

## 鼠尾草属药用植物及其近缘种的 ITS 序列分析

王 迎, 李大辉, 张英涛\*

(北京大学 药学院, 北京 100083)

**摘要:** 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遗传多样性, 为准确进行基源鉴定、阐明本属内的种间关系及发现新的药用资源提供分子证据。本文从野外采集的 27 个鼠尾草属植物叶片样品中分离提取 DNA, PCR 扩增 ITS 区及 5.8S rDNA 完整序列并测序, 采用 Mega 3.1 软件进行系统学分析。27 个鼠尾草样品的 ITS 及 5.8S rDNA 区序列全长为 612 ~ 617 bp, 邻接法 (Neighbor-Joining) 构建的系统发生树部分支持了形态学的属下划分, 但对部分种的系统位置特别是三叶鼠尾草和黄花鼠尾草两个亚种的处理上与形态学划分存在明显的分歧。序列分析显示 5.8S rDNA 序列相当保守, 而 ITS 区段则在亚属间差异明显, 且原产我国的该属植物与欧美引进种明显具有不同起源。ITS 系统树对于亚属和组的处理较为合理, 但对组下的划分则表现出了信息量不足, 需要其他相关证据的支持。ITS 分析支持了丹参组内其他近缘种作为丹参类药材替代资源的合理性, 同时也揭示了甘西鼠尾草类高山丹参在遗传上与丹参类药材的显著不同。

**关键词:** 鼠尾草属; ITS 序列; 遗传多样性

中图分类号: R931.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)12 - 1309 - 05

## Analysis of ITS sequences of some medicinal plants and their related species in *Salvia*

WANG Ying, LI Da-hui, ZHANG Ying-tao\*

(School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Molecular systematic techniques were applied to reveal the genetic diversity of medicinal plants and their related species in *Salvia*. The internal transcribed spacer (ITS) as well as 5.8S rDNA sequences of 27 samples of *Salvia* were amplified using PCR method and sequenced. Mega 3.1 was used to analyze the genetic diversity within genus. The complete sequences of ITS plus 5.8S rDNA are about 612 - 617 bp. A phylogenetic tree generated by Neighbor-Joining method partly supported the morphological classification within *Salvia*, but incompatible results were also obtained in the treatment of phylogenetic positions of some species such as *Salvia trijuga*, *Salvia flava* var. *flava* and *Salvia flava* var. *megalentha*. The ITS regions of present *Salvia* species showed considerable variation between subgenera in contrast with the conservative 5.8S rDNA sequences. The native *Salvia* species might have a different origin from the foreign species. The phylogenetic positions of subgenera and sections inferred by ITS analysis were comparable with that of traditional classification, while the phylogeny within sections is still doubtful due to limited information in ITS sequence and need to be further proved by other evidence. ITS analysis in this study supports the rationality of using species from *Drymosphace* section as substitute drug resources of Dan shen, but also reveals significant genetic differences between high mountain Dan shen species such as *Salvia przewalskii* with traditional Dan shen origins.

**Key words:** *Salvia*; ITS sequence; genetic diversity

收稿日期: 2007-06-02.

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT0502).

\* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 82801559, E-mail: zhang\_yingtao@yahoo.com.cn

鼠尾草属 (*Salvia* L.) 是唇形科的一个大属, 全世界约 900 ~ 1 100 种, 广布于热带、亚热带和温带。据中国植物志最新记载<sup>[1]</sup>, 我国该属植物有 84 种、47 变种或变型, 分布于全国各地, 以西南地区种类最多。鼠尾草属药用资源丰富, 有记载的药用种 30 余个<sup>[2]</sup>, 其中多数作为活血化瘀中药丹参的替代药源。关于该属植物的化学成分研究已有相当多的报道, 证实了该属植物在化学成分上的独特性与多样性, 但主要的成分研究工作集中于荔枝草亚属的 10 余种植物<sup>[3]</sup>, 而多样性最丰富的弧隔鼠尾亚属的绝大多数种类的成分与活性仍属未知。近年对于甘西鼠尾草类高山丹参的研究揭示出该亚属中可能存在更好的新药资源。化学成分多样性与遗传和环境的多样性密切相关, 因此系统地研究该属植物的遗传多样性对于揭示该属植物的种间关系、发现新的潜在药用资源具有重要意义。我国是鼠尾草属的一个分布中心, 但关于该属的遗传多样性研究却极少<sup>[4]</sup>, 特别是针对弧隔鼠尾亚属较深入的遗传多样性分析未见报道。本文首次针对药用种类最丰富的弧隔鼠尾亚属与荔枝草亚属进行了分子系统学研究。

rRNA 基因转录间区即 ITS 区具有高度重复性、长度变异很少、区内变异度高等特性, 已被广泛应用于被子植物的系统发育研究和分类学研究, 本文通过对位于 18S 与 26S rDNA 之间的 ITS 区与 5.8S rDNA 区全长序列的分析比较, 建立了野外采集的鼠尾草属 17 种、3 变种、4 变型共 27 个样品的分子系统树。

### 材料与方法

**植物样品** 27 个鼠尾草样品分别采自云南、湖北、北京等地 (表 1)。新鲜叶片经硅胶干燥保存, 原植物标本经北京大学药学院药用植物室张英涛副教授鉴定, 标本保存于北京大学药学院植物标本馆。

**试剂** PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成, 上游引物 (ITS): 5'-CGT AAC AAG GTT TCC GTA GGT GAA-3'; 下游引物 (ITS): 5'-TTA TTG ATA TGC TTA AAC TCA GCG GG-3'; 其余 PCR 试剂购自北京普博欣生物科技有限责任公司。

**植物总 DNA 的提取分离与纯化** 将 400 ~ 500 mg 磨碎的干燥植物叶片组织以 CTAB 法<sup>[5]</sup> 分离总

**Table 1** Plant materials used in present study

形态学亚属 组系	名称	拉丁名	编号	产地	Genbank ID
弧隔鼠尾亚属 多年生亚组	栗色鼠尾草光叶变型	<i>S. castanea</i> f. <i>glabrescens</i>	S012	云南 玉龙山	EU1 69460
	栗色鼠尾草柔毛变型	<i>S. castanea</i> f. <i>pubescens</i>	S021	云南 永宁	EU1 69461
			S023	云南 永宁	EU1 69462
	栗色鼠尾草原变型	<i>S. castanea</i> f. <i>castanea</i>	S017	云南 宁蒗	EU1 69463
			S019	云南 永宁	EU1 69464
	黄花鼠尾草原变种	<i>S. flava</i> var. <i>flava</i>	S006	云南 玉龙山	EU1 69468
			S022	云南 永宁	EU1 69470
	黄花鼠尾草大花变种	<i>S. flava</i> var. <i>mega lantha</i>	S007	云南 玉龙山	EU1 69472
			S016	云南 德钦	EU1 69474
			S011	云南 玉龙山	EU1 69475
鄂西鼠尾系	圆苞鼠尾草	<i>S. cyclostegia</i>	S020	云南 永宁	EU1 69465
			S005	云南 玉龙山	EU1 69473
毛地黄鼠尾系	毛地黄鼠尾草	<i>S. digitoides</i>	S009	云南 玉龙山	EU1 69469
	橙色鼠尾草	<i>S. aerea</i>	S010	云南 玉龙山	EU1 69466
			S018	云南 宁蒗	EU1 69467
一年生亚组	甘西鼠尾草	<i>S. przewalskii</i>	S013	云南 中甸	EU1 69471
	短冠鼠尾系		S015	云南 德钦	EU1 69476
	少花鼠尾草	<i>S. pauciflora</i>	S014	云南 中甸	EU1 69477
荔枝草亚属 丹参系	粘毛鼠尾草	<i>S. nobrowskii</i>	S008	云南 丽江	EU1 69478
	三叶鼠尾草	<i>S. trijuga</i>	S025	北京 怀柔	EU1 69481
	丹参	<i>S. miltiorrhiza</i> var. <i>miltiorrhiza</i>	S027	北京 药用植物研究所	EU1 69480
	白花丹参	<i>S. miltiorrhiza</i> var. <i>miltiorrhiza</i> f. <i>alba</i>	S004	云南 昆明	EU1 69482
	云南鼠尾草	<i>S. yunnanensis</i>	S024	湖北 宜昌	EU1 69479
荔枝草亚属 长冠鼠尾系	长冠鼠尾草	<i>S. plectanthis</i>	S026	北京 药用植物研究所	EU1 69485
	超级鼠尾草	<i>S. sylvestris</i> (欧洲引进种)	S028	北京 药用植物研究所	EU1 69486
	草地鼠尾草	<i>S. pratensis</i> (欧洲引进种)	S002	云南 昆明	EU1 69483
美洲鼠尾草亚属	粉萼鼠尾草	<i>S. farinacea</i> (美洲引进种)	S003	云南 昆明	EU1 69484
	朱唇	<i>S. coccinea</i> (美洲引进种)			

基因组 DNA,以 pH 7.5 Tris饱和酚 氯仿抽提纯化,适量 TE缓冲液溶解,电泳检查浓度和纯度。

ITS区片段的 PCR 扩增 采用标准的双链 PCR反应扩增核基因的整个 ITS片段 (5'18S ~ 3'26S,包括 5.8S编码区,Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400)。20 μL反应体系含 10 × PCR buffer (含 MgCl<sub>2</sub>) 2 μL, dNTP(2 mmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL, ITS 与 ITA引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 0.5 μL,高保真 Taq 聚合酶(2 U·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL,模板溶液(DNA 约 0.1 μg·μL<sup>-1</sup>) 1 μL,DDH<sub>2</sub>O补足体积。PCR 扩增反应程序为 94 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 75 s,循环 30 次,然后 72 °C 保温 7 min,反应结束后,产物置 4 °C 保存。

PCR产物序列测定 纯化后的 PCR产物作为测序反应的模版,PCR反应的引物直接作为测序引物,由中国农业科学院开放实验室进行 DNA序列测定,测序结果递交 Genbank,登录号见表 1。

序列数据的处理 DNA序列的排序用 Clustal X(1.8)软件完成,排序后的序列使用分子进化遗传

分析软件 MEGA 3.1 (molecular evolutionary genetic analysis)进行分析,以 Kimura-2 参数计算遗传距离,以 4 个国外引进种作为外类群,采用邻接法 (neighbor-joining, NJ)与自展检验 (Bootstrap) 1 000 次构建系统发生树。

## 结果

### 1 ITS区的长度与变异

鼠尾草属 27 个样品的 ITS区合并 5.8S rDNA 序列总长度为 612 ~ 617 bp, Clustal X 排序后简并长度为 629 bp,其中 ITS1 区简并长度 236 bp,5.8S rDNA 区 163 bp,ITS2 区 230 bp。各碱基质量分数与信息位点见表 2,ITS1 区与 ITS2 区的 GC 含量较为接近,并明显高于 5.8S rDNA 区,变异位点也主要集中于 ITS1 与 ITS2 区,其碱基变异率分别为 38.14%与 37.39%。5.8S rDNA 区相当保守,变异位点主要出现于 4 个国外引进种中,碱基变异率为 2.45%。碱基缺失性变异仅见于 ITS1 与 ITS2 区,缺失率分别为 5.5%与 8.26%。

**Table 2** Characteristics of ITS region plus 5.8S rDNA sequence of 27 *Saivia* samples

	Sequence length/bp	T/%	C/%	A/%	G/%	Base substitution	Gaps
ITS1 + ITS2 + 5.8S	615.4(612 - 617)	18.6	32.6	18.3	30.5	180	32
ITS1	228.9(226 - 233)	15.9	33.7	17.8	32.6	90	13
ITS2	223.6(216 - 228)	19.6	36.0	14.0	30.4	86	19
5.8S rDNA	163	21.0	26.4	25.0	27.6	4	0

**Table 3** Pairwise distance of 27 *Saivia* samples

S012	S021	S023	S017	S019	S020	S010	S018	S006	S009	S022	S013	S007	S005	S016	S011	S015	S014	S008	S024	S027	S025	S004	S002	S003	S026	S028
S012																										
S021	0.002																									
S023	0.005	0.003																								
S017	0.012	0.010	0.010																							
S019	0.010	0.008	0.012	0.005																						
S020	0.015	0.014	0.017	0.017	0.015																					
S010	0.017	0.015	0.015	0.015	0.017	0.019																				
S018	0.022	0.020	0.020	0.020	0.022	0.024	0.005																			
S006	0.012	0.010	0.014	0.014	0.012	0.014	0.008	0.010																		
S009	0.015	0.014	0.017	0.017	0.015	0.015	0.008	0.014	0.010																	
S022	0.012	0.010	0.010	0.010	0.012	0.014	0.008	0.014	0.007	0.007																
S013	0.014	0.012	0.015	0.015	0.014	0.012	0.014	0.019	0.008	0.012	0.008															
S007	0.015	0.014	0.017	0.017	0.015	0.014	0.019	0.024	0.014	0.017	0.014	0.012														
S005	0.012	0.010	0.014	0.014	0.012	0.010	0.015	0.020	0.010	0.014	0.010	0.008	0.007													
S016	0.010	0.008	0.012	0.012	0.010	0.010	0.015	0.020	0.010	0.014	0.010	0.008	0.007	0.003												
S011	0.012	0.010	0.014	0.014	0.012	0.010	0.015	0.020	0.010	0.012	0.010	0.012	0.014	0.010	0.010											
S015	0.015	0.014	0.017	0.017	0.015	0.017	0.015	0.020	0.010	0.014	0.010	0.005	0.017	0.014	0.014	0.014										
S014	0.027	0.026	0.029	0.029	0.027	0.026	0.031	0.036	0.026	0.029	0.026	0.024	0.029	0.026	0.026	0.026	0.026									
S008	0.049	0.051	0.051	0.047	0.049	0.051	0.045	0.051	0.047	0.047	0.043	0.049	0.051	0.047	0.047	0.051	0.047	0.054								
S024	0.045	0.047	0.050	0.052	0.051	0.049	0.051	0.054	0.043	0.049	0.045	0.047	0.049	0.049	0.049	0.045	0.054	0.060								
S027	0.051	0.052	0.056	0.058	0.056	0.054	0.056	0.060	0.049	0.054	0.051	0.052	0.054	0.054	0.054	0.051	0.060	0.065	0.005							
S025	0.050	0.052	0.056	0.058	0.056	0.054	0.056	0.060	0.049	0.054	0.050	0.052	0.054	0.054	0.051	0.050	0.060	0.065	0.005	0.007						
S004	0.043	0.045	0.049	0.051	0.049	0.047	0.046	0.054	0.043	0.47	0.043	0.045	0.047	0.047	0.047	0.047	0.052	0.062	0.026	0.029	0.029					
S002	0.154	0.157	0.157	0.159	0.161	0.157	0.159	0.161	0.155	0.161	0.154	0.152	0.150	0.152	0.154	0.157	0.150	0.157	0.152	0.158	0.163	0.165	0.157			
S003	0.140	0.142	0.142	0.144	0.146	0.142	0.144	0.147	0.140	0.147	0.140	0.138	0.140	0.138	0.140	0.142	0.136	0.142	0.138	0.142	0.146	0.148	0.140	0.040		
S026	0.124	0.126	0.130	0.132	0.130	0.126	0.134	0.139	0.126	0.130	0.128	0.130	0.128	0.126	0.128	0.126	0.128	0.126	0.138	0.116	0.118	0.122	0.112	0.124	0.114	
S028	0.122	0.124	0.128	0.130	0.128	0.124	0.132	0.137	0.124	0.128	0.126	0.128	0.126	0.124	0.126	0.124	0.126	0.124	0.136	0.114	0.116	0.120	0.112	0.128	0.114	0.007



Salvia Clade II。由于我国是东亚鼠尾草属植物的分布中心,结合本研究的结果可以推测我国的鼠尾草属植物的系统位置应该全部位于 Salvia Clade III 中,对我国鼠尾草属植物进行更广泛的分子系统学研究将可能证实这一推测。

ITS系统树对于组与亚组内各种间的系统位置的处理未显示出与形态学处理的明显相似性,特别在弧隔鼠尾亚属宽球苏组多年生亚组内,多数分支的 bootstrap支持率均较低,主要原因可能在于该亚组内 ITS区段变异率不高,各样品间的遗传距离为 0.002~0.024,即在总长 629 bp的序列中,17个不同样品间仅有 1~15个碱基的不同,一方面说明了该亚组内各种间亲缘关系很近,另一方面由于信息量的不足使得亚组以下水平的系统位置解析的准确度明显下降而难以确定其合理性。ITS系统树揭示了一个与形态学分类明显矛盾的问题,即黄花鼠尾草的两个变种明显位于两个距离较远的分枝上,提示二者应该作为两个单独的种进行分类学处理,但由于二者在形态学特征上具有明显的相似性,因此上述结论仍有待其他分子证据的支持。从弧隔鼠尾亚属 18个样品间的遗传距离看,同一种下的变种、变型间的遗传距离有时超过了其他种间的遗传距离,由此可见 ITS序列在种间分化的活跃程度并不相同,并可能由此影响了近缘种的解析,而进一步引入其他分子证据为 rbcL或结合 RAPD分析将有利于确证这些近缘种及种以下水平的系统关系。

从本研究结果与文献报道看,弧隔鼠尾亚属与荔枝草亚属无论从形态学还是分子系统学上均具有明显的差别,但来自二亚属的多种植物均作为丹参在不同地区广泛应用,其主要原因在于二亚属中均含有鼠尾草属的特征性二萜醌类化合物(如丹参酮)<sup>[7]</sup>。由于遗传多样性是化学成分多样性的基础,因此 ITS分析预测了二亚属除已发现的共性成分外,尚有许多独特成分有待发现,也因此提示了来自二亚属的药用植物在药理作用上应存在明显区别。由于目前的化学成分研究主要集中于丹参组,而弧隔鼠尾亚属中的众多种类虽以丹参入药却成分未知,例如本研究中涉及的栗色鼠尾草、黄花鼠尾草、毛地黄鼠尾草、橙色鼠尾草等。近年对于弧隔鼠尾亚属甘西鼠尾草的系统化学研究发现了许多与丹参类似的二萜醌化合物及丹酚酸类化合物,同时有

许多新化合物从该种中获得分离(例如紫丹参素等)<sup>[8-10]</sup>,许多学者认为甘西鼠尾草的质量与疗效优于丹参,事实上遗传、成分与作用上的明显不同都提示该类药材应该作为新品种进行管理。从野外考察的情况看,本研究涉及的栗色鼠尾草、黄花鼠尾草、毛地黄鼠尾草、橙色鼠尾草、圆苞鼠尾草在云南的资源分布均较为丰富,提示弧隔鼠尾亚属中可能蕴藏着更多的药用资源有待开发,而深入的进行遗传多样性与化学成分多样性研究也表现出明显的理论与实践意义。

## References

- [1] *Salvia* in flora of China [DB/OL]. Flora of China, 17, 195[2007-03-20]. <http://www.eforas.org>.
- [2] Xiao XH, Fang QM, Xia WJ, et al. Numerical taxonomy of medicinal *Salvia* L. and the genuineness of Danshen [J]. J Plant Res Environ (植物资源与环境), 1997, 6: 17-21.
- [3] Zhang YT, Ai TM. Advances on Chemical Taxonomy of *Savia* Plants in China. Proceeding of the 6th Chinese Medicinal Plants and Plant Medicines Symposium. (第六届全国药用植物与植物药学术讨论会论文集) [C]. Changchun: Committee of Pharmaceutical Botany & Phytomedicines, Botanical Society of China, 2006: 190-192.
- [4] Wang H, Wang Q. Analysis of rDNA ITS sequences of *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* and plants of *Salvia* L. [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36: 1381-1385.
- [5] Doyle JJ, Doyle DJ. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
- [6] Walker JB, Sytsma KJ, Treutlein J, et al. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae [J]. Am J Bot, 2004, 91: 1115-1125.
- [7] Huang XL, Yang BJ, Hu ZB. Diterpene quinone of *Salvia* Linn. and their taxonomic significance [J]. Acta Phytotaxon Sin (植物学报), 1981, 19: 421-433.
- [8] Li B, Niu FD, Lin ZW, et al. Diterpenoids from the roots of *Salvia przewalskii* [J]. Phytochemistry, 1991, 30: 3815-3817.
- [9] Xue M, Shi YB, Cui Y, et al. Chemical constituents from *Salvia przewalskii* Maxim [J]. Nat Prod Res Dev, 2000, 12: 27-32.
- [10] Chen WS, Jia XM, Zhang WD, et al. Chemical constituents in the roots of *Salvia przewalskii* Maxim [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2003, 38: 354-357.