

广藿香 ITS基因型与地理分布的相关性分析

张英^{1,2}, 陈瑶², 张金超^{3,6}, 杨梦甦³, 曹晖⁴, 肖培根^{5*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029; 2. 香港城市大学 深圳研究院, 广东 深圳 518057;
3. 香港城市大学 生物及化学系, 香港; 4. 国家中药现代化工程技术研究中心, 广东 珠海 519020;
5. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100094; 6. 河北大学 化学与环境科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 探讨广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的地理分布与 ITS 基因型的关系, 为广藿香的道地性分析和种质评价提供分子依据。采用 PCR 直接测序技术对不同产地的广藿香 ITS₁ 和 ITS₂ 基因进行测序分析。结果显示, 不同产地广藿香 ITS₁ 基因和 ITS₂ 基因核苷酸序列长度分别为 424 bp 和 380 bp, 其中前者存在 19 个变异位点, 后者存在 5 个变异位点, 说明广藿香的地理分布和其 ITS₁, ITS₂ 基因型具有良好的相关性, 因而 ITS₁ 和 ITS₂ 测序分析可为广藿香的地理分布与基因型的相关性及其种质评价提供有用的分子信息。

关键词: 广藿香; DNA 测序; 种质评价

中图分类号: R282.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)01 - 0093 - 05

Correlation between ITS genotype and geographical distribution of *Pogostemon cablin*

ZHANG Ying^{1,2}, CHEN Yao², ZHANG Jin-chao^{3,6}, YANG Meng-su³,
CAO Hui⁴, XIAO Pei-gen^{5*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Shenzhen Institute of City University of Hong Kong, Shenzhen 518057, China; 3. Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China; 4. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai 519020, China; 5. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 6. College of Chemistry and Environmental Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: To investigate the correlation between genotype and distribution of *Pogostemon cablin* by sequencing ITS₁ and ITS₂ genes, and provide molecular information for its germplasm evaluation, ITS₁ and ITS₂ genes of *Pogostemon cablin* from different localities were identified by PCR direct sequencing. The sequences of ITS₁ and ITS₂ genes were 424 bp and 380 bp in length, respectively. And nineteen base substitutions were observed in ITS₁ gene, and five in ITS₂ gene. The results showed a good correlation between genotype and distribution of *Pogostemon cablin*, and ITS gene sequencing could provide useful molecular information for germplasm evaluation of the plant species verification.

Key words: *Pogostemon cablin*; DNA sequencing; germplasm evaluation

广藿香 (*Herba Pogostemonis*) 为唇形科 (Labiatae) 植物 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的干燥地上

部分, 别名刺蕊草、枝香、藿香, 是药材和香料兼用的植物。它作为一个自然分类群属于亚洲热带种, 原产东南亚菲律宾、马来西亚、印度等国家^[1]。宋代后传入我国岭南地区 (今广东), 目前在广东省的广州郊区、肇庆地区、湛江地区, 以及广西、海南岛、福建、台湾等地均有栽培^[2]。在不同的生态环境和人工栽培技术的影响下, 不同栽培地所产的广藿香在

收稿日期: 2006-04-14.

基金项目: 国家十五攻关计划重大项目 (2004BA721A28), 香港城市大学应用研究基金 (9630002).

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63011294, Fax: 86 - 10 - 63038753,
E-mail: xiaopg@public.bta.net.cn

外形和内在化学成分方面均有不同^[3-7],进而影响其药理作用和临床疗效,因此准确鉴别广藿香的物质来源变得尤为重要。

近年来,核糖体 RNA和叶绿体 DNA序列分析在植物种原鉴定、药材真伪鉴别等方面发挥了重要作用^[8,9]。刘玉萍等^[10]曾就广藿香的核 18S rRNA和叶绿体 *matK* 基因序列进行测序分析,并将其基因序列与挥发油化学型的相关性进行了探讨,发现广藿香基因序列分化与所含挥发油化学变异类型呈良好的相关性。ITS(internal transcribed spacer)是介于 18S和 26S之间的非编码内转录间隔区,包含一个 5.8S编码区。与 18S,26S等编码基因相比,ITS基因具有较快的进化速率,因而常用于研究植物种间甚至居群间的系统关系^[11-13]。本文采用 PCR直接测序技术,对不同产地广藿香的 ITS₁和 ITS₂ 基因进行测序分析研究,以期分析广藿香的地理分布与 ITS基因型的相关性。

材料和方法

样品 本实验所用广藿香均为新鲜植物叶片,分别于 2003~2005年采自广东和海南省的 8个不同产地(表 1),每个产地采集 5~10份,由广东珠海国家中药现代化工程技术研究中心曹晖研究员鉴定,所有凭证标本保存于香港城市大学深圳研究院标本室。

引物设计 ITS基因扩增引物根据其通用引物设计^[14]而合成:ITS₁-F(5'-CAC ACC GCC CGT CGC TCC CGA-3');ITS₁-R(5'-TTG CGT TCA AAG ACT CGA TG-3');ITS₂-F(5'-AAC CAT CGA GTC TTT GAA CGC A-3');ITS₂-R(5'-ACT CGC CGT TAC TAG GGG AA-3')。

总 DNA提取 应用德国 Qiagen公司植物快速

提取试剂盒(DNeasy Mini Kit)提取总基因组 DNA,每种材料测试 2~6个样本。

PCR扩增 反应体系取 DNA模板 50~100 ng,加入各反应试剂使其终浓度如下:dNTPs 0.2 mmol·L⁻¹,引物 0.25 μmol·L⁻¹,Taq DNA聚合酶 1.5 U,补水至终体积 50 mL。循环反应参数:94℃,3 min(热启动);94℃,1 min,50℃,1 min,72℃,2 min,30个循环;72℃,10 min。

PCR产物纯化 用乙醇 醋酸钠法进行纯化,PCR产物中加入 0.1 倍体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc(pH 5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇,混匀,-20℃放置 20~30 min,13 000×g离心 20 min。弃去上清液,加入 70%冰乙醇 150 μL,13 000×g离心 15 min。弃上清液,烘干水分,加入灭菌双蒸水溶解沉淀。

测序反应 参照美国 ABI公司试剂盒实验指南(Ver. 3.1)进行标记,上样于 ABI 3100全自动测序仪进行序列测定。所测单链序列经序列阅读软件 Chromas(Ver. 2.34)读序并经人工校阅,且用手工调整以减少空位(gap)数目。

序列分析 排好的序列采用 Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)和 ClustalW(<http://www.ebi.ac.uk>)进行 DNA序列变异位点比较和同源性分析。

结果

1 DNA提取和 PCR扩增

8个不同产地的新鲜植物广藿香样本用 DNeasy Mini Kit可以提取到长度为 23.1 kb左右的总基因组 DNA。经过 PCR扩增反应,均成功获得了包含 ITS₁ 基因和 ITS₂ 基因约 800 bp的片段。

Table 1 Samples of *Pogostemon cablin* used in this study

Sample No.	Place cultivated	Date collected	Accession number in GenBank
G2	Niuwei, Gaoyao, Guangdong	Nov. 11. 2003	DQ632599
G3	Longgang, Gaoyao, Guangdong	Nov. 11. 2003	DQ632598
G8	Tanlong, Leizhou, Guangdong	Nov. 10. 2004	DQ632604
G9	Pinghu, Leizhou, Guangdong	Nov. 9. 2004	DQ632605
G10	Tiantou, Suixi, Guangdong	Nov. 9. 2004	DQ632601
G11	Shitang, Suixi, Guangdong	Nov. 9. 2004	DQ632602
G12	Chetou, Wanning, Hainan	Nov. 11. 2004	DQ632603
G19	Longdong, Guangzhou, Guangdong	Apr. 8. 2005	DQ632600

	25	31	58	61	136	160	169	184	187	199	202	230	270	352	371	384	394	396	416
G2	C	A	C	G	T	C	C	A	A	C	T	T	C	C	C	T	G	C	G
G3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G8	*	G	*	*	C	*	*	*	T	T	C	*	*	*	*	C	*	*	*
G9	*	*	*	*	C	*	T	T	T	T	*	C	T	T	T	*	A	A	T
G10	*	G	*	*	*	T	*	*	*	*	C	*	T	T	*	*	*	*	*
G11	-	G	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*
G12	*	G	*	C	C	*	*	*	*	*	C	C	T	*	*	*	*	*	*
G19	-	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*

Figure 1 Comparison of variable sites in ITS₁ gene sequence from eight samples of *Pogostemon cablin*. Upper number indicates nucleotide position from upstream of ITS₁ sequence, asterisk (*) indicates identity to base composition of G2 sequence; hyphen (-) indicates alignment gap

2 DNA序列测定

由于不同产地广藿香 5.8S区域高度保守,故仅取 ITS₁ 基因和 ITS₂ 基因核苷酸序列进行比较,其长度分别为 424 bp和 380 bp,其中 ITS₁ 基因核苷酸序列存在 19个变异位点(图 1), ITS₂ 基因序列存在 5个变异位点(图 2)。这些序列已登录于国际基因库 (GenBank)。

	13	14	200	212	274
G2	T	C	A	G	C
G3	*	*	*	*	*
G8	C	T	T	*	*
G9	C	T	T	*	*
G10	C	T	T	*	*
G11	C	T	T	*	*
G12	*	*	T	*	*
G19	*	*	T	T	T

Figure 2 Comparison of variable sites in ITS₂ sequence from eight samples of *Pogostemon cablin*. Upper number indicates nucleotide position from upstream of ITS₂ sequence, asterisk (*) indicates identity to base composition of G2 sequence

讨论

广藿香作为一个自然分类群属于亚洲热带种,生态习性为喜温暖,忌严寒,尤怕霜冻,最适生长气温 25 ~ 28 °C;喜湿润,忌干旱,适于年降水量 1 600 ~ 2 000 mm 相对湿度 80%以上气候;不耐烈日晒但要求全光照。因此,广藿香栽培地区分别位于我国北纬 18.8° ~ 23.1°之间,属亚热带与热带湿润季风气候的广东和海南两省。

本实验选取的 8个广藿香样本分别采于广东和海南两省,广东省的样本采集于广州市、高要市、雷

州市和遂溪县等地,海南省的样本采集于万宁市。

从地理特征分析,广东省北依南岭,南临南海,地势大体北高南低,地形以丘陵为主,可分粤北山地,西南山地与台地、雷州半岛、珠江三角洲等部分。河流众多,主要有珠江水系的东江、北江、西江。北回归线从东至西横过省内中部,大致以西江为界,北部、东北部有较高山脉,南部沿海地区多为低丘、台地或平原,并与海岸线平行。山脉走向与偏南暖湿气流成直交和斜交,还有不少向南开口的喇叭口地形,南来的水汽进入容易辐合,使江河下游三角洲和滨海平原降雨量加大。湛江市位于西南的雷州半岛,东西两面临海,高温多雨,日照充足。大部分属平缓台地,小部分为低丘陵。地势南高北低,沟谷多为南北走向。

海南省北隔琼州海峡与广东雷州半岛相望,年平均气温 22 ~ 26 °C。地形以台地、阶地和平原为主,为中部高、四周低的地势。从中部向四周,由山地、丘陵到台地、阶地,再到平原,逐级下降,呈环行层状的地形分布态势。万宁市位于中部偏东地区,全年暖热,雨量充沛,干湿季节明显,光照时间长,年日照时数为 1 750 ~ 2 650 h。降雨充沛,年降雨量约 2 000 ~ 2 400 mm。

通过对以上不同产地广藿香挥发油成分分析,其挥发油组成有明显差异^[15-19]。根据这些成分差异,可分为 2个化学型,即 (1) 广藿香酮型:含氧组分以广藿香酮为主 (>30%),而广藿香醇含量低 (<16%),含氧萜烯类和不含氧萜烯类组分含量相近,其栽培地在广东省广州市郊的黄村、罗岗及肇庆地区高要;(2) 广藿香醇型:含氧组分以广藿香醇为主 (36.4% ~ 47.8%),广藿香酮含量较低 (2.3% ~ 13.8%),而不含氧萜烯类组分含量较高 (46.7% ~ 54.3%),其栽培地在广东省湛江地区雷州、吴川、

遂溪以及海南省万宁等地。根据罗集鹏等^[20]研究报告,产生挥发油组成差异有以下 3 个因素: ① 气候因素:从收集的 1997 年气象资料(包括年平均气温、最高气温、最低气温、年降雨量、光照天数以及月平均气温、最高气温、最低气温、年降雨量、光照天数)看,随地理从北到南分布,年平均气温及光照天数略有增加,广藿香挥发油中广藿香醇含量从北向南亦逐渐增加,以广州和高要产者最低,吴川、遂溪和雷州产者急剧增加,而后三者又依次增加;广藿香酮含量则与上述相反,以广州最高,高要其次,吴川、遂溪和雷州的急剧降低,且三者依次降低。以上结果提示,气温和光照对广藿香挥发油主要成分广藿香醇和广藿香酮的合成和积累有一定影响,前者随气温和光照的增加而略有增加,后者则相反。② 土壤因素:上述地区的土壤,除雷州为红壤以外,其余均属半沙质酸性土壤,pH 均在 5 左右。广藿香中宏量元素和微量元素含量与土壤中元素含量有一定的关系,从北往南,广藿香中宏量元素和微量元素的分布呈现一定的指纹特征。③ 遗传因素:上述地区的 6 个广藿香样本 *mat K* 基因序列存在 47 个变异位点,18S rRNA 基因存在 17 个变异位点,非加权组平均法构建的系统分枝树表明广藿香基因序分化与其产地,所含挥发油化学变异类型有良好的相关性。属于广藿香酮型的广州“石牌藿香”与邻近的肇庆地区“高要藿香”聚为一组,而远离属于广藿香醇型的广东湛江地区吴川、遂溪、雷州与海南省万宁产的“海南藿香”。在后一组中,吴川和遂溪产广藿香先聚为一支,再与雷州产广藿香相聚,最后与万宁的相聚。因此,遗传学因素可能是造成上述挥发油成分差异显著的主要原因。

根据 ITS₁ 基因和 ITS₂ 基因序列共同构建的系统分支树(图 3),可以明确看出 8 个产地的广藿香的地理型与基因型具有显著的相关性。首先,相同地域的样品的基因序列相似程度较高。高要市的 G2, G3 的 ITS₁ 基因和 ITS₂ 基因序列完全相同,雷州市的 G8, G9 和遂溪县的 G10, G11 的序列相似程度也都分别高于广州市的 G19 和万宁市的 G12。其次,地域越近的样品的基因序列相似程度越高。8 个不同产地的广藿香分为 3 组。G2 和 G3 先聚为一支,再与 G19 聚为第一组。G8, G9 和 G10, G11 先分别聚为一支,再相聚为第二组。G12 与广东的 7 个样品的遗传距离则相对较远,独立为第三组。

传统认为,栽培于广州和高要地区的广藿香被称为“石牌广藿香”,药用品质最优。而栽培于雷州、

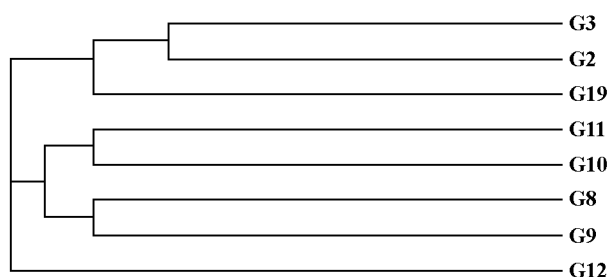


Figure 3 Cluster tree based on the sequences of ITS₁ and ITS₂ gene

吴川、遂溪和海南万宁地区的统称为“海南广藿香”,通常只作为提取挥发油的原料而非药用^[21]。本研究结果表明高要的 G2, G3 基因型与广州的 G19 更加接近,这与传统说法一致。广藿香的化学型可分为广藿香醇型(patchouliol-type)和广藿香酮型(pogostone-type),最新的研究发现在这两型之间还存在一个过渡型(interm-type)^[22]。至于化学型和基因型的相关性对于其品质的影响,将在今后作进一步研究。

References

- [1] Quisumbing E. Medicinal Plants of the Philippines [M]. Manila: Bureau of Printing, 1951: 829 - 830.
- [2] Huang YC. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Tomus 66. Beijing: Science Press, 1977: 370 - 371.
- [3] Li W, Pan CM, Song LF, et al. Observation and comparison of the flowers of *Pogostemon cablin* from different habitats [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2003, 26: 79 - 81.
- [4] Li W, Pan CM, Xu L, et al. The observation and comparison of *Pogostemon cablin* from different habitats [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2002, 25: 56 - 57.
- [5] Xu SJ, Wang XF, Xu XH, et al. The classification of cultivars of *Pogostemon cablin* cultivated in Guangdong Province of China [J]. J South China Norm Univ (Nat Sci) (华南师范大学学报 自然科学版), 2003, 1: 82 - 86.
- [6] Luo JP, Liu YP, Feng YF, et al. Two chemotypes of *Pogostemon cablin* and influence of region of cultivation and harvesting time on volatile oil composition [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 307 - 310.
- [7] Guo XL, Feng YF, Luo JP. Re-study on characteristic fingerprint of volatile oil from *Herba Pogostemonis* by GC [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2004, 27: 903 - 908.
- [8] Shaw PC, Wang J, But PPH (eds.). Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology [M]. Singapore: World Scientific Publishing Co., Pte. Ltd.,

- 2002: 1 - 23.
- [9] Shaw PC, Cao H. Molecular Authentication of Chinese Medicinal Materials (中药分子鉴定) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2004, 1 - 32.
- [10] Liu YP, Luo JP, Feng YF, et al. DNA profiling of *Pogostemon cablin* chemotypes differing in essential oil composition [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 304 - 308.
- [11] Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW. Molecular Techniques in Taxonomy [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1991, 88 - 102.
- [12] Sang T, Crawford DJ, Stuessy T. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 6813 - 6817.
- [13] Wen J, Zimmer EA. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. Mol Phylogenet Evol, 1996, 6: 167 - 177.
- [14] Innis M, Gelfand D, Sninsky J, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application [M]. San Diego: Academic Press, 1990, 3. 1. 2 - 3. 1. 4.
- [15] Luo JP, Feng YF, Guo XL, et al. GC-MS analysis of volatile oil of *Herba Pogostemonis* collected from Gaoyao county [J]. J Chin Med Mater (中药材), 1999, 22: 25 - 28.
- [16] Feng YF, Guo XL, Luo JP. GC-MS analysis of volatile oil of *Herba Pogostemonis* collected from Leizhou county [J]. J Chin Med Mater (中药材), 1999, 22: 241 - 243.
- [17] Guo XL, Feng YF, Luo JP. Analysis on dynamic change of volatile oil of *Pogostemon cablin* from Wuchuan county [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2002, 25: 262 - 263.
- [18] Luo JP, Guo XL, Feng YF. Analysis on volatile oil of *Pogostemon cablin* in different collecting time from Hainan province [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2002, 25: 21 - 23.
- [19] Luo JP, Feng YF, Guo XL. Influence of different collection time to constituents of volatile oil of *Herba Pogostemonis* collected from Gaoyao county [J]. J Pharm Pract (药学实践杂志), 2000, 18: 329 - 330.
- [20] Luo JP, Feng YF, He B, et al. Genuine producing area of *Pogostemon cablin* [C]. 2004 Proceedings of Annual Meeting of Chinese Pharmaceutical Association (CD-ROM version) (2004中国药学会学术年会论文集光盘版), Kunming, Yunnan, July 2004.
- [21] Synonymous (eds). Chinese Materia Medica (中药志) [M]. 2nd ed. Vol. 4. Beijing: People Health Publishing House (人民卫生出版社), 1988: 128 - 135.
- [22] Hu LF, Li SP, Cao H, et al. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 42: 200 - 206.