

中日产川芎的 *matK* ITS 基因序列及其物种间的亲缘关系刘玉萍¹, 曹 晖^{2*}, 韩桂茹³, 伏见裕利⁴, 小松 かつ子⁴

(1. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2. 国家中药现代化工程技术研究中心, 广东 珠海 519020;
3. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011; 4. 富山医科药科大学和汉药研究所药效解析中心, 日本富山 930 - 0194)

摘要: 目的 分析中国产川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 及日本产川芎 *Cnidium officinale* Makino 的核基因组 ITS 和叶绿体基因组 *matK* 序列, 为探讨中日产川芎物种间的亲缘关系提供分子依据。方法 采用 PCR 直接测序技术测定川芎和日本川芎的 ITS 基因和 *matK* 基因核苷酸序列并作序列变异分析。结果 川芎和日本川芎的 *matK* 序列长度均为 1268 bp, 编码 422 个氨基酸。ITS1-5.8S-ITS2 序列长度均为 699 bp, 其中 18S rRNA 基因 3' 端序列 54 bp, ITS1 序列 215 bp, 5.8S rRNA 基因序列 162 bp, ITS2 序列 222 bp, 26S rRNA 基因 5' 端序列 46 bp。根据排序比较, 川芎原植物与其商品药材间的 *matK* 基因和 ITS 基因序列完全相同, 而川芎与日本川芎间 *matK* 基因则仅有 1 个变异位点, 即在上游 959 nt 处 1 个转换替代 (T → C), 反映在氨基酸序列则发生一个非同义取代 V (GTG) → A (GCG); ITS 基因也仅有 1 个变异位点, 即在 ITS1 上游 54 nt 处 1 个转换替代 (T → C)。结论 通过进化速率较快的基因序列同源性分析, 基本可以认为中日所产川芎基原一致, 日本川芎学名似应改为 *Ligusticum chuanxiong* Hort.。

关键词: 川芎; 日本川芎; *matK* 基因; ITS 基因; 核苷酸测序

中图分类号: R282.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)01 - 0063 - 06

我国中医药与日本汉方医药同根同源, 但由于地域、资源、民族、文字等国情的不同及时代的变迁, 中日两国所用生药存在许多同名异物、同物异名、用等现象。这种差异不仅影响植物化学、药理学等实验结果的重复性和可比性, 而且容易导致临床应用上的混乱与矛盾。据初步统计, 中日两国常用生药基原有差异的约 20 种^[1], 其中“川芎”在《中国药典》(2000 年版) 记载来源于伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的块茎^[2]; 而在《日本药局方》(13 改正版) 则规定为同科蛇床属植物日本川芎 *Cnidium officinale* Makino 之根茎^[3]。

虽然中日产川芎的基原不同, 但两者药材形态和组织粉末特征较相似, 功能主治亦类同, 如含川芎的著名方剂“四物汤”、“川芎茶调散”在两国中医(汉方医)临床用于相同病症^[4,5]。由于果实形态是伞形科植物分属、分种的主要依据, 至今川芎植物在原产地四川没有发现野生种, 而各地引种栽培品一般不见开花结果, 其基原及分类学位置一直有争议。据难波恒雄考证, 日本川芎系江户时代(约 17 世纪中

叶)从中国引种的, 最先栽培于日本南部九州地区, 继后北移关东仙台地区, 现在主要栽培在北海道地区^[5]。现在“日本川芎”在我国吉林延边地区称“东川芎”、“和芎”, 系解放前从日本引种的, 曾作川芎代用品使用^[6]。尽管川芎在中日两国间相互引种, 两者植物形态虽略有变异, 但其化学成分如挥发油、苯酞等内酯类组成并无明显差异, 仅其相对含量有所变异, 如川芎挥发油中的藁本内酯含量(~ 60 %) 高于日本川芎(~ 23 %) 近 3 倍, 与吉林延边地区东川芎(~ 56 %) 相当, 而其蛇床内酯含量(~ 1 %) 明显低于日本川芎(~ 11 %) 和东川芎(6 % ~ 8 %) ^[7], 有关活血化瘀的药理活性实验亦表明两者药效相当^[8]。这些表型特征的相似性至少提示两者物种亲缘关系接近, 甚至是同物异名。近年来发展的基因分析技术为上述推测提供了有力的分子佐证, 近藤等^[9]用叶绿体基因组的核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶大亚基(*rbcl* 基因) (川芎 GenBank- D44572, 日本川芎 GenBank- D44586) 和我们^[10]用核基因组的核糖体核糖酸小亚基(18S rRNA 基因) (川芎 GenBank- D83027, 日本川芎 GenBank- D83028) 进行序列分析, 均发现两者的 *rbcl* 基因片段(1224 bp) 和 18S rRNA 基因片段(1808 bp) 序列完全相同。在采用传统形态学、化学方法很难证明两者亲缘关系的情况下, 虽然 *rbcl*、

收稿日期: 2001-06-23.

作者简介: 刘玉萍(1963 -), 女, 博士, 副研究员;

曹 晖(1961 -), 男, 博士, 研究员.

* 通讯作者 Tel: (0756) 8135676, Fax: (0756) 8289500,

E-mail: kovhuicao@yahoo.com.cn

18S rRNA 序列标记不失为一种有效的分子手段,但是由于叶绿体 *rbcL* 和核 rDNA 基因比较保守,进化速率远低于叶绿体赖氨酸-tRNA 内含子成熟酶基因 (*matK*) 和核糖体非编码转录区 (ITS) 基因^[11]。因此,本文对川芎和日本川芎的 *matK* 和 ITS 基因核苷酸序列进行测序,以期通过进化速率快、分辨率高的序列标记分析手段,为探讨中日产川芎物种的亲缘关系提供更多的分子依据。

Table 1 Origin and samples of chuanxiong and Japanese Chuanxiong used in this study

Sample	Scientific name	Source	Code
Chuanxiong (fresh plant)	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	Dujiangyan, Sichuan, China, Aug., 1999	LC1
Chuanxiong (crude drug)	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	NICBPB (Lot No. 918 - 9904), Beijing, China, March, 2000	LC2
Japanese Chuanxiong (fresh plant)	<i>Gnidium officinale</i> Makino	Herbal Garden of TMPU, Toyama, Japan, Aug., 2000	CO1
Japanese Chuanxiong (crude drug)	<i>Gnidium officinale</i> Makino	Hirosaka, Aomori Japan, Sep., 2000	CO2

试剂与仪器 DNA 微量提取试剂盒 DNeasy Plant Mini Kit 和 PCR 扩增产物纯化试剂盒 QIAquick Purification Kit (均德国 Qiagen 公司)。0.5xTAE 电泳缓冲液:20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.5); 1 mmol·L⁻¹ 冰醋酸; 5 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)。PCR 试剂: 1x Taq 缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 9.0); 50 mmol·L⁻¹ KCl; 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.1% Triton X-100), dNTPs (dTTP, dTGP, dTCP, dTTP 各 0.2 mmol·L⁻¹) 和 Taq DNA 聚合酶 (均美国 Promega 公司)。循环测序试剂盒 Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit: d/ddNTP 混合试剂 (Tris-HCl pH 9.5, MgCl₂, Nonidet P-40, 吐温-20, 2-巯基乙醇、耐热焦磷酸酶、测序酶等成分), 终止缓冲液 (去离子甲酰胺、EDTA、品红) (均英国 Amersham Life Science 公司)。分子标记物 (美国 Pharmacia 公司), 其他试剂均购自日本和光纯药株式会社。

5436 型电热恒温振荡器和 5415C 型台式离心机 (德国 Eppendorf 公司), PAC/3000 型电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司), PTC-100 型 PCR 仪 (美国 MJ Research 公司), AE-6911 FX 型 UV 照相打印机 (日本 Atto 公司), UltraSpec 4000 型紫外可见分光光度计 (英国 Pharmacia Biotech 公司), 4000L 型 DNA 自动测序仪 (美国 LICOR 公司)。

引物设计 ITS 基因 PCR 扩增的通用引物根据同科植物野胡萝卜 (*Daucus carota* L.) ITS 序列设计^[12]而合成。而 *matK* 基因 PCR 扩增的通用引物根据大井等^[13]设计而合成。

由于 ITS 基因和 *matK* 基因长度为 0.7 ~ 1.2

材料与方 法

实验材料 本实验所用川芎新鲜植物材料 1999 年 8 月采自四川都江堰; 日本川芎 2000 年 8 月采自富山医科药科大学 (TMPU) 药用植物园。川芎干燥药材样品为 2000 年 3 月购自中国药品生物制品检定所 (NICBPB) 标准对照药材; 日本川芎为 2000 年 9 月购自日本青森弘前市场品。原植物及药材经作者鉴定 (表 1)。

kb, 利用单个引物进行 1 次 PCR 测序反应无法精确测得此区段全部序列, 因此我们还分别设计合成了 2 对荧光测序内引物 (表 2)。

Table 2 Amplification and sequencing primers used in this study

Name of primer	Sequence (5' → 3')
ITS gene	
PCR primer ITS-5F	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG
ITS-3R	ACCCGCTGAGTTTAAGCAT
Sequencing primer ITSF1	GTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCA
ITSF2	GCATCGATGAAGAACGTAG
ITSR1	CTTTGAACGCAAGTTGCCGC
ITSR2	ACCCGCTGAGTTTAAGCAT
<i>matK</i> gene	
PCR primer <i>matK</i> -AF	CTATATCCACTTATCTTTTCAGGAGT
<i>matK</i> -8R	AAAGTTCTAGCACAAAGAAAGTCGA
Sequencing primer <i>matK</i> F1	GCACTTGCGCATGATCATGGT
<i>matK</i> F2	TGGTTGTTTAAGGACCCCTTT
<i>matK</i> R1	TCCAATACGATACTCGTGGAG
<i>matK</i> R2	AAAGTCGAAGTATATACTTTA

总 DNA 制备 实验样品经酒精消毒和蒸馏水洗净后, 切取植物新鲜叶片或药材内部组织少许在乳钵中用液氮冷却粉碎成细粉。采用 DNA 微量提取试剂盒 DNeasy Plant Mini Kit 提取总 DNA。取 DNA 溶液 5 μL 在 1.0% 琼脂糖凝胶上用 0.5xTAE 电泳缓冲液在 BIO-RAD 电泳仪中电泳, EB 染色, UV 灯光下照相。DNA 长度与 λHindIII 分子标记物比较。

PCR 扩增反应 取 DNA 50 ~ 100 ng 作模板, 加

入 dNTPs 各 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, $1.5 \text{ U Taq DNA 聚合酶}$ 及 $1 \times \text{ Taq 缓冲液}$ 使最终反应体积为 $50 \text{ } \mu\text{L}$, 置于 PCR 仪, *matK* 基因按下述参数进行 1 个 PCR 循环: $94 \text{ } ^\circ\text{C}$, 3 min。然后按下述参数进行 35 个 PCR 循环: $94 \text{ } ^\circ\text{C}$, 1 min; $45 \text{ } ^\circ\text{C}$, 1 min; $72 \text{ } ^\circ\text{C}$, 2 min。最后按下述参数进行 1 个 PCR 循环: $72 \text{ } ^\circ\text{C}$, 30 min。ITS 基因循环参数: $94 \text{ } ^\circ\text{C}$, 3 min, 1 个循环。 $94 \text{ } ^\circ\text{C}$, 1 min; $60 \text{ } ^\circ\text{C}$, 2 min; $72 \text{ } ^\circ\text{C}$, 1 min, 30 个循环。 $72 \text{ } ^\circ\text{C}$, 10 min, 1 个循环。

取 PCR 反应液 $5 \text{ } \mu\text{L}$ 于 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, UV 灯光下照相。DNA 长度与 1 kb DNA ladder 分子标记物比较。

PCR 产物的纯化 PCR 扩增产物经 QIAquick Purification Kit 纯化后直接用于测序循环反应。

测序反应 采用 Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit 测序。测序反应分 4 管, 每管反应体积为 $6.75 \text{ } \mu\text{L}$, 内含 $3 \text{ } \mu\text{L}$ 纯化的 PCR 产物, $0.2 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光测序引物, $1.0 \text{ } \mu\text{L}$ d/ddNTP 混合试剂, 循环测序反应条件: $95 \text{ } ^\circ\text{C}$, 5 min, 1 个循环。 $95 \text{ } ^\circ\text{C}$, 30 s; $50 \text{ } ^\circ\text{C}$, 30 s; $70 \text{ } ^\circ\text{C}$, 1 min, 40 个循环。加 $2 \text{ } \mu\text{L}$ 终止缓冲液后, 离心混匀。取测序反应液 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 点样于 4% 聚丙烯酰胺 - $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素测序胶在 DNA 自动测序仪进行测序。

数据分析 所测单链序列经 ImagBase 软件(4.0 版本, 美国 Aloka 公司) 阅读并人工校阅后, 采用 AutoAssembler™ 程序(1.3.0 版本, 美国 Applied Biosystems 公司) 进行 DNA 双向排序, 并以手工适当调整以减少空位(gap) 数目。排好的序列用 Genetyx-SV/R 软件(10.1 版本, 日本 Software Development 公司) 进行 DNA 序列分析。

结果与讨论

在本研究中, 我们采用 1 个 DNA 微量提取试剂盒 DNeasy Plant Mini Kit 提取到川芎与日本川芎新鲜和药材样品的总基因组 DNA, 其分子长度均在 23.1 kb 左右(图 1)。采用 *matK* 基因和 ITS 基因通用引物进行 PCR 扩增能分别得到预期 1.2 kb 和 700 bp 的双链产物(图 2)。经过对 *matK* 基因和 ITS 基因 PCR 产物测序, 川芎 *matK* 序列长度为 1268 bp , 编码 422 个氨基酸(图 3)。ITS1-5.8S-ITS2 序列长度为 699 bp , 其中 18S rRNA 基因 $3'$ 端序列 54 bp , ITS1 序列 215 bp , 5.8S rRNA 序列 162 bp , ITS2 序列 222 bp , 26S rRNA 基因 $5'$ 端序列 46 bp (图 4)。

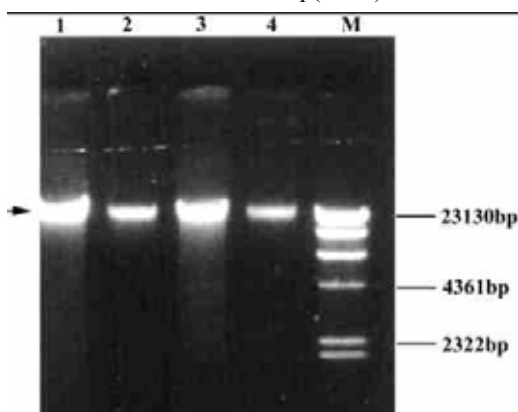


Figure 1 Agarose electrophoresis pattern of total DNA isolated from four samples of Chuanxiong and Japanese Chuanxiong

Lane 1: Fresh plant material of Chuanxiong (LC1); Lane 2: Dried crude drug material of Chuanxiong (LC2); Lane 3: Fresh plant material of Japanese Chuanxiong (CO1); Lane 4: Dried crude drug material of Japanese Chuanxiong (CO2); Lane M: λ Hind III marker

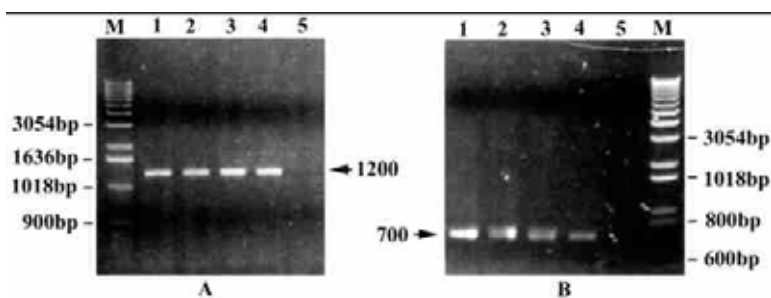


Figure 2 Agarose electrophoresis pattern of *matK* gene (A) and ITS gene (B) amplification from four samples of Chuanxiong and Japanese Chuanxiong

Lane 1: Fresh plant material of Chuanxiong (LC1); Lane 2: Dried crude drug material of Chuanxiong (LC2); Lane 3: Fresh plant material of Japanese Chuanxiong (CO1); Lane 4: Dried crude drug material of Japanese Chuanxiong (CO2); Lane 5: Negative control without template DNA; Lane M: 1 kb DNA ladder marker

1 CTA TAT CCA CTT ATC TTT CAG GAG TAT ATT TAT GCA CTT GCG CAT GAT CAT GGT TTA AAT AGA AAT AGA TCC GTT TTG TTG 81
 L Y P L I F Q E Y I Y A L A H D H G L N R N R S V L L
 82 GAA AAT GCA GGT TCT AAT AAG TTC AGC TTA CTA ATT GTG AAA CGT GCA ATT GAT CGA ATG TAT CAG TAT GAA CAG AAT CAT 162
 E N A G S N K F S L L I V K R A I D R M Y Q Y E Q N H
 163 TTG ATT CTT TTT GCT AAT GAT TTC ACC CAA AAT ACC TTT TTT GGG CGC AAC AAG AAT TTT AAT TTT CAA ATG ATA TCA GAA 243
 L I L F A N D F T Q N T F F G R N K N F N F Q M I S E
 244 GGA TTT GCA GTC ATT GTA GAA ATT CCG TTT TAT CTC CGA TTA TTA TTT TCG ATA GAA AGG AAA GGA ATA GTT AAA TCT CAT 324
 G F A V I V E I P F Y L R L L F S I E R K G I V K S H
 325 AAT TTA CGA TCA ATT CAT TCA ATA TTC CCT TTT TTA GAG GAC AAA TTT TCA CAT TTA ATT TAT GTG TTA GAG ATA CTA ATA 405
 N L R S I H S I F P F L E D K F S H L I Y V L E I L I
 406 CCC TAC CCA GTC CAT CTG GAA ATA TTG GTT CAA ACT CTT CGC TAC TGG GTA AAA GAC GCC TCT TCT TTA CAT TTA TTA AGA 486
 P Y P V H L E I L V Q T L R Y W V K D A S S L H L L R
 487 TTC TTT CTC CAC GAG TAT CGT ATT TGG AAT ACT CCA AAT AAA GCC AGT TCT TGT TTT TCA AAA AGA AAT CAA AGG TTT TTC 567
 F F L H E Y R I W N T P N K A S S C F S K R N Q R F F
 568 TTC GTC CTA TAT AAT TCT CAT CTA TGT GAA TAC GAA TCC ATC TCC GTC TTT CTT CGT AAC AAA TCT TCT CAT TTA TGC TCA 648
 F V L Y N S H L C E Y E S I S V F L R N K S S H L C S
 649 ACG TCT TCT GGA ACC CTT CTT GAA CGA ATC TTT TTC TAT GGA AAA CTA GAA CAT CTT GGA CTC GTA GAA GCT TTT GCT AAG 729
 T S S G T L L E R I F F Y G K L E H L G L V E A F A K
 730 GCC TTT CAG GAC AGT CTA TGG TTG TTT AAG GAC CCT TTC ATG CAT TAT ATT AGT TAT CAA GGA AAA TCA ATT CTC GCT TCA 810
 A F Q D S L W L F K D P F M H Y I S Y Q G K S I L A S
 811 AAA GGG ACG CCC CTT TTG ATG AAA AAA TGG ACA TAT TTT TTT GTC AAT TTA TGG AAA TGT CAT TTT TAC CTA TGG TCT CAG 891
 K G T P L L M K K W T Y F F V N L W K C H F Y L W S Q
 892 CCG GGA CGG ATC TGT ATA AAC CAA TTA TAT AAT CAT TCC CTA GCT CTT CTG GGC TAT CTA TCA AGT GTG CGA CTA AAC CCT 972
 P G R I C I N Q L Y N H S L A L L G Y L S S V R L N P
 ▲
 973 TCA ATG GTA CGC AGT CAA ATG CTA GAA AAT GCA TTT ATA ATT GAT AAT CCT ATT AAT AAG TTC GAT ACT CTT GTT CCA ATT 1053
 S M V R S Q M L E N A F I I D N P I N K F D T L V P I
 1054 GTT CCT CTA ATT GGA TCA TTG GCT AAG GCG AGA TTT TGT AAC GTA TTG GGG CTC CCT ATT AGT AAG GCG GTT TGG ACT GAT 1134
 V P L I G S L A K A R F C N V L G H P I S K A V W T D
 1135 TTA TCA GAT TCT GAT ATT GTT GTC CGA TTT GGG CGT ATC TGC AGA AAT ATT TCT CAT TAT TAT AGT ATA TCC TCA CAA AAA 1215
 L S D S D I V V R F G R I C R N I S H Y Y S I S S Q K
 1216 AAG AGT CTG TAT CGA ATA AAG TAT ATA CTT CGA CTT TCT TGT GCT AGA ACT TT 1268
 K S L Y R I K Y I L R L S C A R T

Figure 3 *matK* nucleotide and its amino acid sequences of Chuanxiong

Upper line shows the nucleotide sequence , lower line shows deduced amino acid sequence , ▲ indicates variable site (GTG/V) in Chuanxiong (*Ligusticum chuanxiong*) for “GCG/A” in Japanese Chuanxiong (*Cnidium officinale*)

↓ ITS1

1 GGAAGGAGAA GTCGTAACAA GGTTCGTA GGTGAACCTG CAGAAGGATC ATTGTCGAAT CCTGCGATAG CAGAACGACC 80
 81 TGCTAACACG TAAACACATC GGGCAAGTAT CGGTGGGCTT CAGTCCCTTG TCTGCGAACC CTGGTAGGTG GCCCTCTCG 160
 ▲
 161 GGTGGCCACT GGCCTGCAAA AACATTCCGGG CGCGGAATGC GCCAAGGAAC TTA AAACTGA ATTGTACGTC CGCATCCCGT 240
 241 TAGCGGGCAG CGGCGTCATT CCAAAACACA ACGACTCTCG ACAACGGATA TCTCGGCTCT CGCATCGATG AAGAACGTAG 320
 321 CGAAATGCGA TACTTGGTGT GAATTGCAGA ATCCCGTGAA CCATCGAGTC TTTGAACGCA AGTTGCGCCC GAAGCCATTA 400
 401 GGCTGAGGGC ACGTCTGCCT GGGTGTACG C ATCATCTTT GCCAACAACC ACACACTCCT TCAAGAGCTG TGCCGGTTTG 480
 481 GGGCGGAAAT TGGCCTCCCG TGCCTTGTG TGCGGTTGGC GCAAAAGCGA GTCTCCGGCG ACGGACGTCG TGACAACGGT 560
 561 GGTTGTA AAA GACCCTCATG TCTTGTACG CGAATCTGCG TCATCTT AGT GAGCTTAGG ACCCCTAGGC AGCACACACT 640
 641 CTGTGCGCTT CGATTGTGAC CCTCACTCTC AAGGGGGAAT ACCCGCTGAG TTTAAGCAT ↑ ITS2 720

Figure 4 ITS sequence of Chuanxiong

▲ indicates variable site (T) of ITS1 sequence in Chuanxiong (*Ligusticum chuanxiong*) for “C” in Japanese Chuanxiong (*Cnidium officinale*) . — presents 18S rDNA 3' coding region ; — 5.8S rDNA coding region ; — 26S rDNA 5' coding region . ITS1 region : 55 nt ~ 269 nt , ITS2 region : 432 nt ~ 653 nt

根据排序比较 ,川芎原植物(LC1)与其商品药材(LC2)间的 *matK* 基因和 ITS 基因序列完全相同 ,日本川芎原植物(CO1)与其商品药材(CO2)亦然。而川芎(LC)与日本川芎(CO)间 *matK* 基因则有 1 个变异位点 ,即在上游 959 nt 处 1 个转换替代 T(LC)

→C(CO) ,反映在氨基酸序列则发生 1 个非同义取代 V/GTG(LC) →A/GCG(CO) 。ITS 基因也仅有 1 个变异位点 ,即在 ITS1 上游 54 nt 处 1 个转换替代 T(LC) →C(CO) 。

据 Downie 等^[14]报告 ,取材于美国引种的日本川

芎(CO) ITS1(GenBank- U78388)与本文所测 215 bp 序列完全相同,而 ITS2(GenBank- U78448)比本文所测 222 bp 序列少 1 个碱基,即上游 9 nt 缺失“T”,还有 89 nt, 97 nt, 125 nt 处各发生 1 个碱基替代。而据我们所测蛇床属(*Cnidium*)植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 河北衡水居群 *matK* 基因(GenBank- AB027538)^[15]与本文日本川芎 *matK* 比较,序列长度均同为 1268 bp,但两种间存在 19 个碱基替代。通过对日本川芎 18S rRNA 基因(GenBank- D83028)与我们所测蛇床 18S rRNA 基因(GenBank- AB027243)序列^[16]比较,两种间有 11 个替代位点。说明日本川芎在 *matK* 基因和 18S rRNA 基因序列标记是接近藁本属(*Ligusticum*)植物川芎而远离蛇床属植物蛇床。近藤等^[9]据 *rbcL* 基因序列进行的伞形科分子亲缘关系研究结果同样说明,日本川芎与 3 个藁本属植物川芎、藁本 *L. sinense* Oliv.、辽藁本 *L. jholense* (Nakai et Kitag.) Nakai et Kitag. 聚为一支,亲缘关系较近,而与蛇床属植物日本蛇床 *C. japonicum* Miq. 亲缘关系较远。

宋平顺等^[17]通过本草考证和历史演变研究认为,川芎是由野生藁本 *L. sinense* Oliv. 经长期引种驯化、繁殖而培育出来的优良品种。川芎在许多地区引种生产,出现了按产地取名的川芎栽培品种如西芎(甘肃)、京芎(陕西)、抚芎(江西)、台芎(浙江)、云芎(云南)、广芎(广东)、东芎(吉林)和芎(日本)等,现代孢粉学、细胞学、化学研究结果认为各地川芎均是藁本 *L. sinense* Oliv. 栽培品种^[18],之所以给川芎一个园艺起源的拉丁名称 *Ligusticum chuanxiong* Hort., 完全是基于至今川芎未找到其野生类型,各地所产均为久经栽培的引种品,无法观察到其自然的花和果实形态,难以判断其物种基原及分类学位置这一植物史上极少见的^[19]事实。

由我们所测 3 种基因(包括 2 个核基因组 18S rRNA 基因和 ITS 基因以及 1 个叶绿体 *matK* 基因)表明 DNA 序列标记不失为一种物种鉴别的有效手段。选择进化速率较快的叶绿体 *matK* 基因和核糖体非编码转录区 ITS 基因序列进行的初步分析结果为探讨中日川芎物种的同源关系提供了更多的分子佐证。再结合文献^[9]报道的 *rbcL* 基因序列数据,基本可以认为中日所产川芎基原一致,日本川芎学名似应改为 *Ligusticum chuanxiong* Hort.。

致谢:日本富山医科药科大学药用植物园有泽宗久副教授提供日本川芎植物材料。

REFERENCES:

- [1] Zhao ZZ, Tang XJ. *Practical Handbook of Botanical Name Comparison between China and Japan* (实用中日植物药名称对照手册) [M]. Beijing: China Medical Sciences and Technology Publishing House, 1991. 1 - 11.
- [2] National Committee of Pharmacopoeia. *Pharmacopoeia of People's Republic of China* (中国药典) [M]. 2000 Ed. Vol. I. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2000. 30 - 31.
- [3] Japanese Association of Law Books. *The Japanese Pharmacopoeia* (日本药局方) [M]. 13th Ed. Part II. Tokyo: Daiichi Hongi Press, 1996. 1243 - 1244.
- [4] Drug Administration of Ministry of Health. *Practical Modern Materia Medica* (现代实用本草) [M]. Vol. I. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997. 299 - 303.
- [5] Namba T. *Colored Illustration of Wankan-Yaku* (原色和汉药图鉴) [M]. 2nd Ed. Vol. I. Osaka: Hoikusha, 1995. 37 - 38.
- [6] Zheng CJ, Piao HS. Progress in chemistry and pharmacology of Dongchuanxiong, *Cnidium officinale* Makino. *Wild Plant Resources of China* (中国野生植物资源) [J], 2001, 20(2): 7 - 9.
- [7] Li ZW, Zhang Q. Separation and identification of lactone components in *Ligusticum chuanxiong* Hort. and *Cnidium officinale* Mak. by GC-MS. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) [J], 1993, 13(4): 187 - 215.
- [8] Wan FC, Huang DZ, Liu ZZ. Pharmacological activity comparison among Chuanxiong, Fuxiong, Jinxiong and Dongxiong. *Pharmacol Clinic Chin Mat Med* (中药药理与临床) [J], 1990, 6(5): 34 - 36.
- [9] Kondo K, Terabayashi S, Okada M, et al. Phylogenetic relationship of medicinally important *Cnidium officinale* and Japanese Apiaceae based on *rbcL* sequences. *J Plant Res* [J], 1996, 109(1): 21 - 27.
- [10] 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. *Phytochemistry* [J], 1996, 3(3 - 4): 387 - 389.
- [11] Wolfe KH, Li WH, Sharp PM. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* [J], 1987, 84(5): 9054 - 9060.
- [12] Yokota Y, Kawata T, Iido Y, et al. Nucleotide sequences of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA. *J Mbl Evol* [J], 1989, 29(3): 294 - 301.
- [13] Ooi K, Endo Y, Yokoyama J, et al. Useful primer designs to amplify DNA fragments of the plastid gene *matK* from angiosperm plants. *J Jpn Bot* [J], 1995, 70(4): 328 - 331.
- [14] Downie SR, Ramanath S, Katz-Downie DS, et al. Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoCl* intron sequences. *Am J Bot* [J], 1998, 85(3): 563 - 591.
- [15] Cao H, Cai JN, Liu YP, et al. Correlative analysis between

- geographical distribution and nucleotide sequence of chloroplast *matK* gene of *Cnidium monnieri* fruit in China. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志) [J], 2001, **36**(6) :373 - 376.
- [16] Cao H, Cai JN, Liu YP, *et al.* Molecular authentication of Shechuangzi (fruit of *Cnidium monnieri* (L.) Cuss.) from different geographical origins in China. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query?bd=GenBank> [J/OL], 1999-05-14.
- [17] Song PS, Ma X, Zhang BC, *et al.* Textual study and historical evolution on Xiongqiong (Chuanxiong). *China J Chin Mat Med* (中国药理学杂志) [J], 2000, **25**(10) :434 - 436, 446.
- [18] Pu FT. A revision of the genus *Ligusticum* (Umbelliferae) in China. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报) [J], 1991, **29**(4) :385 - 393, **29**(6) :530 - 539.
- [19] Qiu SH, Zeng YQ, Pan KY, *et al.* On the nomenclature of the Chinese plant drug Chuanxiong. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报) [J], 1979, **17**(2) :101 - 103.

***matK* AND ITS NUCLEOTIDE SEQUENCING OF CRUDE DRUG CHUANXIONG AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIP BETWEEN THEIR SPECIES FROM CHINA AND JAPAN**

LIU Yu-ping¹, CAO Hui², HAN Gui-ru³, FUSHIMI H⁴, KOMATSU K⁴

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai 519020, China; 3. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 4. Research Center for Ethnomedicines, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930 - 0194, Toyama Prefecture, Japan)

ABSTRACT: **AIM** To provide more molecular evidences for species relationship between Chuanxiong (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) from China and Japanese Chuanxiong (Senkyu in Japanese) (*Cnidium officinale* Makino). **METHODS** To sequence such two genes as internal transcribed spacer (ITS) from nuclear rDNA and maturase for lysine (*matK*) in tRNA^{lys} (UUU) intron from chloroplast DNA of both *Ligusticum chuanxiong* and *Cnidium officinale* using PCR direct sequencing and to analyze the sequence variation of two genes between these two species. **RESULTS** The *matK* gene sequence of *Ligusticum chuanxiong* and *Cnidium officinale* is 1268 bp in length, coding 422 amino acids of maturase protein. ITS gene sequence 699 bp, consisting of 54 bp of 18S rRNA^{3'}, 215 bp of ITS1, 162 bp of 5.8S rRNA, 222 bp of ITS2, 46 bp of 26S rRNA^{5'}. Multiple sequence alignment shows that the sequence of two genes between dried crude drug and fresh voucher material of *Ligusticum chuanxiong* and *Cnidium officinale*, there is 1 variable site (T→C) in *matK* (upstream at 595 nt) and ITS (ITS1 at 54 nt) between *Ligusticum chuanxiong* and *Cnidium officinale*. **CONCLUSION** Based on homology analysis of two genes plastid *matK* and nuclear ITS, the origin of Chuanxiong from China and Japan ought to be identical, the scientific name *Cnidium officinale* of Japanese Chuanxiong should be changed to *Ligusticum chuanxiong*.

KEY WORDS: *Ligusticum chuanxiong* Hort; *Cnidium officinale* Makino; *matK* gene; ITS gene; nucleotide sequencing