

## 羌活(*Notopterygium incisum*) nrDNAITS 和 cpDNA rpl20-rps12 序列分子进化特点的分析

杨路存<sup>1 2</sup> 刘何春<sup>1 3</sup> 周学丽<sup>4</sup> 徐文华<sup>1 2</sup> 周国英<sup>1 2\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 810008; 2. 中国科学院藏药研究重点实验室, 西宁 810008; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 青海省铁卜加草原改良试验站, 西宁 810008)

**摘要** 应用 PCR 产物直接测序法分析了羌活居群间 nrDNA(核糖体 DNA) ITS 序列和 cpDNA(叶绿体 DNA) rpl20-rps12 的碱基差异, 从而初步研究两套植物基因组的变异速率。采用改良的 CTAB 法从硅胶干燥的羌活叶片中提取总 DNA, 并对 nrDNA ITS 和 cpDNA rpl20-rps12 区域进行扩增、纯化、测序。nrDNAITS 序列共有 635 bp, 有变异位点 17 处, 变异位点百分率为 2.68% (G+C) 含量为 57.83%。cpDNA rpl20-rps12 序列共有 767 bp, 有变异位点 35 处, 变异位点百分率 4.56% (G+C) 含量为 33.06%。比较发现, 羌活 nrDNAITS 区域较 cpDNA rpl20-rps12 序列保守, 变异速率较慢。通过对 ITS 和 rpl20-rps12 序列单倍型(haplotype)进行分析发现, 两者得出的结论一致, 即现有分布范围经历了居群近期范围扩张。因此, 羌活 nrDNA ITS 序列适合该种的谱系地理学研究。

**关键词** 羌活; ITS 序列; rpl20-rps12 序列

中图分类号: Q949.763.3 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2016.02.019

## Characteristic of Molecular Evolution of *Notopterygium incisum* Based on nrDNAITS and cpDNA rpl20-rps12 Sequence Analysis

YANG Lu-Cun<sup>1 2</sup> LIU He-Chun<sup>1 3</sup> ZHOU Xue-Li<sup>4</sup> XU Wen-Hua<sup>1 2</sup> ZHOU Guo-Ying<sup>1 2\*</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; 2. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 4. Tiebujia Grassland Improvement Experiment Station, Xining 810008)

**Abstract** We analyzed the differences between the nrDNAITS and cpDNA rpl20-rps12 sequences in *Notopterygium incisum* by PCR direct sequencing. Total DNA was extracted from silica-dried leaves of *N. incisum* using modified CTAB method. With the extracted DNA as template, nrDNA ITS and cpDNA rpl20-rps12 regions were amplified, then purified and sequenced. The length of nrDNA ITS sequence of *N. incisum* was 635 bp, of which 17 were variable sites with a percentage of 2.68%, the (G+C) content was 57.83%. The length of cpDNA rpl20-rps12 sequence of *N. incisum* was 767 bp, of which 35 was variable site with a percentage of 4.56%, the (G+C) content was 33.06%. The nrDNAITS region of *N. incisum* was more conserved and evolved more slowly than the cpDNA rpl20-rps12 sequence. The present distribution range of *N. incisum* experienced range expansion by the haplotype analysis of this species, which consisted with the conclusion resulting from cpDNA genome. Therefore, the nrDNA ITS sequence of rpl20-rps12 was fit to the phylogeographic study of this species.

**Key words** *Notopterygium incisum*; ITS sequence; rpl20-rps12 sequence

羌活(*Notopterygium incisum*) 隶属于伞形科(Umbelliferae) 羌活属(*Notopterygium*) , 是中国的特有种<sup>[1~2]</sup>。主要分布在青海、甘肃、四川<sup>[3]</sup>。生

于海拔 2 500 ~ 3 500 m 的高山灌木林、亚高山灌丛、草丛及高山林缘地上。羌活与同属的宽叶羌活(*N. forbesii*) 同为药材羌活的基源植物, 以根茎

基金项目: 青海省青年基金项目(珍稀濒危药用植物羌活的濒危机制研究[2013-Z-942Q])

第一作者简介: 杨路存(1981—) 女, 博士, 助理研究员, 主要从事药用植物分子生态学研究。

\* 通信作者: E-mail: zhougy@nwipb.cas.cn

收稿日期: 2015-06-30

及根入药<sup>[4]</sup> ,是中、藏、羌医药体系中常用药材 ,主要含挥发油和香豆素类成分。具有散寒、祛风、除湿、止痛功效 ,主治风寒感冒头痛、风湿痹痛等症 ,现代药理研究表明对心脑血管疾病也有确切疗效<sup>[5]</sup>。目前 ,用羌活的中(藏)成药有 200 余种 ,用药需求量非常大 ,长期仅靠野生采集满足国内外市场需求 ,以致资源已濒临灭绝 ,1987 年即被国务院《中国野生药材资源保护管理条例》列为Ⅲ级保护物种 ,2005 年又载入《中国物种红色名录》<sup>[6]</sup>。目前 ,羌活植物化学<sup>[7~8]</sup>、药理<sup>[9]</sup>、地理分布<sup>[3,10]</sup>、分类学<sup>[1~2]</sup>、环境土壤学<sup>[11]</sup>和驯化栽培<sup>[12~13]</sup>等方面的研究比较多 ,对其 nrDNA ITS 序列和 cpDNA rpl20-rps12 序列的研究尚属首次。

随着分子生物学技术的快速发展 ,用于分子系统学和谱系地理学研究的分子标记从 RFLP、RAPD、SSR 和 ISSR 过渡到核糖体 DNA (nrDNA) 的 18S 基因及 ITS 等非编码区 ,以及叶绿体 DNA 的编码基因及非编码区序列和部分线粒体 DNA (mtDNA) 的基因片段。目前应用最广泛的核基因组是 nrDNAITS 序列 ,它是核糖体 DNA 中介于 18S 和 5.8S 之间(ITS1) 以及 5.8S 和 26S 之间(ITS2) 的非编码转录间隔区 ,具有较高的重组率 ,成为植物谱系地理学(Phylogeography) 研究和探讨科内属间及属下种间关系中最有效的手段之一<sup>[14~15]</sup>。叶绿体 DNA (cpDNA) 多数具有单亲遗传的特性 ,

在遗传过程中不易发生重组 ,并且没有基因的重叠、缺失或假基因的现象 ,拥有独立的进化路线 ,不依赖其他数据 ,可以通过自身数据构建分子系统来推测物种的进化历史<sup>[16~17]</sup>。而 rpl20-rps12 属于叶绿体非编码区域 ,有较高的突变频率 ,且这些突变不受自然选择等其他因素的影响 ,属于中性突变 ,可以保留经长期的变迁的植物的遗传结构(如过去的迁移路线、建群的原动力等) ,经过长年累月的变化可以提供丰富的信息 ,是植物系统地理学研究的首选分子标记<sup>[18]</sup>。本文分析了羌活 12 个居群 ,116 个个体的 nrDNAITS 和 cpDNA rpl20-rps12 序列区域 ,研究该种 nrDNAITS 和 cpDNA rpl20-rps12 序列的分子特点和变异情况 ,并从这两个序列初步确定该种形成现有分布范围的成因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

用于本实验的 12 个居群为 2014 年 6~9 月份分别采自青海、四川和甘肃 3 省区 ,基本包括了我国羌活主要产区。采样时每个居群选取成年植株 6~15 株 ,根据随机取样原则 ,取样的羌活株距在 50 m 以上。野外采集新鲜、完整的植物幼嫩叶片 ,置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存。采样编号及地点见表 1。

表 1 12 个羌活居群的采样表

Table 1 Material source of the 12 *N. incisum* populations

居群编号 Code	居群 Populations	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Alt. (m)	样本数 Number	nrDNAITS 序列(单倍型)	cpDNA rpl20-rps12 序列(单倍型)
Q1	青海门源 Menyuan ,Qinghai	37°22.352'	102°0.819'	3216	10	H1(9) ,H7(1)	H1(10)
Q2	青海河南 Henan ,Qinghai	34°35.958'	101°16.862'	3525	9	H1(8) ,H10(1)	H1(8) ,H9(1)
Q3	青海久治 Jiuzhi ,Qinghai	33°22.069'	101°19.120'	4013	10	H3(3) ,H6(2) ,H8(1) ,H11(1) ,H13(3)	H1(10)
Q4	青海囊谦 Nangqian ,Qinghai	32°15.517'	96°55.072'	3668	8	H2(1) ,H3(7)	H1(8)
G1	甘肃山丹 Shandan ,Gansu	34°37.371'	101°26.413'	2765	10	H1(9) ,H9(1)	H1(10)
G2	甘肃榆中 Yuzhong ,Gansu	35°43.819'	104°1.817'	2958	10	H1(10)	H1(10) ,H7(1)
G3	甘肃卓尼 Zhuoni ,Gansu	34°35.910'	103°5.052'	3025	6	H1(6)	H1(1) ,H2(2) ,H6(1) ,H9(1) ,H10(1)
G4	甘肃碌曲 Luqu ,Gansu	34°32.617'	102°31.825'	3683	8	H1(8)	H1(4) ,H3(3) ,H6(1)
S1	四川阿坝 Aba ,Sichuan	32°55.346'	101°34.190'	3493	8	H3(2) ,H8(2) ,H12(1) ,H13(2) ,H15(1)	H1(6) ,H4(2)
S2	四川炉霍 Luhuo ,Sichuan	31°36.030'	100°42.474'	3445	9	H1(2) ,H3(1) ,H13(2) ,H14(4)	H1(8) ,H6(1)
S3	四川金川 Jinchuan ,Sichuan	31°27.889'	101°47.973'	3808	15	H3(14) ,H5(1)	H1(13) ,H6(2)
S4	四川甘孜 Ganzi ,Sichuan	31°31.170'	99°58.579'	3886	13	H1(2) ,H3(8) ,H4(1) ,H14(2)	H3(3) ,H6(2) ,H7(1) ,H8(1) , H9(4) ,H11(1) ,H12(1)
合计 Total					116		

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测

依据改良的 CTAB 法从硅胶干燥的叶片中提取总 DNA。通过测定紫外光吸收值来确定 DNA 浓度和纯度。利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。

### 1.2.2 PCR 扩增与 DNA 测序

采用通用引物“ITS1”(5'-AGAAGTCGTAA-CAAGGTTTCCGTAGG-3')和“ITS4”(5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3');“rpl20”(5'-TTTGTTT-TACGTCTCCGAGC-3')和“rps12”(5'-GTCCAG-GAACATGTAAGTACTAGG-3')分别扩增 nrDNA ITS 序列和 cpDNA rpl20-rps12 序列。扩增反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行,反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 内含 25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  2  $\mu\text{L}$ 、2.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 2  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物各 0.6  $\mu\text{L}$ 、25 ng 模板、10  $\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$  和 1U Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)。nrDNA ITS 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 35 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 0.5 min, 51 $^{\circ}\text{C}$  退火 0.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 0.5 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。cpDNA rpl20-rps12 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 35 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 0.5 min, 52 $^{\circ}\text{C}$  退火 0.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 0.5 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

将 PCR 扩增产物经电泳检测纯化后由上海美

吉生物医药科技有限公司测序。

### 1.3 数据处理

序列对位排列用 ClustalX 软件自动完成后<sup>[19]</sup>,并手工适当校正。用 DnaSP 软件统计变异位点<sup>[20]</sup>,单倍型(haplotype)类型和变异位点百分率,以及核苷酸多样性,并将 nrDNAITS、和 cpDNA rpl20-rps12 序列进行比较。Tajima's D 和 Fu's Fs 两种无限突变位点模型的中性检验方法及歧点分布(Mismatch distribution)分析也在 DnaSP 程序中完成,来检验羌活居群间是否经历了近期居群范围扩张。用 MEGA4.1 软件进行核苷酸组成分析,采用 Kimura-2-Parameter distance 双参数模型(Kimura, 1980)计算遗传距离,并用邻接(Neighbour-Joining, NJ)法构建系统树,通过 1 000 次重复获得的自展检验(bootstrap)数值标记在分支上<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 nrDNA ITS 和 cpDNA rpl20-rps12 目的片段的扩增

PCR 扩增体系对不同居群羌活 nrDNAITS 和 cpDNA rpl20-rps12 片段进行扩增,得到单一片段条带,电泳显示条带非常清晰,没有拖带和非特异条带(图 1)。

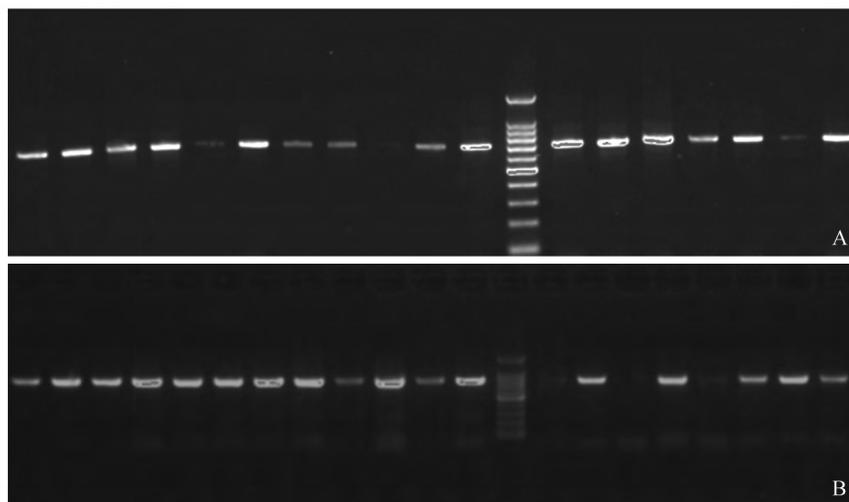


图 1 nrDNAITS 区域(A)和 cpDNA rpl20-rps12 区域(B) PCR 扩增电泳结果

Fig. 1 The results of PCR amplification on ITS(A) and cpDNA rpl20-rps12(B) region

### 2.2 羌活各居群间 nrDNA ITS 和 cpDNA rpl20-rps12 序列及分析

对羌活 116 个个体 nrDNA ITS 区域进行测序,并用 ClustalX 进行对位排列。经对位排列,获得

我国主要羌活产地 12 个居群的 ITS 序列,碱基长度均为 635 bp。合并相同的序列共得到 15 个单倍型(haplotype, H),其中 H1 是分布最广的单倍型(分布于 Q1, Q2, G1, G2, G3, G4, S2, S4 居群中),

其次是 H3 ( 分布于 Q3 ,Q4 ,S1 ,S2 ,S3 ,S4 居群中) ,H13 和 H14 分别为 Q9 ,S3 ,S5 居群和 S5 ,S8 居群所共享 ,H8 为 Q9 ,S3 居群所共享 ,其它特有的单倍型( H2 ,H4 ,H5 ,H7 ,H8 ,H9 ,H10 ,H11 ,H12 ,H15) 分布到各自相应的居群中。羌活的 cpDNA rpl20-rps12 序列 ,碱基长度 767 bp。合并相同的序列共得到 12 个单倍型 ,其中单倍型 H1 是分布最广的单倍型 ,它分布于全部 12 个居群中 ,其次是单倍型 H6 和 H9 ,分别被 5 个和 4 个居群所共享 ,其它特有的单倍型( H2 ,H3 ,H4 ,H5 ,H7 ,H8 ,H10 ,H11 ,H12) 分布到各自相应的居群中。

羌活 nrDNA ITS 序列的 ( G + C) 含量为 57.83% ,变异位点百分率为 2.68%。在 635 bp 的碱基序列中 ,有 17 处变异位点 ,其中 1 处为插入/缺失( 位于 26 bp 位点处 ,表 2) ,16 处为碱基置换。羌活 nrDNA ITS 序列( G + C) 含量( 57.83%) 明显高于 rpl20-rps12 序列的( G + C) 含量( 33.06%) 。cpDNA rpl20-rps12 序列变异位点百分率为 4.56% ,而 nrDNA ITS 序列变异位点百分率是 2.68% ,cpDNA rpl20-rps12 序列变异位点百分率远大于 nrDNA ITS 序列的变异位点百分率( 表 3)。

cpDNA rpl20-rps12 的核苷酸多样性也远大于 nrDNA ITS 序列的核苷酸多样性。

表 2 羌活 ITS 片段 15 种单倍型进行序列比对的变异位点  
Table 2 Variable sites of the aligned sequences among 15 haplotypes of the ITS fragment of *N. incisum*

单倍型 Haplotype	Variable sites																
	1	2	6	1	1	2	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	
	3	6	6	0	9	0	0	2	2	5	6	6	9	1	1	2	2
				8	9	7	2	3	4	6	7	8	7	3	8	8	9
H1	G	G	G	G	G	T	A	A	A	G	G	T	A	C	G	C	G
H2	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H3	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
H4	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H5	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T
H6	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H7	.	.	.	.	A	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H8	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H9	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H10	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H11	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	C	T	T	T	T	T
H12	.	-	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H13	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H14	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H15	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

表 3 羌活 cpDNA rpl20-rps12 片段 12 种单倍型进行序列比对的变异位点

Table 3 Variable sites of the aligned sequences among 12 haplotypes of the cpDNA rpl20-rps12 fragment of *N. incisum*

单倍型 Haplotype	Variable sites																																				
	3	3	5	8	1	1	4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7					
	4	5	8	3	7	8	7	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	8	9	9	0	0	0	1	2	2	2	2	2	3	5	6		
					4	0	0	3	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	7	0	8	3	8	9	4	0	1	2	4	9	1	1	4		
H1	A	G	T	A	T	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	-	T	A	T	G	-	A	-	-	C	T	-	T	G	A		
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H3	.	.	.	.	G	T	.	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	-	.	.	.	.	-	.	C	T	T	C	-	.	.	.		
H4	.	.	.	.	G	T	.	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	-	.	.	.	.	-	G	C	T	T	C	-	.	.	.		
H5	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	G	G	.	-	.	-	-	.	.
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	.	.	-	.	-	-	.	.
H7	T	-	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	G	.	A	.	-	.	T	-	.	.	-	A	.	.	
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	.	A	-	.	-	-	.	.	T	.	A	.	
H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	T	-	.	.	.
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	.	.	-	.	T	-	.	.	-	.	.	.	
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	.	A	-	.	-	-	.	.	-	.	.	C	
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	.	.	.	.	G	-	-	.	.	-	.	.	.	.	

运用 MEGA 软件对羌活 nrDNAITS 序列和 cpDNA rpl20-rps12 所得单倍型进行系统发育树重建。由图 2 可知 ,由 nrDNAITS 序列构建的 NJ 树分为四支 ,H2、H3、H4、H5、H15 聚为一支 ,H1、H6、H7、H8、H11、H12、H13、H14、H15 聚为一支 ,H10 为一支 ,H9 为另一支。由图 3 可知 ,cpDNA rpl20-rps12 序列构建的 NJ 树分为两支 ,H1、H2、H3、H4、H5、H9 聚为一支 ,H6、H7、H8、H10、H11、H12

聚为一支。

采用 nrDNA ITS 和 cpDNA rpl20-rps12 序列对羌活的野生种群进行种群历史变动分析 ,采用单倍型错配分布、无限突变位点模型的中性检验值 Tajima's D 和 Fu's Fs 等方法同时调查羌活的种群历史变动错配分布。分析结果显示 ,羌活种群单倍型和碱基差异呈明显的单峰分布( 图 4) ,较为保守的 Tajima's D( nrDNA ITS: -1.447 04 ,P <

0.05; cpDNA rpl20-rps12: -2.102 63,  $P < 0.05$ ) 显著偏离中性平衡, Fu and Li's  $D^*$  (nrDNA ITS: -4.260 68,  $P < 0.02$ ; cpDNA rpl20-rps12: -3.518 20,  $P < 0.02$ ) 和 Fu and Li's  $F^*$  (nrDNA ITS: -3.84182,  $P < 0.02$ ; cpDNA rpl20-rps12: -3.567 84,  $P < 0.02$ ) 均为显著的负值, 支持羌活种群经历了种群选择或扩张事件。

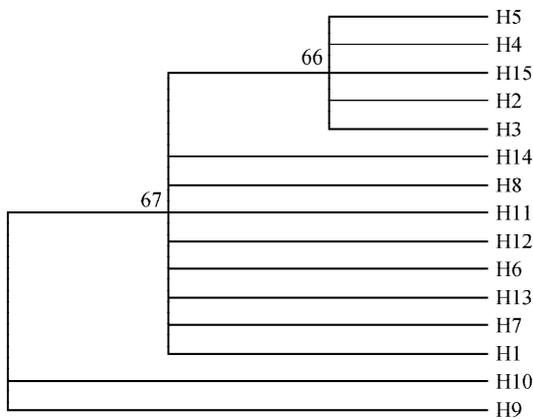


图 2 基于 ITS 序列的 15 种单倍型的 NJ 树

Fig. 2 NJ tree based on the 15 haplotypes of ITS sequences

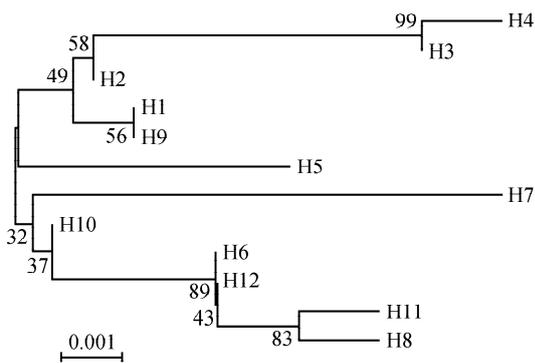


图 3 基于 cpDNA rpl20-rps12 序列的 12 种单倍型的 NJ 树

Fig. 3 NJ tree based on the 12 haplotypes of cpDNA rpl20-rps12 sequences

表 4 羌活 nrDNA ITS 和 cpDNA rpl20-rps12 序列的比较  
Table 4 Comparisons between nrDNA ITS and cpDNA rpl20-rps12 sequences for *N. incisum*

序列名称 Name of sequence	长度 Length (bp)	变异位点百分率 Percentage of variable sites (%)	(G+C) 含量 (G+C) content (%)
nrDNA ITS	635	2.68	57.83
cpDNA rpl20-rps12	767	4.56	33.06

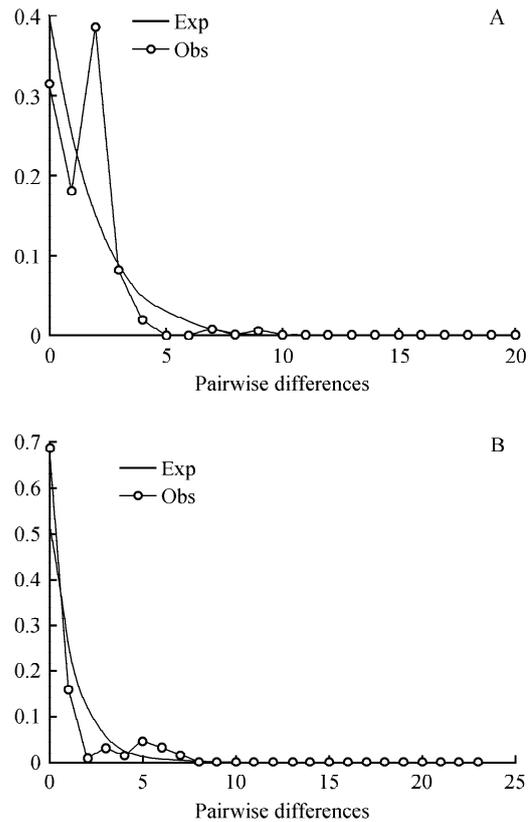


图 4 羌活所有个体 nrDNAITS 基因间区序列数据 (A) 以及 cpDNA rpl20-rps12 基因间区序列数据的歧点分布 (B)

Fig. 4 Mismatch distribution for sequences data of nrDNA ITS (A) and cpDNA rpl20-rps12 intergenic spacer (B) from all individuals of *N. incisum*

### 3 讨论

一般而言, 在大多数的被子植物中由于叶绿体 DNA 是母性遗传、非重组的并且由于进化速度比较慢<sup>[22]</sup>, 因此常被用来研究群体遗传学和系统地理学中的遗传瓶颈和奠基者效应, 并且用于测量遗传漂变<sup>[16]</sup>。而核 DNA (nDNA) 的进化较快, 可用于解决属下不同种和种内的系统发育和分类问题, 并且可解决由于叶绿体变异的水平太低而不能阐明居群的关系的问题<sup>[23]</sup>。因此, 在植物谱系地理学的研究中采用叶绿体和核基因组联合分析来彻底的阐明调查物种的遗传结构。

本研究中, 应用 PCR 产物直接测序法分析了羌活居群间 nrDNA (核糖体 DNA) ITS 序列和 cpDNA (叶绿体 DNA) rpl20-rps12 的碱基差异, 初步确定了两套植物基因组的变异速率, 即羌活 nrD-

NA ITS 序列较 cpDNA rpl20-rps12 序列保守,变异速率较慢,这与上面的研究结果不一致,但与段义忠等<sup>[24]</sup>对窄叶鲜卑花的研究结果一致。

nrDNA ITS 序列共发现 15 个单倍型,其中 H1 是分布最广的单倍型,分布于 12 个居群中的 8 个居群中,且青藏高原东南部边缘的居群遗传多样性较高。这与叶绿体 rpl20-rps12 序列单倍型所得出的结果较相近。nrDNA ITS 和 cpDNA rpl20-rps12 序列所得到的两种中性检验值均为负值(nrDNA ITS:  $-1.44704$ ,  $P < 0.05$ ; cpDNA rpl20-rps12:  $-2.10263$ ,  $P < 0.05$ ),羌活 nrDNA ITS 和 cpDNA rpl20-rps12 基因区间序列数据的歧点分布(mismatch distribution)分析结果表明,观测值与期望值之间比较,得到了一个明显的单峰分布曲线图,表明羌活居群可能经历过居群近期范围扩张。虽然 nrDNA ITS 序列变异位点较少,但其反应的居群间的进化关系与叶绿体基因组一致,nrDNA ITS 序列可以推测出羌活居群扩张的大致时间,因此 nrDNAITS 序列适合羌活以居群进化历史为主要目的的谱系地理学研究。

### 参 考 文 献

1. 溥发鼎,王萍莉,郝中华,等.重订羌活属的分类[J].植物分类学报,2000,38(5):430-436.
2. 王幼平,溥发鼎,王萍莉,等.中国特有属——羌活属的系统分类研究[J].云南植物研究,1996,18(4):424.
3. 周毅,蒋舜媛,马小军,等.羌活资源危机和保护[J].中草药,2003,34(10):12.
4. 中华人民共和国国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[M].北京:化学工业出版社,2010:170-171.
5. 徐惠波,孙晓波.羌活挥发油的药理作用研究[J].中草药,1991,22(1):28-30.
6. 汪松,解焱.中国物种红色名录:第1卷[M].北京:高等教育出版社,2004:8507.
7. 刘卫根,王亮生,徐文华,等.不同商品等级羌活中有机酸和香豆素类化合物的测定[J].中成药,2012,34(011):2181-2186.
8. 刘卫根,王亮生,周国英,等.羌活不同部位有机酸和香豆素类化合物含量的比较研究[J].药物分析杂志,2012,32(011):1950-1956.
9. 张明发,沈雅琴.羌活药理学研究[J].药学服务,2008(5):28-30.
10. 马玉林,李建民,马莉,等.药用植物羌活的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(24):13092-13093.
11. 蒋舜媛,孙辉,黄雪菊,等.羌活和宽叶羌活的环境土壤学研究[J].中草药,2005,36(6):917-921.
12. 董生健.野生羌活驯化栽培技术[J].中药材,2010(1):38-39.
13. 方子森,陈小莉,张恩和.野生羌活的生态环境与驯化栽培[J].中草药,2004,35(9):1071-1073.
14. 赵一之,成文连,尹俊,等.用 rDNA 的 ITS 序列探讨绵刺属的系统位置[J].植物研究,2003,23(4):402-406.
15. Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The Its Region of Nuclear Ribosomal DNA—a Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny [J]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1995, 82(2): 247-277.
16. Petit R J, Pineau E, Demesure B, et al. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 94(18): 9996-10001.
17. Fujii N, Ueda K, Watano Y, et al. Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Pedicularis chamissonis* Steven (Scrophulariaceae) and geographic structuring of the Japanese “Alpine” plants [J]. Journal of Plant Research, 1997, 110(1098): 195-207.
18. Gao Q B, Zhang D J, Duan Y Z, et al. Intraspecific divergences of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) based on plastid DNA and internal transcribed spacer fragments [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2009, 168(2): 204-215.
19. Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analyses tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4876-4882.
20. Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
21. Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
22. Reboud X, Zeyl C. Organelle Inheritance in Plants [J]. Heredity, 1994, 72: 132-140.
23. Wolfe K, Li W, Sharp P. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987, 84: 9054-9058.
24. 段义忠,张得钧,高庆波,等.窄叶鲜卑花(*Sibiraea angustata*) nrDNAITS 和 cpDNAtrnL-F 序列分子进化特点的分析[J].植物研究,2010,30(2):146-151.