene sequences. *Phyto medicine*, 1996, 3: 387
- 10 Mitchell AD, Wagstaff SJ. Phylogenetic relationships of *Pseudopanax* species (Araliaceae) inferred from parsimony analysis of rDNA sequence data and morphology. *Plant Syst Evol*, 1997, 208: 121

RIBOSOMAL DNA ITS SEQUENCE ANALYSES OF *CNIDIUM MONNIERI* FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL ORIGIN IN CHINA

Cai Jinna¹, Zhou Kaiya, Xu Luoshan¹, Wang Zhengtao¹, Shen Xi, Wang Yiquan and Li Xiaobo¹

(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Resources Biotechnology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097; ¹Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038)

ABSTRACT **AIM:** To study the correlation between ITS sequence variation of *Cnidium monnieri* and geographical distribution and chemotype of the plant. **METHODS:** Two pairs of primers Pf + Pb and P5.8S ITS1 + P5.8S ITS2 were designed. The PCR products were purified and sequenced by silver staining DNA sequencing technique and ABI 310. **RESULTS:** Complete sequence of ITS and 5.8S rDNA, and partial sequence of 18S rDNA and 26S rDNA of *Cnidium monnieri* were obtained. They totaled about 700 bp. The sequences of ITS-1 and ITS-2 ranged from 210 bp to 217 bp and 219 bp to 224 bp; respectively. Pairwise sequence divergences of the samples ranged from 0% to 1.93% in ITS-1, and from 0.46% to 2.34% in ITS-2. The ITS-1 is more conservative. Phylogenetic tree based on ITS-2 sequence data (225 aligned sites) indicated that the Harbin samples, Hengshui and Dezhou samples, and Zhengzhou and Gaochun samples clustered separately. **CONCLUSION:** The sequence variation of ITS-2 is correlated to latitude distribution of *Cnidium monnieri* in China. Further studies are needed to clarify the relation between ITS sequence variation and chemotype of *Cnidium monnieri*.

KEY WORDS *Cnidium monnieri*; rDNA internal transcribed spacer; latitude