



分子生药学



第3章 药用植物分子系统学



3.1

分子系统学概述

3.2

药用植物分子系统学的应用与展望



3.1 分子系统学概述



生物系统学是致力于推断生物类群间的系统发育关系，并且说明现存生物多样性产生的一门学科。

植物系统学 (Plantsystematics)

是对植物的多样性和分化以及它们之间的各种关系进行研究的科学。是涉及形态学、解剖学、孢粉学、胚胎学、细胞学等学科的一门综合性学科。

植物分类学 (Planttaxonomy) 是系统植物学中涉及到分类研究的部分。

植物系统学和植物分类学在很多情况下可以互换使用的。



3.1 分子系统学概述



分子系统学 (Molecular systematics)

在分子水平对生物进行系统学研究的学科，它充分利用丰富的生物大分子数据，借助统计学丰富进行生物体间以及基因间进化关系的研究。

系统发生学 (Phylogenetics)

即分子系统发育学，是利用生物大分子的信息来确定不同生物在进化过程中的地位、分歧时间以及亲缘关系，建立分子系统树，或者推断生物大分子进化历史的一门科学。

群体遗传学 (Population genetics)

以种群 (population) 为单位研究群体内遗传结构及其变化规律的科学。



3.1 分子系统学概述



植物分子系统学

分子生物学和植物系统学交叉形成的一门学科，它利用分子生物学的各种实验手段，获取各类分子性状，以探讨植物的分类，类群之间的系统发育关系，以及进化的过程和机制。

药用植物分子系统学



3.1 分子系统学概述



生物系统分类技术的进展历程

1.1 大形态时期（公元前400年至公元1700年）：术语描述期

根据易于识别的宏观形态特征来鉴别生物，使生物有一定的名称。

1.2 小形态时期（公元1700-1860年）

新的形态学，如解剖学、胚胎学的建立和发展时期。

1.3 进化论时期（公元1860-1900年）

以进化论为指导，在系统发育的基础上创立分类系统。

1.4 细胞遗传学时期（公元1900-1960年）：实验生物学时期

进入细胞水平的研究，改写系统分类。细胞生物学和植物系统学结合产生植物细胞分类学，在染色体水平上更好地理解植物的分类与进化，特别是物种分化问题。

1.5 分子生物学时期（1970-至今）

分子生物学的迅速发展，给生物系统分类以巨大的推动。利用DNA信息来探讨植物系统学，形成了植物学研究的一个新的热点-植物分子系统学。





什么是遗传标记 (Genetic Marker) ?

遗传标记指可追踪染色体、染色体某一节段、某个基因座在家系中传递的任何一种遗传特性。它具有两个基本特征，即可遗传性和可识别性，因此生物的任何有差异表型的基因突变型均可作为遗传标记。

遗传标记的类型主要有四大类：

1. 形态标记 (morphological marker)
2. 细胞学标记 (cytological marker)
3. 生化标记 (biochemical marker)
4. 分子标记 (molecular marker)





形态学标记

主要包括肉眼可见的外部形态特征，如：矮秆、紫鞘、卷叶等；也包括色素、生理特性、生殖特性、抗病虫害等有关的一些特性。

优点：形态学标记简单直观、经济方便。

缺点：(1)数量在多数植物中是很有限的；(2)多态性较差，表现易受环境影响；(3)有一些标记与不良性状连锁；(4)形态标记的获得需要通过诱变、分离纯合的过程，周期较长。





细胞学标记

植物细胞染色体的变异：包括染色体核型（染色体数目、结构、随体有无、着丝粒位置等）和带型（C带、N带、G带等）的变化。

优点：能进行一些重要基因的染色体或染色体区域定位。

缺点：(1) 材料需要花费较大的人力和较长时间来培育，难度很大。

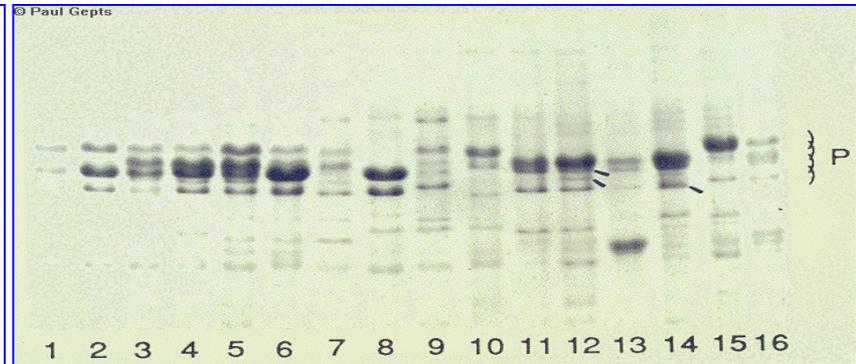
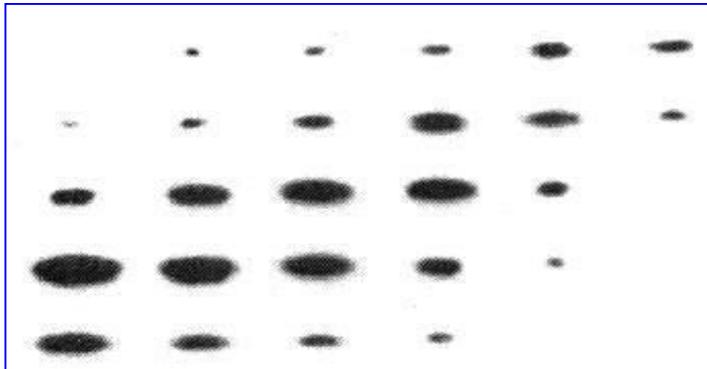
(2) 有些变异难以用细胞学方法进行检测。





生化标记 (Biochemical Marker)

- 概念：主要包括贮藏蛋白、同工酶等标记，也指以基因表达的蛋白质产物为主的一类遗传标记系统。
- 种类：可分为酶蛋白质和非酶蛋白质两类。在非酶蛋白质中用得最多的是种子贮藏蛋白（清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白）。
- 同工酶 (isoenzymes)：催化功能相同，但结构和生理性质不同的一类酶。
- 生化标记的优点：数量更丰富，受环境影响更小。
- 生化标记的缺点：蛋白质受生物体发育的时空影响很大。





分子标记来源于DNA水平的突变

- 突变 (Mutation): 是指DNA水平的可遗传的变异，不管这种DNA变异能不能导致可检测的表型或生化改变。突变产生的变异是自然选择的基础。可遗传的突变在群体中扩散从而产生多态性。
- 多态性 (Polymorphism): 一群体内同一DNA序列的两种或多种变异形式，统计表明：群体内任何两个生物个体平均每1000~10000个碱基对有一对有差别，这种差别就是多态性。



3.1 分子系统学概述



传统药用植物系统学基于来自形态、显微解剖、理化等表型特征，然而这些特征多易受环境和一些主观因素的影响，具有一定的不可靠性，尤其是某些数量性状，会随着环境的改变而发生改变。

DNA作为植物的遗传物质，它具有稳定、可靠和不受环境影响的特点。近半个世纪以来，分子生物学发展异常迅速，新技术和新方法不断涌现，使药用植物系统学的研究不再拘泥于表型特征，同时结合DNA序列的多态性，使其更多地应用在药用植物系统演化关系研究上。



3.1 分子系统学概述



药用植物分子系统学的内涵与任务

研究基于分子性状对药用植物进行分类，同时研究药用植物类群之间的系统发育关系以及如何进化。

探索药用植物类群之间的亲缘关系，鉴定药用植物，为探索化学成分、疗效、药性等药用植物特征的提供可靠的遗传参照，为保护和开发利用新药源提供坚实的理论基础。



3.1 分子系统学概述



药用植物分子系统学的四个时期：

20世纪50 - 60年代，蛋白质水平

20世纪70年代，核酸水平

20世纪80年代，多聚链式反应（PCR）和Southern
杂交

近10年来，DNA条形码（DNA barcoding）技术



3.1 分子系统学概述



推动药用植物分子系统学发展的主要因素：

- 1.分子生物学方法的不断改进；
- 2.基因组的全序列测定；
- 3.用于分子系统学研究的基因种类不断增加，对这些基因进化规律的认识不断深入；
- 4.化石DNA的研究



3.1 分子系统学概述



分子系统学研究中常用基因种类
叶绿体基因组: *rbc L*; *mat K*; *rps4*

Chase等在1993年发表论文，基于*rbc L*基因序列对499种种子植物进行系统发育重建，构建的分支图为将来利用分子或非分子性状进行系统发育研究提供了一个十分有用的框架，是系统学研究的一块里程碑。

Kellogg与Juliano利用499种种子植物的*rbc L*基因序列直接推导出相应的蛋白质序列，通过对499种蛋白质序列的比较发现：*rbc L*基因编码的476个氨基酸中，105（22%）个氨基酸是绝对保守的，另外110个氨基酸分别在个别种中有变异，进而估计出*rbc L*基因中潜在变异位点的数目稍高于1000，而不是1428。

此外，还指出：*rbc L*分子的不同位置的碱基替代率可能会有很大的差异，氨基酸限于功能上的束缚以及密码子不同位置变异的偏差会极大地增强平行演化事件的可能性，*rbc L*基因上的一些变异可能是适应性的。



3.1 分子系统学概述



分子系统学研究中常用基因种类

叶绿体基因组: *rbcL*; *matK*; *rps4*

matK 位于 *trnK* 基因的内含子中，长约1500bp，编码一种成熟酶，参与RNA转录体中II型内含子的剪切。*matK* 是叶绿体基因组蛋白编码基因中进化速率最快的基因之一，具有重要的系统学价值，一般用于科内、属内、甚至种间关系的研究。

rps4 是一个较保守的叶绿体基因，长约600bp。Nadot等通过对禾本科植物、其它单子叶和双子叶植物的 *rps4* 基因进行序列分析，构建系统树，结果发现 *rps4* 基因树和 *rbcL* 基因树是一致的，是系统学研究中很好的工具。



3.1 分子系统学概述



分子系统学研究中常用基因种类

核基因组 : 18S rRNA基因; 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS)

18S rRNA基因

很多研究表明18S rRNA核基因序列构建的系统树与用叶绿体基因组中23S rRNA基因序列构建的系统树相吻合, 但是也对一些植物的系统学研究提出新的结果。例如, Buchheim用18S rRNA基因序列对藻类植物进行了系统学研究, 发现两种衣藻属植物*Chlamydomonas moewusii*和*Chlamydomonas reinhardtii* 18S rRNA基因序列的分化程度很高 (相当于大豆属*Glycine*和美洲苏铁属*Zamia*间的差别), 因此认为衣藻属是否为一个单系群提出质疑。



3.1 分子系统学概述



分子系统学研究中常用基因种类

核基因组 : 18S rRNA基因; 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS)

内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS)

ITS区位于18S和26S rRNA基因之间, 被5.8S rRNA基因分为两段, 即ITS-1和ITS-2。ITS区在裸子植物中的变异十分复杂, 不同种间的ITS-1区长度变异可相差几个kb。Karvonen等甚至发现欧洲云杉*Picea abies*的同一个种中ITS-1拷贝的长度可以相差达到500bp, 因此ITS序列分析不适用于裸子植物的分子系统学研究。但是ITS在被子植物中的长度差异很小, PCR扩增及测序简单易行, 因此ITS在被子植物科内, 特别是近缘属间及种间关系研究中有很好应用。



3.1 分子系统学概述



分子系统学研究中常用基因种类

表2 适用于系统学研究的叶绿体基因*

Gene	Length ^①	% AA Sim. ^②	Substitution rate		
			K _a ^③	K _A ^④	K _s ^⑤
16s rRNA	1,489	97 ^⑥	3	na	na
23s rRNA	2,810	94 ^⑥	4	na	na
<i>psbA</i>	1,062	99	11	1	45
<i>psbD</i>	1,062	98	12	1	49
<i>psaB</i>	2,205	97	12	1	51
<i>psbB</i>	1,527	97	14	2	54
<i>psbC</i>	1,422	97	12	1	48
<i>psaA</i>	2,253	96	13	2	52
<i>rbcL</i>	1,434	93	17	4	63
<i>atpB</i>	1,497	92	18	4	62
<i>ndhA</i>	1,182	89	19	6	71
<i>atpA</i>	1,524	88	18	7	54
<i>ndhD</i>	1,530	82	21	9	65
<i>rpoB</i>	3,243	81	18	9	51
<i>rpoCl</i> ^⑦	2,046	78	24	12	69
<i>ndhA</i> ^⑧	1,095	76	25	10	75
<i>rpoA</i>	1,014	69	27	18	62
<i>ndhF</i>	2,133	67	31	19	76
<i>rpoC2</i>	4,167	64	26	17	61
<i>matK (orfK)</i>	1,530	59	37	26	82



3.1 分子系统学概述



表 3 25 种虎耳草科植物的 *matK* 和 *rbcL* 基因序列变异比较*

Comparison	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
性状(核苷酸)数目	1078	1398
变异性状百分率	38	12
信息位点百分率	16	7
氨基酸变异百分率	59	5
最简约树的数目	3	24
一致性指数(CI)	0.790	0.712
排除自征后的一致性指数	0.635	0.580
维持性指数(RI)	0.736	0.699
转换 : 颠换	1:1.06	1.41:1
密码子 3 个位置的变异比值	1.22:1:1.57	1.26:1:6.17
密码子 3 个位置的维持性指数	0.76;0.71;0.73	0.57;0.63;0.75

* 引自 Johnson & Soltis, 1995.



3.1 分子系统学概述



DNA制备：高含量及高质量的DNA

CTAB法：

CTAB (Cetyltriethyl ammonium bromide) 是一种去污剂，这种方法的原理是：一定浓度的CTAB与核酸结合并通过离心形成CTAB-核酸复合物沉淀，而多糖等留在上相中。要使CTAB-核酸复合物的分开则先溶于高盐溶液中，再用乙醇沉淀核酸，CTAB溶于乙醇中。所得核酸DNA大小为20-50kb。很少有RNA干扰，必要时也可用RNase去除残留DNA。无论是新鲜材料或经脱水处理的材料，本方法均适用。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



分子标记及其在药用植物系统分类学的应用

分子标记 (Molecular marker)

广义：是指可以遗传的并可以检测的DNA序列或蛋白质。

狭义：是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性DNA片段，即DNA分子标记，而这个界定现在被广泛采纳。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



分子标记及其在药用植物系统分类学的应用

DNA分子标记的本质：是指能够反映生物个体或种群间基因组中某种差异性特征的**DNA片段**。

分子诊断技术：由于DNA分子中碱基的缺失、插入、易位、倒位、重排或由于长短与排列不一的重复序列等而产生多态性，DNA分子标记便是检测这种多态性的技术，故DNA分子标记技术又称作分子诊断技术。





分子标记的特点：

(相对形态，细胞，生化标记具有的优点)

- (1) 直接以DNA的形式表现，在生物体的各个组织、各个发育阶段均可检测到，不受季节、环境限制，不存在表达与否等问题；
- (2) 数量极多，遍布整个基因组，可检测座位几乎无限；
- (3) 多态性高，自然界存在许多等位变异，无须人为创造；
- (4) 表现为中性，不影响目标性状的表达；
- (5) 许多标记表现为共显性特点，能区别纯合体和杂合体。





分子标记的分类

在遗传学研究中广泛应用的DNA分子标记已经发展了很多种，一般依其所用的分子生物学技术大致可以分为三大类：

第一类：是以分子杂交为核心的分子标记，包括RFLP、DNA指纹技术等，这类分子标记被称为第一代分子标记；

第二类：是以PCR为核心的分子标记，包括随机扩增多态性RAPD、简单序列重复SSR、扩增片段长度多态性AFLP、序列标签位点STS等，为第二代分子标记；

第三类：是一些新型的分子标记，如：SNP标记、表达序列标签EST标记等，也以PCR技术为基础，为第三代分子标记。



3.1 分子系统学概述



• 基本概念：

- 系统发生 (phylogeny) ——是指生物形成或进化的历史
- 系统发生学 (phylogenetics) ——研究物种之间的进化关系
- 系统发生树 (phylogenetic tree) ——表示形式，描述物种之间进化关系



3.1 分子系统学概述



- 分子进化研究的目的

- 从物种的一些分子特性出发，从而了解物种之间的生物系统发生的关系。

- 蛋白和核酸序列
- 通过序列同源性的比较进而了解基因的进化以及生物系统发生的内在规律



3.1 分子系统学概述



分子进化研究的基础:

- 1 假设: 核苷酸和氨基酸序列中含有生物进化历史的全部信息。
- 2 理论: Zuckerdn 与Pauling在1965年提出分子钟理论, 在各种不同的发育谱系及足够大的进化时间尺度中, 许多序列的进化速率几乎是恒定不变的。



3.1 分子系统学概述



- 直系同源与旁系同源

- Orthologs (直系同源):

- Homologous sequences in different species that arose from a common ancestral gene during speciation; may or may not be responsible for a similar function.

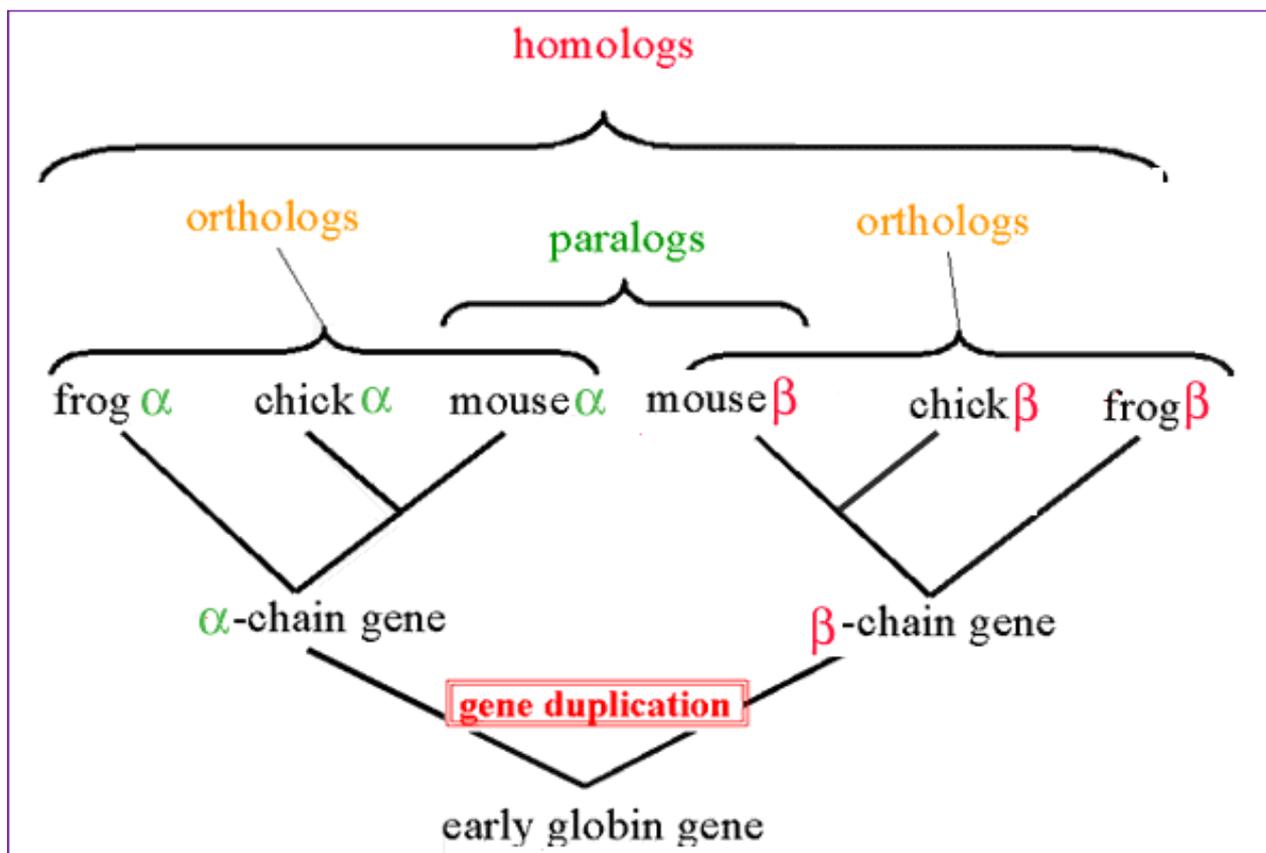
- Paralogs (旁系同源):

- Homologous sequences within a single species that arose by gene duplication. 。

- 以上两个概念代表了两个不同的进化事件。用于分子进化分析中的序列必须是直系同源的，才能真实反映进化过程。



3.1 分子系统学概述



3.1 分子系统学概述



- 系统发生树（phylogenetic tree）：
 - 又名进化树（evolutionary tree）已发展成为多学科交叉形成的一个边缘领域。
 - 包括生命科学中的进化论、遗传学、分类学、分子生物学、生物化学、生物物理学和生态学，又包括数学中的概率统计、图论、计算机科学和群论。
 - 闻名国际生物学界的美国冷泉港定量生物学会于1987年特辟出"进化树"专栏进行学术讨论，标志着该领域已成为现代生物学的前沿之一，迄今仍很活跃。



3.1 分子系统学概述



构建系统发育进化树

系统发育树 (phylogenetic tree) —— 又称 evolutionary tree (进化树) 就是描述这一群有机体发生或进化顺序的拓扑结构。它可以用来研究不同物种间的进化关系，这一直是生物学的研究热点。

拓扑 (Topology) 将讨论范围内的事物之间的相互关系表示出来，将这些事物之间的关系通过图表示出来。

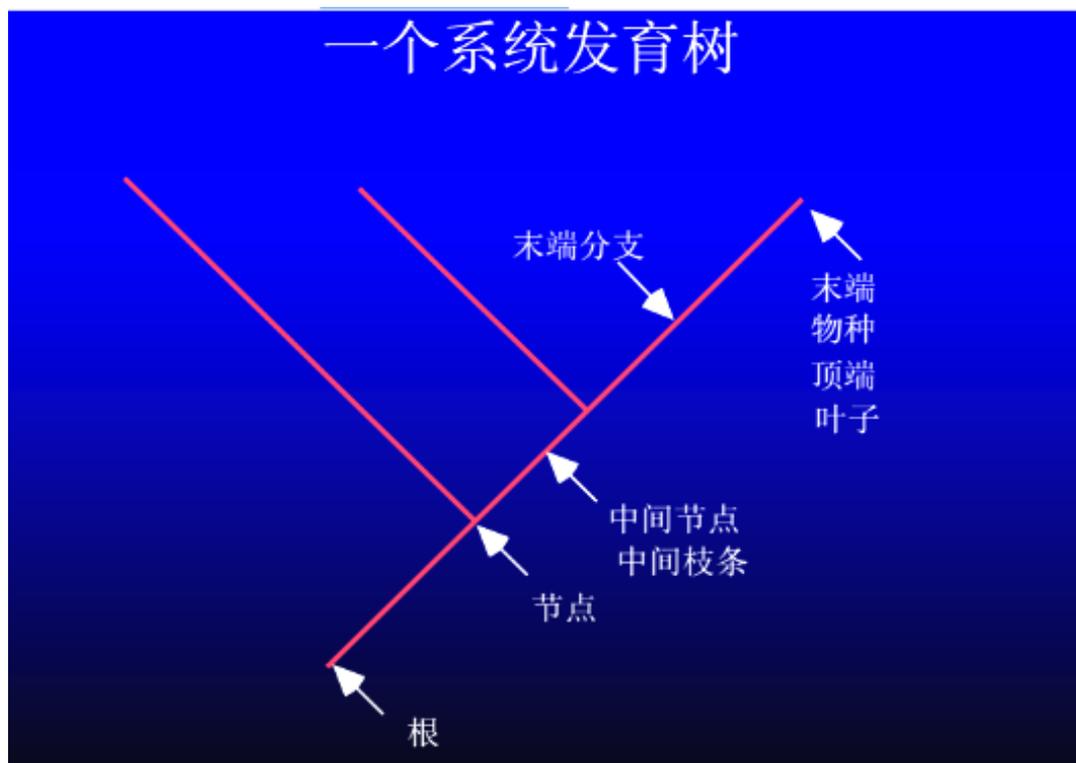


3.1 分子系统学概述



构建系统发育进化树：树的分支模式被称为拓扑结构
(tree topology)

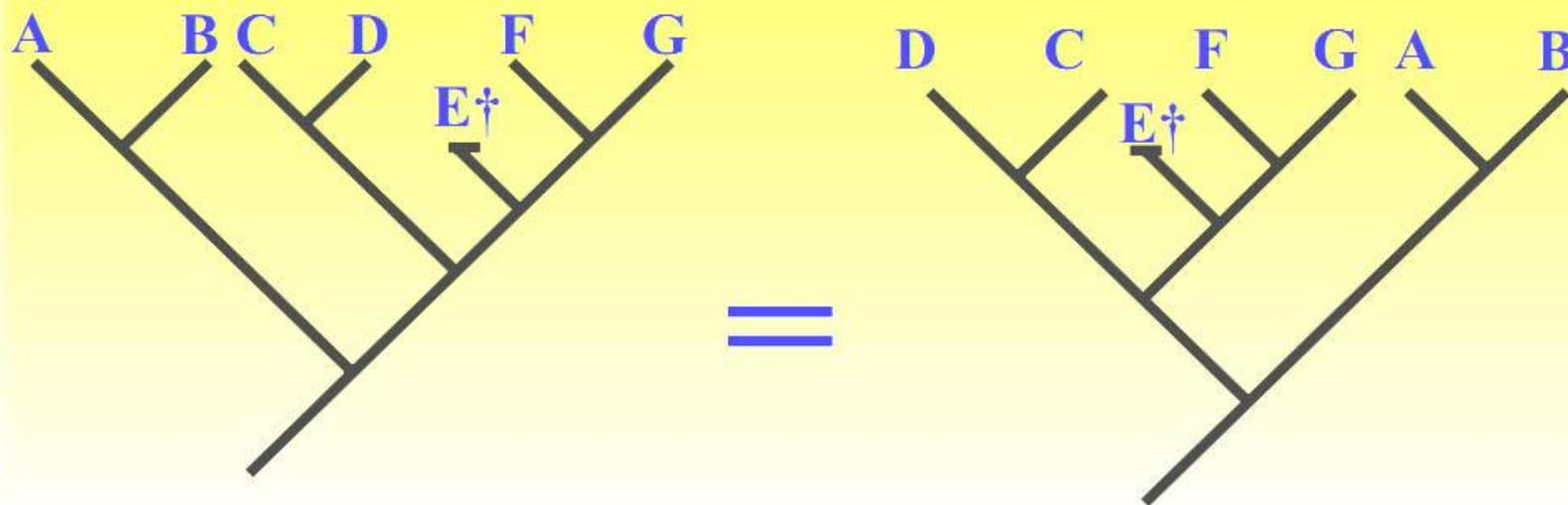
两个临近的分支的连接处称为节点 (node)，表示推断祖先的现存类群在树最底部的分支点成为根节 (root node)，一个单一的共同的祖先被定义为进化支 (clade) 或者单源群 (monophyletic group)



3.1 分子系统学概述



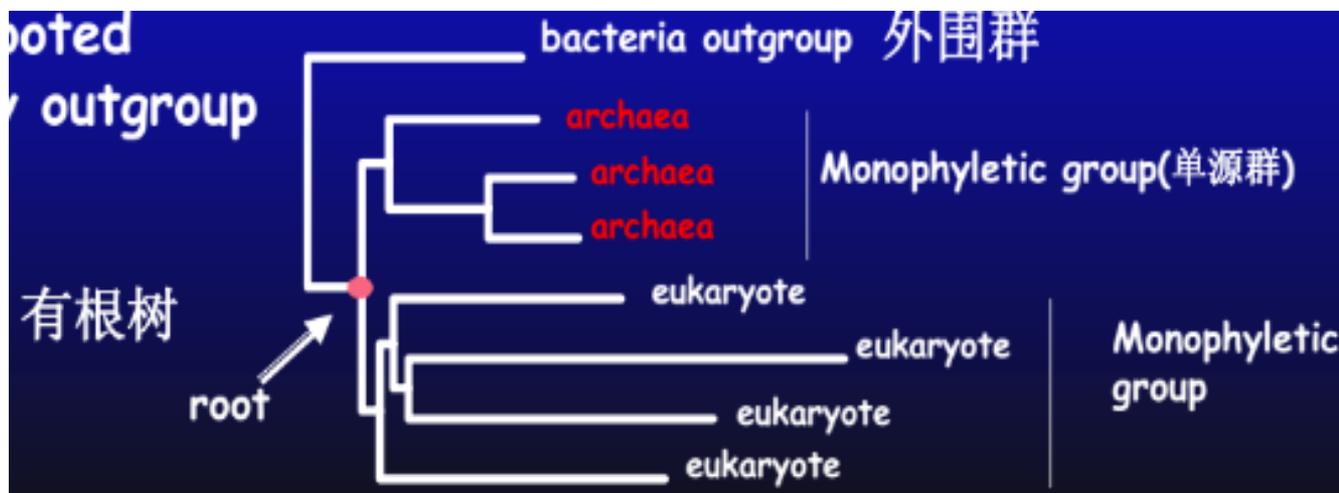
树只代表分支的拓扑结构



3.1 分子系统学概述



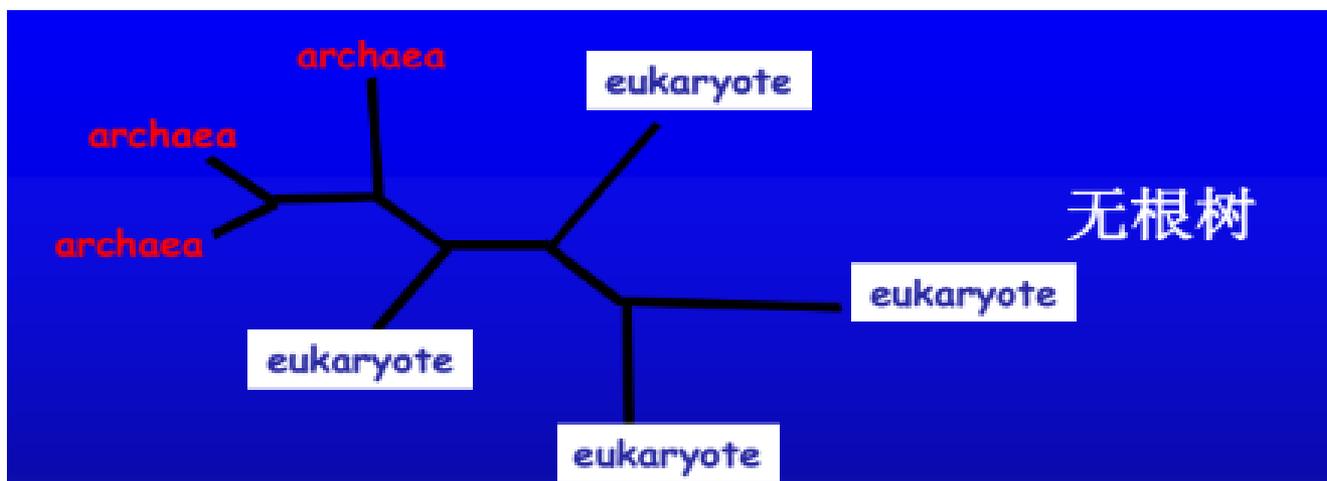
一棵系统树如果指明了最初共同祖先，则各类群或节点间具有了分支的先后次序和时间的方向性，这样的树称为有根树（rooted tree）或者进化树（evolutionary tree）。



3.1 分子系统学概述



如果一棵系统树仅指明了终端分类单元 (OTU) 之间的相对分支关系，并未指明进化方向，则称为无根树 (unrooted tree)。



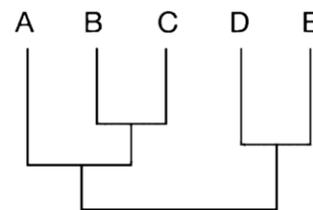
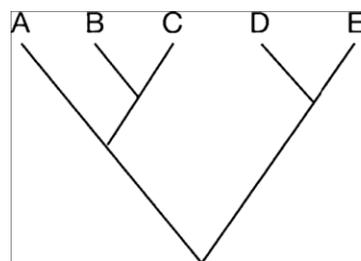
3.1 分子系统学概述



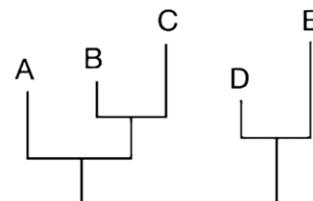
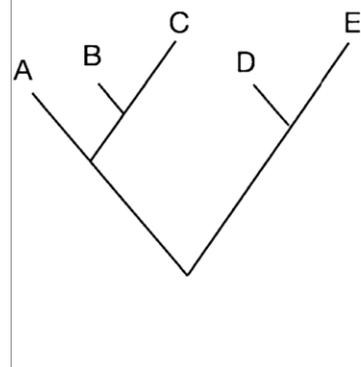
- 树形

系统发生图 (Phylograms)
): 有分支和支长信息

分支图 (Cladograms) 只
有分支信息, 无支长信息



Cladogram



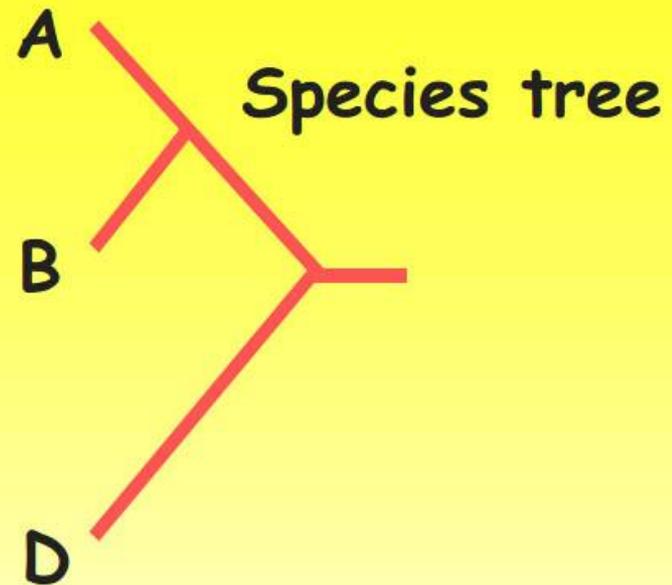
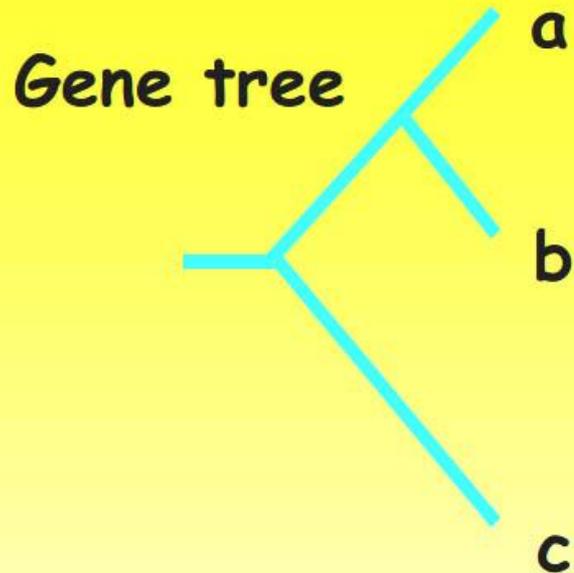
Phylogram



3.1 分子系统学概述



基因树，物种树



We often assume that gene trees give us species trees



3.1 分子系统学概述



系统发生树构建方法

- Molecular phylogenetic tree construction can be divided into five steps:
 - (1) choosing molecular markers;
 - (2) performing multiple sequence alignment;
 - (3) choosing a model of evolution;
 - (4) determining a tree building method;
 - (5) assessing tree reliability.



3.1 分子系统学概述



用于构建系统树的数据：分为距离数据（distance data）和特征数据（character data）两种类型。

距离数据，距离法（distance-based method）

包括非加权分组平均法（UPGMA）、最小进化法（ME）和邻接法（NJ）

性状数据，特征数据分析法（character-based method）

包括最大简约法（MP）、最大似然法（ML）和贝叶斯法（BI）



3.1 分子系统学概述



最大简约法 (MP)

优点:

最大简约法不需要在处理核苷酸或者氨基酸替代的时候引入假设（替代模型）。

此外，最大简约法对于分析某些特殊的分子数据如插入、缺失等序列有用。



3.1 分子系统学概述



最大简约法 (MP)

缺点:

在分析的序列位点上**没有回复突变或平行突变**，且被检验的序列位点数很大的时候，最大简约法能够推导获得一个很好的进化树。

然而在分析序列上**存在较多的回复突变或平行突变**，而被检验的序列位点数又比较少的时候，最大简约法可能会给出一个不合理的或者错误的进化树推导结果。



3.1 分子系统学概述



通过矩阵建树的方法

由进化距离构建进化树的方法有很多，
常见有：

1. Unweighted Pair Group Method (UPGMA法)
2. Neighbor-Joining Method (NJ法/邻接法)
3. Neighbors Relaton Method(邻居关系法)
4. Fitch-Margoliash Method (FM法)



3.1 分子系统学概述



最大似然法 (ML)

最大似然法(maximum likelihood, ML)最早应用于系统发育分析是在对基因频率数据的分析上, 后来基于分子序列的分析中也已经引入了最大似然法的分析方法。



3.1 分子系统学概述



最大似然法 (ML)

最大似然法分析中，选取一个特定的替代模型来分析给定的一组序列数据，使得获得的每一个拓扑结构的似然率都为最大值，然后再挑出其中似然率最大的拓扑结构作为最优树。在最大似然法的分析中，所考虑的参数并不是拓扑结构而是每个拓扑结构的枝长，并对似然率求最大值来估计枝长。



3.1 分子系统学概述



最大似然法 (ML)

最大似然法的建树过程是个很**费时**的过程，因为在分析过程中有很大的计算量，每个步骤都要考虑内部节点的所有可能性。针对这种情况，发展出了许多优化的可以加快最大似然法寻找最优树的搜索方法，如**启发式搜索**，**分枝交换搜索**等。

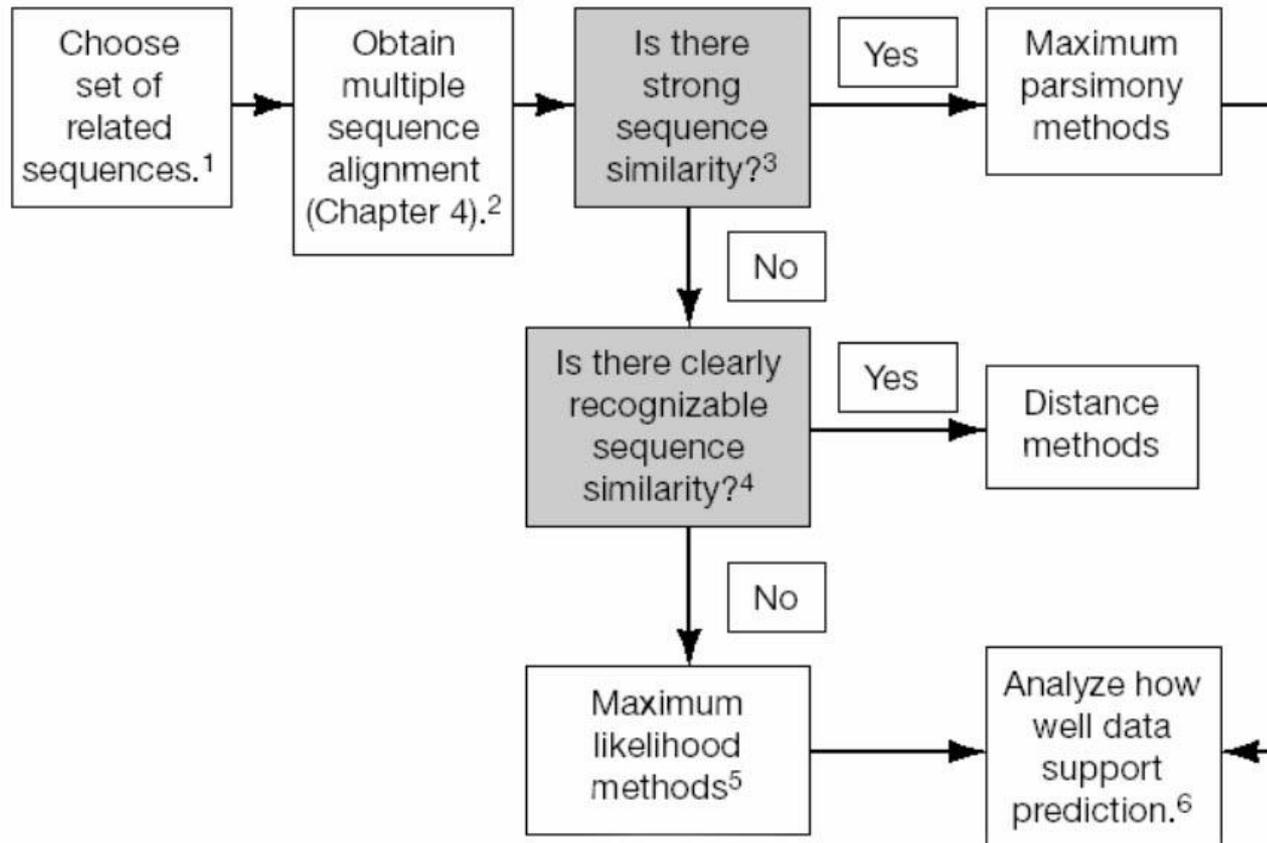
最大似然法是一个比较成熟的参数估计的统计学方法，具有很好的统计学理论基础，在当样本量很大的时候，似然法可以获得参数统计的最小方差。只要使用了一个**合理的、正确的替代模型**，最大似然法可以推导出一个很好的进化树结果。



3.1 分子系统学概述



METHODS



3.1 分子系统学概述



分析步骤:

多序列比对 (自动比对, 手工比对)

建立取代模型 (建树方法)

建立进化树

进化树评估



3.1 分子系统学概述



- 系统发生分析常用软件
 - (1) PHYLIP
 - (2) PAUP
 - (3) TREE-PUZZLE
 - (4) MEGA
 - (5) PAML
 - (6) TreeView
 - (7) VOSTORG
 - (8) Fitch programs
 - (9) Phylo win
 - (10) ARB
 - (11) DAMBE
 - (12) PAL
 - (13) Bionumerics





- 实例讲解_MEGA软件构建系统进化树

- MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

该软件是由Kumar等编写的进行分子进化遗传分析的免费软件包，能对DNA、mRNA、氨基酸序列及遗传距离进行系统发生分析。在建树方法上，提供了目前最常用的UPGMA，ML，NJ及MP法，对所获得树也可进行自举值检验及标准误估计可靠性检验。

优点为：简单易用





•实例讲解

首先用MEGA软件将保留的Fasta文件打开,这时候会有两个窗口,选择File标签
-->Convert file format to Mega.

The screenshot shows the MEGA 4.0 software interface. The main window displays a list of DNA sequences and their corresponding protein translations. The sequences are listed in a table with columns for Species/Abbreviation and the sequence itself. The protein translations are shown in a separate column. A green arrow points from the 'File' menu to the 'Convert file format to Mega' option. Another green arrow points from the 'File' menu to the 'Convert file format to Mega' option. The interface includes a menu bar, a toolbar, and a sequence alignment view.

Species/Abbreviation	DNA Sequence	Translated Protein Sequence
1. FJ357061	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
2. CY078987	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
3. EU743306	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
4. CY014627	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
5. CY004466	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
6. FJ432754	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
7. FJ357053	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
8. CY004507	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
9. CY077102	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
10. EU026110	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
11. EU026102	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
12. CY060178	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
13. EU735794	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
14. FJ432778	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...
15. GU186632	ATGCTACCGGATCATTGCTT	...

菜单栏

工具条

ATGCTACCGGATCATTGCTT



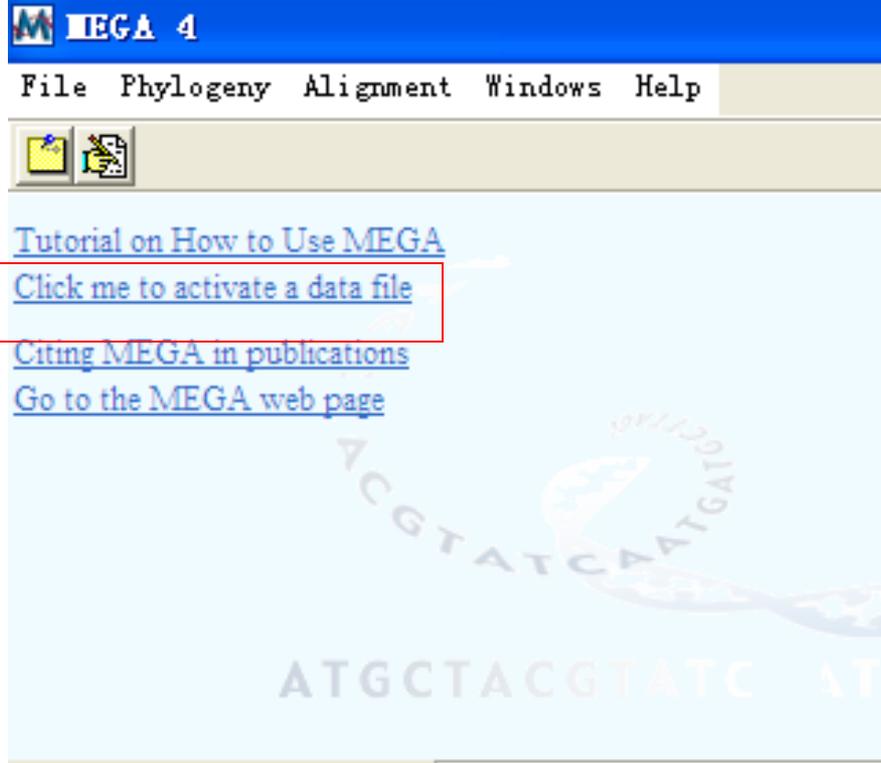
选择 *File* 标签 --> *Convert file format to Mega.*



当给出相应的文件路径之后点击 *ok*

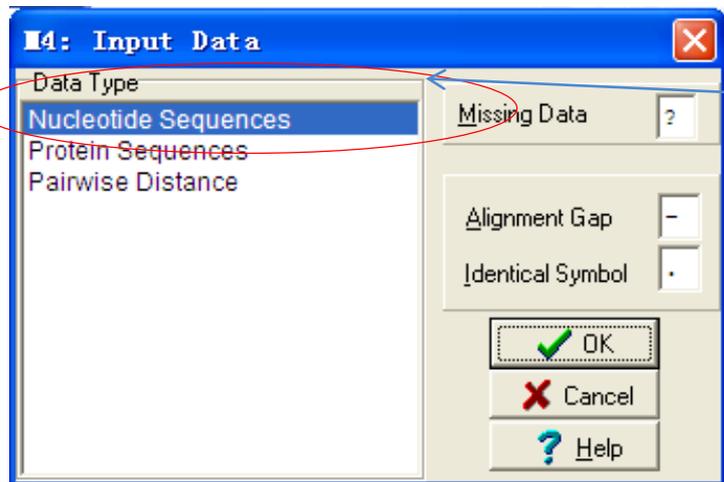


显示文件已经转化为MEGA Format,
点击OK.
将文件保存, 牢记路径



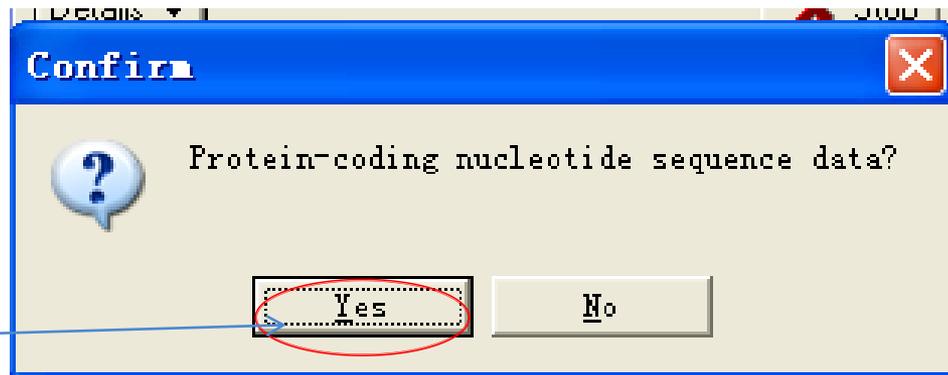
点击，载入MEGA格式的分析序列





选择数据类型，在本次测试中用的是核苷酸序列。

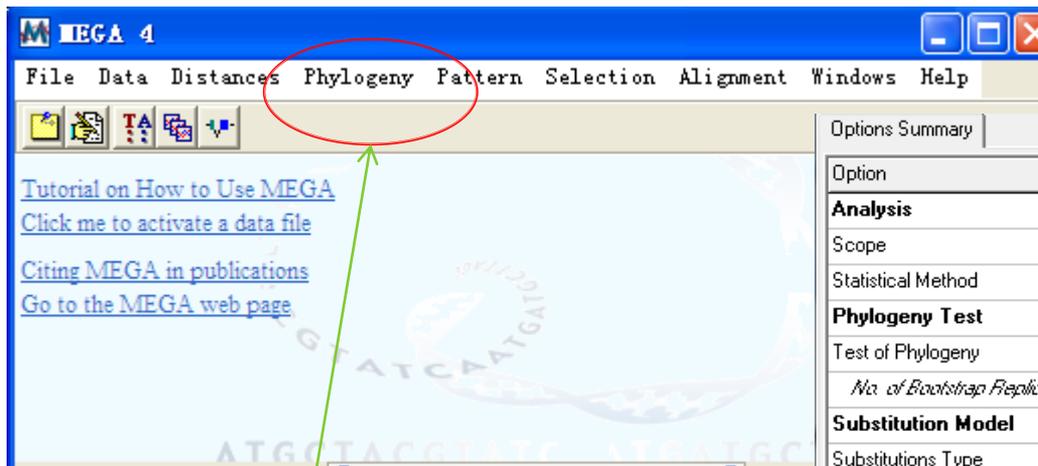
根据实际情况选择YES选项





参数设置好之后点击 *compute*.

下一步进入建树的最后阶段



在 *Phylogeny* 中选择建树方法，这里选择 *NJ* 法。

蛋白质序列一般选择 *Poisson Correction* (泊松校正)，对于核苷酸序列一般采用 *P-distance* 模型

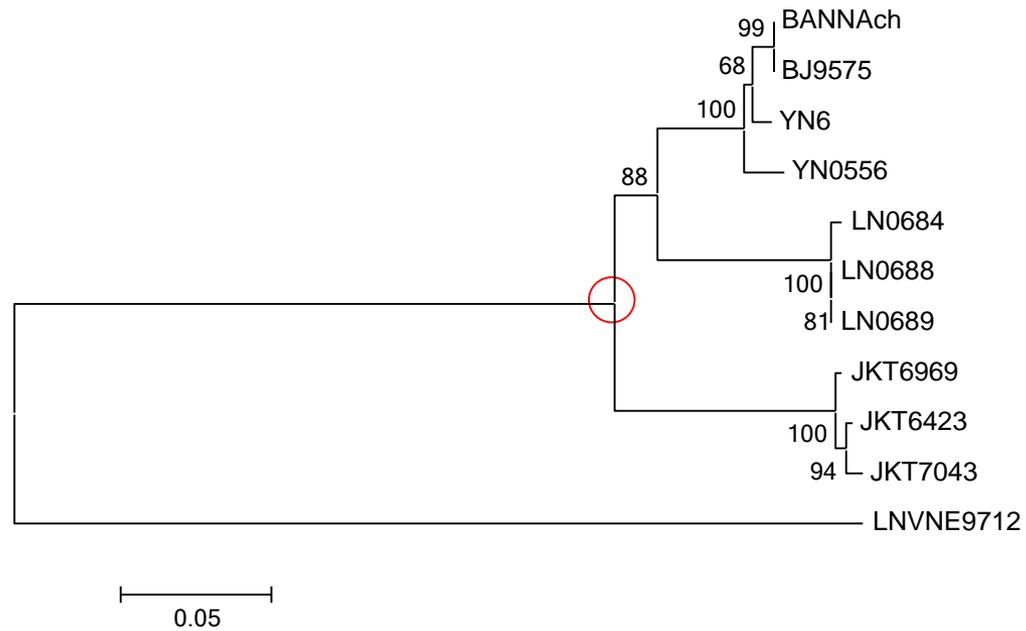
Options Summary

Option	Selection
Analysis	Phylogeny Reconstruction
Scope	All Selected Taxa
Statistical Method	Neighbor-joining
Phylogeny Test	
Test of Phylogeny	Bootstrap method
<i>No. of Bootstrap Replications</i>	1000
Substitution Model	
Substitutions Type	Nucleotide
Model/Method	Kimura 2-parameter model
Substitutions to Include	d: Transitions + Transversions
Rates and Patterns	
Rates among Sites	Uniform rates
<i>Gamma Parameter</i>	<i>Not Applicable</i>
Pattern among Lineages	Same (Homogeneous)
Data Subset to Use	
Gaps/Missing Data Treatment	Pairwise deletion
<i>Site Coverage Cutoff (%)</i>	<i>Not Applicable</i>

Compute Cancel Help



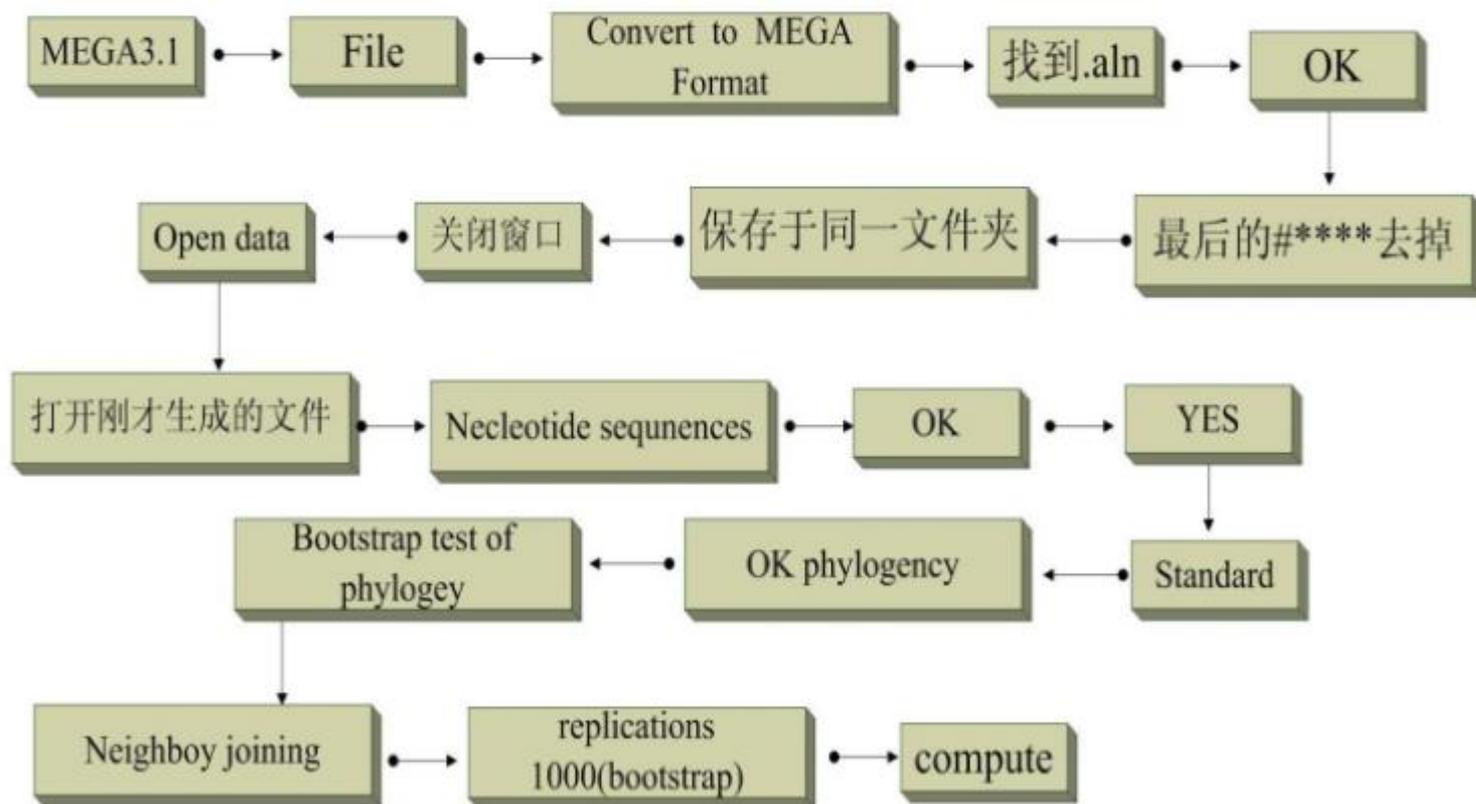
根据Mega的计算最终得到了序列中的进化关系。



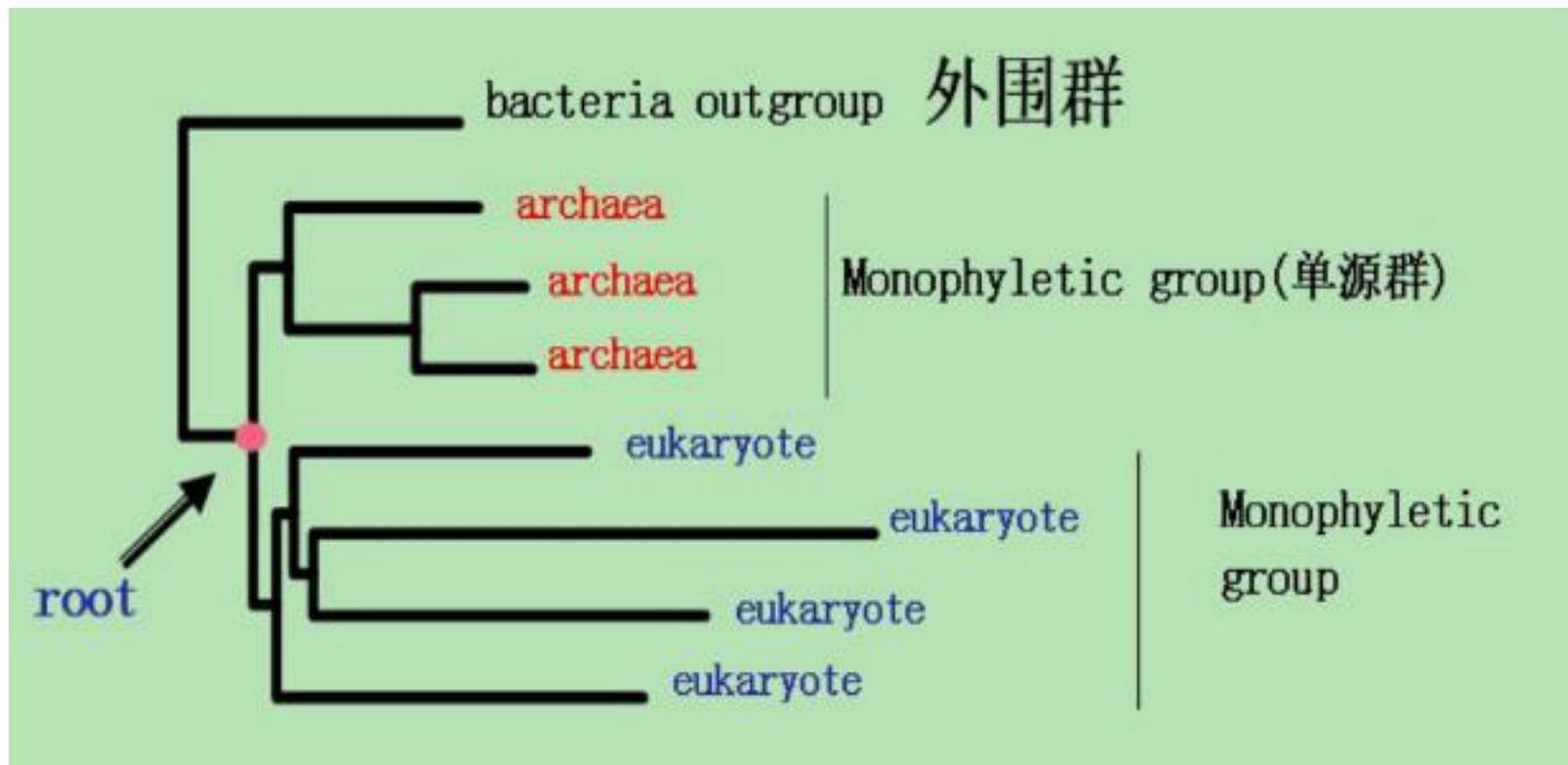
3.1 分子系统学概述



MEGA软件应用



3.1 分子系统学概述



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



一、药用植物分子系统学的应用

1、药用植物的分子鉴定和分类修订

分子生物学技术在药用植物的分子鉴定、质量评价和分类修订研究中的应用逐步扩大，评价方法及手段多样化且日趋完善，为药用植物品质评价开拓了新思路，提供了新方法。

药用植物传统的鉴定方法主要包括基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定。传统的基原鉴定和性状鉴定需要工作者丰富的理论知识和多年的实践经验，同时受到药用植物表型及遗传变异等多种变量的影响，特别是亲缘关系较近的药用植物，易造成鉴别的错误。而DNA作为遗传物质，不像形态和解剖等特征受到外界环境的影响，可以反映生物进化的本质和物种的基因型。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



一、药用植物分子系统学的应用

2、新药源的发掘与寻找

根据植物化学分类学提示的药用植物亲缘关系越近，其体内所含的化学成分越近似甚至有相同的活性成分的原理，就能较快地找到新药源或功效类似品。主要途径是从现有栽培种、近缘种或野生种中筛选优良种或替代品。

例如，植物学家通过研究金银花同属植物的绿原酸含量，结果表明其中十多种的含量较高，灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz 和红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq 的花蕾，前者含绿原酸可达12%，后者可达10%左右，比山东的正品金银花含量还高，《中国药典》从2005年版起已将灰毡毛忍冬和红腺忍冬收入山银花项下。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



一、药用植物分子系统学的应用

3、珍稀濒危药用植物的保护

多样性的重要任务是使种群保持足够的遗传多样性进而保护种群未来的适应能力、扩展能力以及在自然环境下恢复重建的能力，最好的保护方法是原生境保护。长期以来，人们认为物种适应环境的能力主要取决于该物种所包含的遗传变异水平。如果物种没有一定程度的遗传多样性，该物种被认为是不能适应日益改变的环境和进化的竞争对手。目前认为，如果对濒危植物的遗传资料一无所知，要想充分保护遗传多样性就必须保护更多的居群。但保护所有的居群是不现实的，因此利用DNA分子标记提供遗传多样性信息，并通过生态学等方面的资料，确定核心样本区域，进而确定濒危植物的重点保护地点和范围。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



一、药用植物分子系统学的应用

4、基于亲缘关系的中药药性研究

传统的中药药性，包括四气、五味、功效等，是建立在大量的临床基础上归纳总结出来的，可以认为是一种基于传统理论的分类方法。

反应植物亲缘关系的分类方法属于自然分类系统，一定程度上是药用植物生物学本质的具体体现，将药用植物的亲缘关系与传统中药药性相结合，在科属的分类单元内，以具有相同药性的药物为研究对象，寻求共性药理活性，在此基础上，分析与药性关联的化学成分，从而开展中药化学成分、药理效应、药性三者之间的相关性研究，探讨中药药性研究的新思路和新模式。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



二、展望

1 药用植物叶绿体基因组超级条形码

现有常用的DNA条形码片段不能鉴定所有的药用植物类群。近年随着高通量测序技术的迅猛发展，药用植物的鉴定研究中开始采用基因组数据，一小部分对于药用植物的基因组数据已经发表，但是大部分药用植物的基因组数据有待挖掘。鉴于以上形势，药用植物叶绿体基因组超级条形码应运而生。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



二、展望

2 药用基因组亲缘学

系统发育基因组学是进化和基因组学的交叉学科，是将基因组数据用于进化关系重建的综合分析；药用亲缘学研究药用生物（特别是药用植物）的生物亲缘关系、化学成分和疗效（传统疗效和药理活性）间的相关性；系统发育基因组学方法可用于药物发现和开发的相关问题研究，在组学水平拓展了药用亲缘学的领域，由此衍生出药用基因组亲缘学。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



二、展望

3 真正构建生物系统发生的图谱

随着分子生物学中一些重大问题的解决，如内元(内含子)功能，DNA 时空调控机制等的彻底破译，构建分子系统谱系将会有更加有力的手段。但要真正构建生物系统发生的图谱，应使用综合的方法即分子系统学和形态学、生理学、行为学、生态学、生物地理学等方法。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



二、展望

4 基因组进化与表型进化

现阶段的分子系统学研究很少把基因组进化与表型进化联系起来，在今后的研究中，为了追踪从DNA进化到表型进化的途径，需要研究结构基因和它们的调控基因间的关系及变化，需要分子水平的比较解剖学和比较胚胎学，分析蛋白质(主要是酶)在结构和功能上如何进化，分析它们在生化调控途径中的组织化如何出现，以及分析它们在不同组织或不同发育阶段中的表达是如何被调控的，从而将分子水平与形态水平的研究有机地结合起来。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



二、展望

5 基于药用植物类群亲缘关系的应用研究

药用植物分子系统学建立药用植物类群的亲缘关系，为探讨药用植物类群其它所有特征的演化规律提供了可信的客观的遗传背景参照，可望会有更多的基于亲缘关系的应用研究出现。

6 寻找和扩大药用植物资源

通过药用植物亲缘学研究，获取化学成分的特定序列，设计探针，以识别未知植物是否具有潜在的药用价值，将成为寻找和扩大药用植物资源的主要途径和方法。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



地黄属的分子系统学研究

地黄：玄参科，多年生草本植物，药用历史悠久，《神农本草经》中列为上品，药用基原为“块根”。

中药处方中的使用频率排名处于前10位，金匱肾气丸、六味地黄丸、杞菊地黄丸等中成药中的主要配伍用药。

根据生药的鲜、干程度，炮制与否可分为鲜地黄、生地黄和熟地黄。鲜地黄性寒，味甘、苦，能清热生津、凉血、止血；生地黄性寒，味甘，能清热凉血、养阴、生津；熟地黄性微温，能滋阴补血、益精填髓。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



药用地黄基原植物的本草考证（1）

《本草图经》：地黄“二月生叶，布地便出，似车前，叶上有皱纹而不光。高者尺余，低者三四寸，其花似油麻花，而红紫色，亦有黄花者。其实作房如连翘，子甚细而沙褐色。根如人手指，通黄色，粗细长短不一。”

《本草纲目》：“其苗初生塌地，叶如山白菜而毛涩，叶面深青色，又似小芥叶而颇厚，不叉丫。叶中择茎，上有细毛，茎梢开小筒子花，红黄色。结实如小麦粒。根长四五寸，细如手指，皮赤黄色，如羊蹄根及胡萝卜根。”



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



药用地黄基原植物的本草考证（2）

《本草乘雅半偈》：“汁液最多，虽暴焙极燥，顷则转润。”说明根含糖量大，易吸潮。

《药性蒙荃》：“以怀庆肥大而短、糯体、皮细、菊花心者佳。”菊花心即地黄块根形成层的形状。这是历代药商鉴定地道货的标志。

《植物名实图考》：“小儿折花食之，诃日蜜罐。”揭示了地黄花冠基部有蜜腺，插图首次比较确切地反映了地黄的形态特征。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



地黄属 (*Rehmannia*) 建立于1835年, 以俄罗斯医生 Joseph Rehmann 而取植物属名。

地黄属是一个东亚-日本分布的小属, 仅有1种分布达朝鲜半岛和日本, 其余种类均为中国特有种, 目前已知该属约有6种。

地黄 (*Rehmannia glutinosa*)

裂叶地黄 (*R. piasezkii*)

湖北地黄 (*R. henryi*)

高地黄 (*R. elata*)

天目地黄 (*R. chingii*)

茄叶地黄 (*R. solanifolia*)



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



按经典分类学的划分，地黄属通常认为与玄参科毛地黄属相关，但从植物化学分类角度看地黄属主要含环烯醚萜苷类，而毛地黄族主含强心苷，如置于苦苣苔科，却因其子房为不完全2室，不同于苦苣苔科的子房1室，因此难以归类。

因此，根据ITS碱基序列分析，考察地黄属内种间差异，对地黄属的分类进行修订，重建地黄属的系统发育树。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



基本方法

1 地黄属植物总DNA的提取

取3g新鲜叶片置于1.5ml离心管中，加200ul裂解缓冲液，用小棒研磨成浆，再用400ul裂解液冲洗小棒。然后，加入600ul酚-氯仿剧烈震荡20s，使蛋白质变性，12000rpm离心5min，取上清液。再加入50ul NaAc，600ul异丙醇混匀，12000rpm离心5min。去上清，沉淀溶于400ul TE中，再加40ul 3M NaAc，1ml无水乙醇混匀，12000rpm离心5min。去上清，用70%乙醇洗涤沉淀，离心，去清液。室温干燥后，沉淀溶于50ul无菌水中。 -20°C 保存备用。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



2 PCR扩增及ITS测序

采用引物ITS1 (CGTAACAAGGTTTCCGTAGG) 和ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), 按程序 (94°C 5min; 94°C 1min, 55°C 45s, 72°C 1min, 30次循环; 72°C 5min) 进行PCR扩增, 得到核糖体DNA的ITS片段。扩增产物用DNA纯化回收试剂盒进行纯化, 然后进行测序, 所有样品的测序均经过单向重复, 以检验测序结果的可靠性。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



3 序列编辑及排序

测得的序列和从GeneBank中下载的序列用DNASTAR程序中的Editseq和Seqman进行编辑，并手工校正，用Megaalign中的Clustal Method进行排序。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



4 系统发育分析方法

1 序列特性分析

用Mega 2.0统计和分析序列的变异情况。统计四种碱基（TCAG）的含量、变异位点数和信息位点数，并计算转换/颠换率。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



2 PAUP*分析

应用PAUP*4.0 b10软件对序列进行系统发育分析，使用最大简约法（maximum-parsimony, MP）、邻接法（neighbor joining, NJ）分别构建地黄属的系统发育树，以 *Calceolaria*（玄参科蒲包花属）为外类群，分析地黄属的系统位置。在构建系统发育关系时，核苷酸位点被认为是具有四种状态（ATCG）的无序位点，排序中的裂缝（Gap）作为缺失处理。

用MP法构建系统发育关系时，搜索最简约树的参数：heuristic search、100 random-addition sequences, TBR branch swaping。用靴带检验法（Bootstrap）1000 replications来检验各节点的置信度。输出置信度大于50%的多数原则一致树。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



用NJ法构建系统发育关系时，搜索参数如下：
heuristic search、100 random-addition sequences,
TBR branch swaping。用靴带检验法 (Bootstrap)
1000 replications来检验各节点的置信度。输出置信
度大于50%的多数原则一致树。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



3 贝叶斯法 (Bayesian statistics) 分析

利用Mrbayes 3.0b4软件进行贝叶斯法分析。先用PAUP软件执行modeltest命令，计算出适合贝叶斯法分析的模型，然后在Mrbayes软件中设置参数。参数如下：lset nst (模型)=2或6 rates (设置位点间变异模型)=equal、gamma、invgamma。以“mcmc”命令开始马尔科夫链的蒙特卡洛过程，其中参数“ngen”设置运行的代数1000000代，“printf req”设置显示的代数1000，“samplefreq”设置取样代数100，“nchains”设置=4，“savebr lens=yes”表示保存分支长度，“startingtree=random”表示以随机树为起始树。在舍弃老化样本 (Burnin sample) 10000代后，根据剩余样本构建一致树 (Consensus tree)。



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



表 7-2 地黄属各物种的 ITS 序列构成

Table 7-2 Composition of ITS sequences of *Rehmannia*

材料	ITS1		5.8S		ITS2		ITS1+ITS2
	长度 (bp)	G+C (%)	长度 (bp)	G+C (%)	长度 (bp)	G+C (%)	长度 (bp)
Rc	225	64	164	54.2	224	66.5	449
Rg	224	62.6	164	54.2	225	65.3	449
Rh	226	64.6	164	54.2	224	66.5	450
Rp	225	63.5	164	54.2	224	65.6	449
Rs	224	61.7	164	54.2	225	65.3	449
Re	225	63.5	164	54.2	224	65.2	449



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望

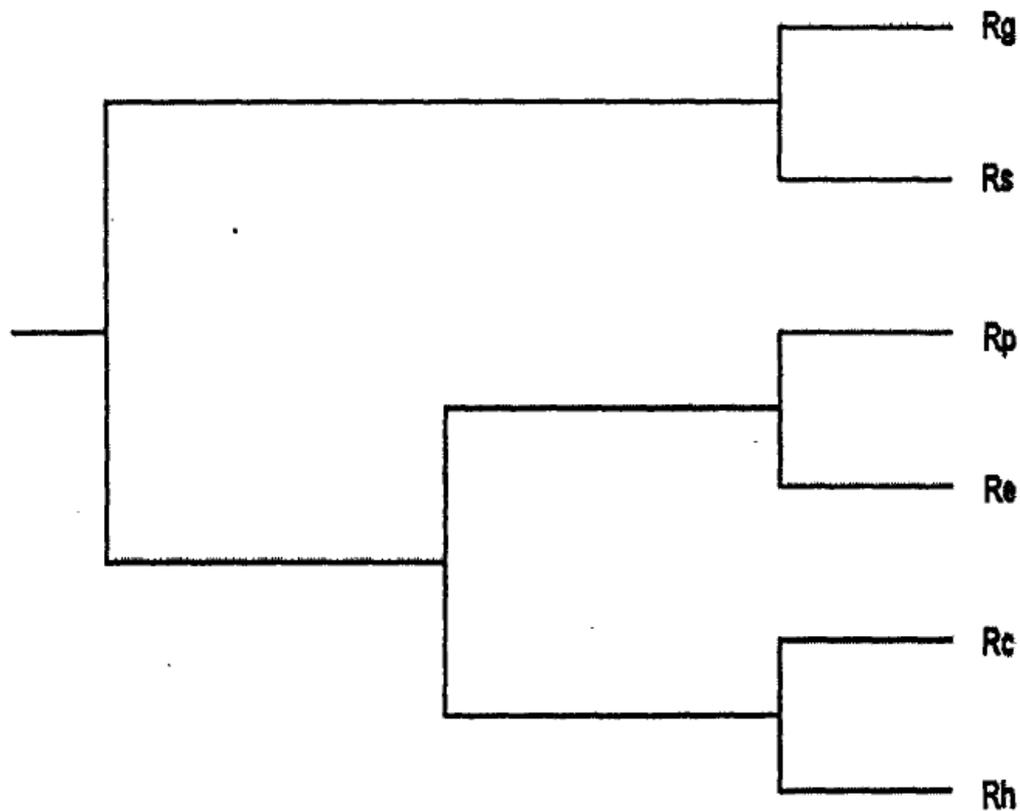


图7-4 地黄属植物的系统发育树

Figure 7-4 Phylogenetic tree of *Rehmannia* species



3.2 药用植物分子系统学的应用与展望



结论:

- 1 地黄属是一个稳定的单系
- 2 地黄属共有3支：天目地黄 (Rc) 与湖北地黄 (Rh) 为第1支，高地黄 (Re) 与裂叶地黄 (Rp) 为第2支，地黄 (Rg) 和茄叶地黄 (Rs) 为第3支。在形态解剖学上，高地黄 (Re) 与裂叶地黄 (Rp) 最为接近，在分子系统学分析中也得到最高的支持率 (98-100%)，可考虑合并成为1种。
- 3 地黄 (Rg) 和茄叶地黄 (Rs) 是地黄属内较进化的一支。





Thank You!

