

• 药材与资源 •

苏皖产大戟属药用植物 rDNA 的 ITS 序列分析

蒋继宏¹, 孟娜^{1,2}, 曹小迎¹, 周守标^{2*}, 戴传超³

(1. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116; 2. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要:目的 研究苏皖产大戟属内 6 种药用植物的 ITS 长度的变异, 为探讨大戟属植物的系统演化关系和大戟属植物鉴定提供 DNA 分子证据。方法 利用 PCR 技术对大戟属植物的 rDNA ITS 区碱基序列进行测定。结果 这 6 种大戟属植物的 ITS1 的长度范围为 255~262 bp, ITS2 的长度范围为 214~236 bp。运用 Mega2 软件进行的系统分析得到大戟属内 6 种植物的系统进化树。这一分析结果与来自形态学的研究结果相吻合。结论 此法可用于大戟属植物种间及真伪品鉴别。

关键词:大戟属; ITS 序列; 分析

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)06-0900-03

ITS sequence analysis on medicinal plants of *Euphorbia* L. in Anhui and Jiangsu ProvincesJIANG Ji-hong¹, MENG Na^{1,2}, CAO Xiao-ying¹, ZHOU Shou-biao², DAI Chuan-chao³

(1. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China;

3. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: **Objective** To study the correlation and variation between plants of internal transcribed spacers (ITS) sequence of the six medicinal plants of *Euphorbia* L. in Anhui and Jiangsu Provinces, in order to provide their DNA molecular marker to identify and explore the phylogenetic relationship of the plants of *Euphorbia* L. **Methods** To determine rDNA ITS sequence for the plants of *Euphorbia* L. by PCR technology. **Results** The sequences of ITS1 in the six species ranged from 255 to 262 bp in length and those of ITS2 from 214 to 236 bp. The dendrogram was obtained with Mega2 analysis. The analysis result was consistent with those from morphology. **Conclusion** The method can be used to identify the plants of *Euphorbia* L. among different species and to differentiate their fakes.

Key words: *Euphorbia* L.; internal transcribed spacers (ITS) sequence; analysis

大戟属 *Euphorbia* L. 为大戟科中最大的一属, 全世界有 2 000 余种, 安徽产 6 种^[1]。大戟属植物资源丰富, 适应于不同的生态环境, 从热带到亚热带, 从陆地到沙漠, 分布十分广泛, 易被发现和采集。本属植物的特征是含有白色或黄白色乳汁, 并具有双重特性, 但对皮肤有刺激和毒性, 而且具有重要的药用价值。大戟属植物具有抗肿瘤等多种活性与其所含的化学成分有关, 大戟、月腺大戟、泽漆、地锦草、斑地锦也广泛应用于临床^[2], 因此深入研究大戟属植物对大戟属植物的进一步应用和开发都具十分重要的意义。

分子系统学的飞速发展给植物系统学中很多疑

难问题的解决提供了重要佐证。分子生物学研究技术如 RFLP 分析、AFLP 分析、SSR 分析、RAPD 分析、序列分析为分子系统学的研究提供了可靠的分子标记资料。其中核糖体 DNA 内转录间隔区 (ITS) 序列分析已被广泛地用于植物属内、近缘属间乃至科内的系统发育研究^[3]。本实验以分布于安徽、江苏的 6 种大戟属植物为代表, 采用 PCR 产物测序方法测定了大戟属 ITS 区序列 (包括 5.8 SrDNA) 测定和分析, 为探讨大戟属植物的系统演化关系和生药鉴定提供分子证据。

1 材料

1.1 材料来源: 用于提取 DNA 的材料为新鲜叶

收稿日期: 2004-09-17

基金项目: 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放项目 (KJS03079)

作者简介: 蒋继宏 (1964—), 男, 安徽滁州人, 副教授, 博士, 主要从事药用植物生物技术方面研究。

Tel: (0516) 3403515 E-mail: jhjang@xznz.edu.cn

* 通讯作者 周守标

片,采集的植物均经周守标教授鉴定,其来源见表 1。

表 1 材料来源
Table 1 Origin of materials

编号	植物名称	采集地
0301	大戟 <i>Euphorbia pекinensis</i> Ripr.	安徽
0302	乳浆大戟 <i>E. esula</i> L.	江苏
0303	月腺大戟 <i>E. ebracteolata</i> Hayata	安徽
0304	地锦 <i>E. humifusa</i> Willd	江苏
0305	斑地锦 <i>E. supina</i> Rafin	江苏
0306	一品红 <i>E. pulcherrima</i> Willd	江苏

1.2 仪器与试剂:电泳仪 (Bio-rad 公司),离心机 (Beckman-Coulter 公司), PTC—200 型 PCR 仪 (MJ Research 公司);CTAB、Tris base、β-巯基乙醇、EDTA、Taq 酶等为生工产品,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

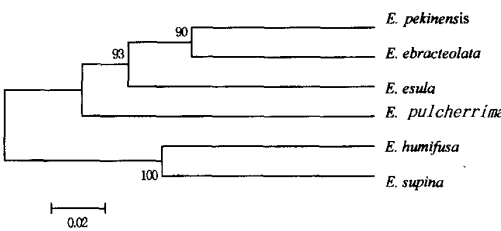
2.1 植物总 DNA 提取:用于 DNA 提取的材料均为新鲜叶片,总 DNA 提取方法为 CTAB 法^[4],但将 1 体积 CTAB 沉淀 DNA 这一步骤改为 1 体积异丙醇沉淀 DNA。

2.2 ITS 区片段的扩增与纯化:PCR 反应过程及所用引物参照文献报道^[5]。PCR 扩增产物用 Wizard™ PCR Preps DNA Puridication System (Promega 公司) 纯化后直接作为测序模板。

2.3 序列测定:测序工作在中科开瑞芯片股份有限公司的 DNA 自动测序仪上完成。每种植物的 ITS 序列均用 P₄ 和 P₅ 引物正反链测定,保证序列测定的准确性。所得的 ITS 序列包括 ITS1 序列、5.8 SrRNA、ITS2 序列。

2.4 ITS 区序列分析:序列经用互补链校对后,参照 GenBank 上 Takaiwa, Oono, and Sugiura (1985) 与 Steinmann, and Porter (2002) 的序列,确定非编码的 ITS1 和 ITS2 的边界。序列排列用 Clustal X 程序进行对位排列。进一步用人工核对排列。排好的序列运用 Maga 软件构建 ITS 树,进行系统发育分析,并用自展法 (bootstrap) 进行检测,自展数据集为 1 000 次,结果见图 1。

2.5 ITS 片段长度及碱基百分含量:共测定了 6 个类群的 ITS (包括 ITS1、5.8 SrDNA、ITS2) 序列。每个种的 ITS 长度及 G+C 含量见表 2。大戟属 6 个类群 ITS 序列长度变异不大,5.8 SrDNA 区很保守,除斑地锦长度为 163 bp 外,其余均为 164 bp。6 个类群 G+C 含量在 ITS1 区变化范围为 51%~64%,在 ITS2 区变化范围为 56%~68%,其 G+C



分支上的数字是 1 000 次重复抽样检测的靴带值 (%)
Sequence numbers above branches are bootstrap values (%) of 1000 replications

图 1 基于 ITS 区序列分析得到的系统树

Fig. 1 Dendrogram based on sequences of ITS

表 2 大戟属 6 种植物 ITS 序列长度及其 G+C 含量

Table 2 Length and G+C content of ITS for six kinds of plants in *Euphorbia* L.

名称	ITS1		ITS2		5.8 SrDNA	
	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%	长度/bp	(G+C)/%
大戟	262	51	222	56	164	55
乳浆大戟	255	64	226	68	164	55
月腺大戟	261	59	221	59	164	60
一品红	261	55	224	59	164	56
地锦	262	54	236	57	164	53
斑地锦	264	56	214	57	163	67

的含量相差不大,反映出协同进化现象。

2.6 ITS 序列的系统发育分析:通过 ITS 序列分析,结合形态学研究,6 个类群分为二大支,其中,大戟属的匍匐纤细草本地锦和斑地锦为一分支,其具有强的支持率 (100%) 而聚类在一起,说明两者的亲缘关系很近,与这两者的形态特征也相符。另一支为大戟、月腺大戟和乳浆大戟这 3 种植物为直立草本,上部叶同色,野生植物而聚为一类,具有 93% 较强的支持率。

3 讨论

DNA 分子标记技术已广泛地用于药用植物遗传多样性、系统学、分类学研究,并逐渐渗透到中药材鉴定领域。目前植物学研究者越来越清楚地认识到 ITS 序列分析在植物系统学及构建植物网状进化树、探讨物种形成等方面的作用。但在不同的植物类群以及在不同分类等级上,其 ITS 序列分析的价值是不一样的,因为不同类群的起源时间及进化速率不同,其 ITS 序列所含有的信息量也不同。本实验测定的 6 种大戟属植物的 ITS 区及 5.8 SrDNA 基因序列,其所得结果与形态学资料相吻合。由此可见,ITS 序列分析在研究和探讨大戟属植物的起源、不同种类的进化关系和进化速率及大戟属的系统位置、种间分类及与其他植物种群之间的亲缘关系等方面具有重要意义和广阔的应用前景。

References:

- [1] Edit Board. *The Records of Plant in Anhui Province* (安徽植物志) [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House, 1988.
- [2] Shi Y P, Jia Z J. Recent studies on diterpene ester and their bioactivities from *Euphorbia* genus in China [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1997, 18(7): 1107-1112.
- [3] Song B H, Chen Z D, Wang X Q, *et al.* Sequence analysis of the ITS region of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in Chinese *Amaranthus* and its systematic utility [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42(11): 1184-1189.
- [4] Ma B G, Zhao Z S, Feng J R, *et al.* A comparison of DNA extraction methods in *Pyrus* [J]. *J Shihezi Univ; Nat Sci* (石河子大学学报:自然科学版), 2000, 4(4): 277-281.
- [5] Wang J B, Zhang W J, Chen J K. Application of IT sequences of nuclear rDNA in phylogentic and devolutionary studies of angiosperms [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1999, 37(4): 407-416.

白芷干物质积累和异欧前胡素的动态研究

张志梅¹, 翟志席¹, 郭玉海^{1*}, 付秀敏², 邓素君², 卜彦英², 赵志民², 赵永华³, 杨春清³, 屠鹏飞⁴, 赵明波⁴

(1. 中国农业大学 中药材研究中心, 北京 100094; 2. 安国市农业局, 河北 安国 071200; 3. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 4. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要:目的 明确白芷不同生长时期干物质积累及根中异欧前胡素质量分数和积累量变化。方法 采用称重法测定白芷干物质, 高效液相色谱法测定根中异欧前胡素。结果 白芷地上和地下部分干物质积累呈“S”型曲线, 地上部分干物质在7月底至10月初逐渐增加, 10月中旬达到高峰, 随后降低; 地下部分干物质前期增加较慢, 8月底至9月底为快速增长期, 随后增加稍有减慢。根中异欧前胡素以7月底8月初最高, 为0.245 3%, 10月底最低, 为0.117 7%。异欧前胡素积累量在10月底收获时达到最大。结论 以白芷产量和异欧前胡素积累量为白芷的收获目标, 10月底为白芷的收获期, 与传统采收期一致。

关键词: 白芷; 干物质; 异欧前胡素

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)06-0902-03

Dynamic characteristic of dry matter accumulation and isoimperatorin in *Angelica dahurica*

ZHANG Zhi-mei¹, ZHAI Zhi-xi¹, GUO Yu-hai¹, FU Xiu-min², DENG Su-jun², BU Yan-ying², ZHAO Zhi-min², ZHAO Yong-hua³, YANG Chun-qing³, TU Peng-fei⁴, ZHAO Ming-bo⁴

(1. Chinese Medicinal Herbs Research Center, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Agricultural Bureau of Anguo City, Hebei Province, Anguo 071200, China; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China; 4. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To study the accumulation of dry matter and changes of isoimperatorin content and accumulation in the root of *Angelica dahurica* in different growth and development duration. **Methods** Use weighing method to weight the dry matter and an HPLC method to determine the content of isoimperatorin in *A. dahurica* root. **Results** Dry matter accumulation of aerial part and under ground part of *A. dahurica* showed “S” curve, dry matter of aerial part gradually increased from the end of July to the early October and got to the peak in mid-October, then gradually decreased; dry matter of under ground portion increased slowly in earlier stage and became rapidly from the end of August to the end of September, then reduced. Isoimperatorin content in *A. dahurica* root was the highest in the end of July and the early of August as 0.245 3% and the lowest in the end of October as 0.117 7%. The accumulation of isoimperatorin was the highest in the end of October when *A. dahurica* was harvest. **Conclusion** Taking *A. dahurica* yield and the accumulation of isoimperatorin as harvest aim, the optimal time for harvest is at the end of October.

Key words: *Angelica dahurica* (Fisch.) Benth. et Hook; dry matter; isoimperatorin

收稿日期: 2004-09-20

基金项目: 国家“十五”科技攻关重大项目 (2002BA517A02); 国家重点科技项目 (攻关) (99-929-01-21)

* 通讯作者 郭玉海 Tel: (010) 62732556 Fax: (010) 62731062 E-mail: jzysh@cau.edu.cn