

辣根属和豆瓣菜属(十字花科) 系统位置的分子证据

孙稚颖^{1,2}, 李法曾^{3*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学
药用植物研究所, 北京 100094; 3. 山东师范大学 生命科学学院, 济南 250014)

摘要: 对十字花科葶苈族的辣根属、南芥族的豆瓣菜属及相关属种植物的叶绿体 DNA 的 *trnL* 内含子和 *trnL-F* 基因间隔区序列进行了测定分析。结果表明, 辣根属植物与南芥族的山芥属、蔊菜属、豆瓣菜属、碎米荠属在系统发育树中聚成一支, 与葶苈族的模式属葶苈属植物相隔较远, 结合形态特征, 本研究认为辣根属应从葶苈族移出, 其系统位置应靠近山芥属、蔊菜属、豆瓣菜属、碎米荠属植物; 此外, 系统发育树中, 豆瓣菜属植物并入碎米荠属中, 表明二者具有更近的亲缘关系, 本研究结果不支持《中国植物志》第 33 卷对辣根属和豆瓣菜属的系统位置的处理。

关键词: 辣根属; 豆瓣菜属; 叶绿体 *trnL* 内含子和 *trnL-F* 基因间隔区; 十字花科

中图分类号: Q949.748.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)03-0296-04

Molecular evidence on the systematic position of *Armoracia* and *Nasturtium* (Brassicaceae)

SUN Zhi-Ying^{1,2}, LI Fa-Zeng^{3*}

(1. College of Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 3. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: The chloroplast DNA *trnL* intron and *trnL-F* spacer of *Armoracia* (trib. Drabaeae), *Nasturtium* (trib. Arabideae) and some related genera in Brassicaceae from China were sequenced and used to construct phylogenetic relationship among them. The results are as follows: *Armoracia* and *Barbarea*, *Rorippa*, *Nasturtium*, *Cardamine*, which are in Arabideae, formed one lineage in the molecular tree; *Armoracia* is far away from *Draba*, which is the type genus of *Drabieae*. Combining with morphological features, *Armoracia* is suggested to be moved out from Drabaeae and its systematic position should be closed with *Barbarea*, *Rorippa*, *Nasturtium* and *Cardamine*. Moreover, in the tree, *Nasturtium* is merged into *Cardamine*, so the two genera should have closer relationship. This study don't support the opinion in Flora of China (Vol. 33) about the systematic position of *Armoracia* and *Nasturtium*.

Key words: *Armoracia*; *Nasturtium*; *trnL* intron and *trnL-F* spacer; Brassicaceae

辣根属(*Armoracia*), 全世界有 3 种, 主要分布于欧洲的中部和南部, 我国仅有 1 种—辣根(*A. rusticana*), 为该属模式种, 同时也具有重要的经济价值(周太炎等, 1987)。关于辣根属的系统位置目前

有一定分歧, 在《中国植物志》第 33 卷中, 辣根属位于葶苈族中, 葶苈族在我国有 3 属, 其中葶苈属为该族模式属, 但在《中国被子植物科属综论》(吴征镒等, 2003)中采用 Takhtajan 系统(1997), 辣根属被

收稿日期: 2007-09-13 修回日期: 2008-07-24

基金项目: 山东省自然科学基金(Z-2002 D04)[Supported by Natural Science Foundation of Shandong Province(Z-2002 D04)]

作者简介: 孙稚颖(1971-), 女, 山东省滕州市人, 副教授, 博士, 主要从事植物资源与系统分类学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: lifz@sdnu.edu.cn)

放在了南芥族,我国南芥族含有 16 属,模式属为南芥属(周太炎等,1987)。豆瓣菜属(*Nasturtium*),全世界有 5 种,1 种产非洲西北部,2 种产亚洲及欧洲,2 种产北美,我国只有 1 种,即模式种—豆瓣菜(*N. officinale*)(周太炎等,1987),关于豆瓣菜属的系统学问题,也存在有争议,一些学者曾将豆瓣菜属作为蔊菜属的异名处理(Jonsell, 1974; Al-Shehbaz, 1988; Rollins, 1993),而另一些学者仍支持将二者作为独立的属(Hedge, 1968; 周太炎等, 1987; Al-Shehbaz & Price, 1998; Zhou 等, 2001; 吴征镒等, 2003)处理。*RbcL* 序列研究结果支持豆瓣菜属为一独立属,并指出其与碎米荠属(*Cardamine*)关系最近(Les, 1994)。马成亮(2003)对山东蔊菜属种子进行了形态学研究,认为蔊菜属与豆瓣菜属关系较近。因此辣根属应该位于哪个族? 它有哪些近缘属? 豆瓣菜属是否是一独立属,它又与谁最近缘? 这些问题是值得进行深度研究的。

近年来国外关于十字花科植物的分子系统学研究日益深入广泛,其中涉及辣根属与豆瓣菜属植物的也有报道,比如 Heenan 等(2002)利用 nrDNA 的 ITS 序列对新西兰粗杆芥属(*Pachycladon*)复合体进行了研究,共涉及 176 种植物,研究表明葶苈族和南芥族都是多系类群,在所构建的系统发育树中辣根属植物与碎米荠属、豆瓣菜属、蔊菜属等植物比较靠近,但该文并未对各属属间关系进行深入探讨。Al-Shehbaz 等(2006)主要依据 *ndhF* 叶绿体基因序列(Beilstein 等, 2006)以及对形态上的重新认识,对十字花科植物进行了修订,将十字花科划分为 25 族,其中碎米荠属、豆瓣菜属、蔊菜属、山芥属、辣根属等 10 属植物归于 trib. *Cardaminae*。Bailey 等(2006)利用 746 个 nrDNA 的 ITS 序列对上述 25 族进行了评价,并基于贝叶斯法构建了系统发育树,在树中,碎米荠属、豆瓣菜属、山芥属、辣根属与蔊菜属植物聚成一大支,自展支持率为 100%,表明其为一单系类群,其中豆瓣菜属植物与碎米荠属植物最先相聚。从以上最新的分子系统学研究可以看出,辣根属与碎米荠属等可能具有较近的亲缘关系。

TrnL 内含子及 *trnL-F* 基因间隔区是位于叶绿体 DNA 上的两段非编码区序列,近十几年,已被成功的运用于分类群的系统学研究中,被普遍认为适用于确定属间乃至族间的系统发生关系(Bayer & Starr, 1998; 张文衡等, 2001; 王峰等, 2002; 王玉金等, 2004; Warwick 等, 2004)。本文首次对辣根属、

豆瓣菜属及相关属的代表植物进行了叶绿体 *trnL* 内含子及 *trnL-F* 基因间隔区的序列分析研究,旨在确定辣根属和豆瓣菜属的系统位置提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验材料为硅胶干燥,凭证标本见表 1。

1.2 DNA 的提取

采用 CTAB 法(邹喻苹等, 2001),步骤略作简化,用异丙醇沉淀出 DNA 后,离心收集沉淀,70% 乙醇清洗两次后,烘干或自然风干,溶于适量灭菌双蒸水中,置 4 °C 冰箱中备用。

1.3 扩增

扩增引物为“c”5' CGAAATCGGTAGACGC-TACG 3' 和“f”5' ATTGAACTGGTG ACAC-GAG 3' (Taberlet 等, 1991),采取整段扩增,包括 *trnL* 内含子区、*trnL* 3' 外显子和 *trnL-F* 基因间隔区。反应体系为 25 μ L,扩增程序为 70 °C 1 min; 后 94 °C 1 min, 55 °C 20 s, 72 °C 50 s, 循环 2 次; 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 50 s, 循环 38 次; 72 °C 保温 4 min; 4 °C 保存。扩增反应在 System 9700 PCR 仪上进行。

1.4 纯化

扩增产物使用大连宝生物工程有限公司生产的从琼脂糖凝胶中回收纯化 DNA 片段的试剂盒 DV301 纯化回收。

1.5 测序

回收产物直接由上海英骏生物技术有限公司在 3730 测序仪上完成测序,测序使用引物“c”和“f”正反链测序,必要时选择中间引物“e”和“d”(Taberlet 等, 1991)。

1.6 外类群的选择

本研究选择中国植物志(第 33 卷)十字花科第一族长柄芥族的长柄芥(*Macropodium nivale*)为外类群。

1.7 数据分析

序列排列用 CLUSTAL X 1.83 完成,排好的序列利用 PAUP4.0 进行系统发育分析。利用 PAUP4.0 做简约分析时,空位始终作为缺失状态,使用启发式(heuristic search)搜索最简约树,100 次随机加入, TBR 枝长交换,利用 bootstrap(1 000 次重复)检验各分支的置信度。

表 1 材料来源
Table 1 Origin of material

分类群 Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	Genbank number
长柄芥 <i>Macropodium nivale</i>	新疆白哈巴东 East of Baihaba, Xinjiang	闫平 P. Yan 10867 (SDNU)	DQ649085
阿尔泰葶苈 <i>Draba altaica</i>	新疆乌鲁木齐谢家沟 Xiejiagou, Wulumuqi, Xinjiang	李法曾 F. Z. Li, 孙稚颖 Z. Y. Sun, 鲁法军 F. J. Lu 0405066 (SDNU)	EF426783
葶苈 <i>D. nemorosa</i>	山东艾山场部 Aishan, Shandong	刘颖 Y. Liu, 孙稚颖 Z. Y. Sun 043(SDNU)	EF426781
喜山葶苈 <i>D. oreades</i>	新疆天山 1 号冰川观测站 No. 1 Glacier of observe station, Tianshan, Xinjiang	李法曾 F. Z. Li, 孙稚颖 Z. Y. Sun, 鲁法军 F. J. Lu 0405049 (SDNU)	EF426782
辣根 <i>Armoracia rusticana</i>	栽培 Cultivated	唐桂英 G. Y. Tang 0405010 (SDNU)	EF426785
碎米荠 <i>Cardamine hirsuta</i>	山东艾山柞树沟 Zuoshugou, Aishan, Shandong	李法曾 F. Z. Li 等 043025 (SDNU)	EF426786
弹裂碎米荠 <i>C. impatiens</i>	山东崂山潮音瀑 Chaoyin Fall, Mt. Lao, Shandong	孙稚颖 Z. Y. Sun 2003031 (SDNU)	EF426784
天池碎米荠 <i>C. changbaiana</i>	吉林长白山去天池途中 on the way of Tianchi of Mt. Changbai	孙稚颖 Z. Y. Sun, 曲畅游 Ch. Y. Qu 0405151 (SDNU)	EF426787
欧洲山芥 <i>Barbarea vulgaris</i>	—	—	AY122453
蔊菜 <i>Rorippa indica</i>	山师校园 The campus of Shandong Normal University	孙稚颖 Z. Y. Sun 等 04011(SDNU)	EF426788
沼生蔊菜 <i>R. palustris</i>	山师校园 The campus of Shandong Normal University	孙稚颖 Z. Y. Sun 2003012 (SDNU)	EF426789
风花菜 <i>R. globosa</i>	山大校园 The campus of Shandong University	唐桂英 G. Y. Tang 0504031 (SDNU)	EF426790
豆瓣菜 <i>Nasturtium officinale</i>	—	—	AY122457

2 结果与分析

除欧洲山芥与豆瓣菜的叶绿体 *trnL* 内含子和 *trnL-F* 基因间隔区序列从 Genbank 下载外,其余 11 种植物的序列均由本研究所测定。测定序列经拼接后,范围在 714 bp 和 1 260 bp 之间变动,序列最长的是弹裂碎米荠,最短的是葶苈。序列经排序校对后,总长为 1 419 bp,其中 527 个位点为变异位点,301 个为系统发育的信息位点,MP 法构建的严格一致性树(图 1)树长 602,一致性指数(CI) = 0.9502、保留性指数(RI) = 0.9440,调整后一致性指数(RC) = 0.8970,以长柄芥族的长柄芥为外类群,其余种类聚成两支。第一支自展支持率为 64%,又包含两个系,系 I 辣根属、山芥属、蔊菜属植物,自展支持率为 66%;系 II 为豆瓣菜属和碎米荠属植物,自展支持率为 83%。第二支为葶苈族的模式属葶苈属的三个种,其自展支持率为 100%。

3 讨论

(1)在《中国植物志》第 33 卷中,辣根属隶属于葶苈族。本研究基于叶绿体 *trnL* 内含子和 *trnL-F* 基因间隔区序列所构建的系统发育树中,辣根与南

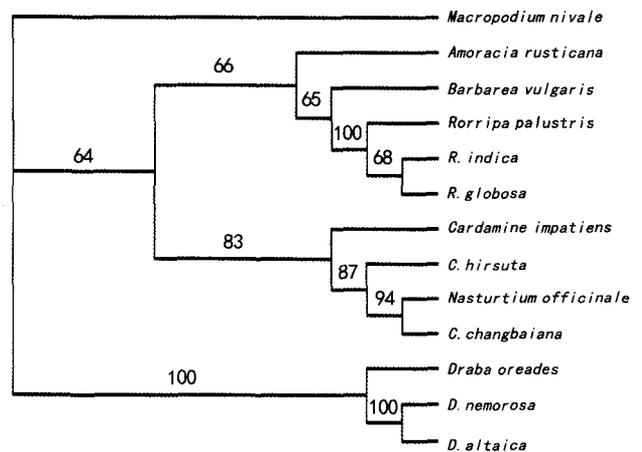


图 1 基于最大简约法(MP)构建的严格一致性树

Fig. 1 Strict consensus tree based on maximum parsimonious analysis

芥族的山芥属、蔊菜属、豆瓣菜属以及碎米荠属植物聚成一支,而与葶苈族的模式属葶苈属植物远远隔开,这表明辣根属与葶苈属关系较远,不应被放在葶苈族中,因此本研究不支持《中国植物志》第 33 卷对于该属系统位置的处理。辣根属与山芥属、蔊菜属、豆瓣菜属以及碎米荠属植物在形态上具有一些明显的共同特征,如:它们均适于生活在潮湿的环境中,叶常羽裂或为复叶,被单毛或光滑无毛,子叶缘倚,染色体基数一般为 8 等,这些均表明它们之间应该

有较近的关系。Takhtajan(1997)将辣根属放到豆瓣菜属、蔊菜属、山芥属附近,与我们的研究结果相吻合,此外,Al-Shehbaz等(2006)主要依据 *ndhF* 叶绿体基因序列以及对形态上的重新认识,对十字花科植物进行了修订,将碎米荠属、豆瓣菜属、蔊菜属、山芥属、辣根属等植物划归于同一属中,也与本文的研究结果相一致,因此本研究认为辣根属的近缘属应为山芥属、蔊菜属、豆瓣菜属以及碎米荠属植物。(2)在本研究所构建的系统发育树中,豆瓣菜嵌入碎米荠属中,而蔊菜属首先与山芥属等相聚,这表明,豆瓣菜属与碎米荠属更近缘,而蔊菜属与山芥属关系更近,在外部形态上,豆瓣菜属与碎米荠属花瓣均为白色或浅紫色,蔊菜属与山芥属花瓣均为黄色,彼此具有相似性。综合以上分析,本研究不支持将豆瓣菜属作为蔊菜属的异名处理的意见,支持 Les(1994)基于 *RbcL* 序列研究所得到的结果以及 Bailey等(2006)利用 746 个 nrDNA 的 ITS 序列基于贝叶斯法所构建的系统发育树,豆瓣菜属的系统位置与碎米荠属更为靠近。(3)辣根属与豆瓣菜属是十字花科的两个寡种属,我国仅分布有这两个属的模式种,本研究首次依据叶绿体 *trnL* 内含子和 *trnL-F* 基因间隔区序列,选择代表种类,对辣根属与豆瓣菜属的系统位置作了初步分析,提出了新的证据,更深入的全面综合研究尚待进行。

参考文献:

- 吴征镒,路安民,汤彦承,等. 2003. 中国被子植物科属综论 [M]. 北京:科学出版社,505—521
- 邹喻苹,葛颂,王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京:科学出版社,16—17
- 周太炎,郭荣麟,蓝永珍等. 1987. 中国植物志(第 33 卷)[M]. 北京:科学出版社,1—453
- Al-Shehbaz IA. 1988. The genera of Arabideae (Cruciferae; Brassicaceae) in the Southeastern United States[J]. *J Arnold Arboretum*, **69**: 85—166
- Al-Shehbaz IA, Price RA. 1998. Delimitation of the genus *Nasturtium* (Brassicaceae) [J]. *Novon*, **8**: 124—126
- Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA. 2006. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview [J]. *Plant Systematics and Evolution (Special Volume)*, 89—120
- Bailey CD, Koch MA, Mayer M, et al. 2006. Toward a global phylogeny of the Brassicaceae[J]. *Mol Biol Evol*, **8**: 1—47
- Bayer RJ, Starr JR. 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *TrnL* intron and *TrnL/trnF* intergenic spacer[J]. *Ann Miss Bot Gard*, **85**: 242—256
- Beilstein MA, Al-Shehbaz IA, Kellogg EA. 2006. Brassicaceae phylogeny and trichome evolution [J]. *Am J Bot*, **93**(4): 607—619
- Hedge IC. 1968. Arabidopsis [M]//Rechinger KH (ed). *Fl. Iran.*, **57**: 328—334
- Jonsell B. 1974. The genus *Rorippa* in tropical Africa and Madagascar[J]. *Sven Bot Tidsskr*, **68**: 377—396
- Heenan PB, Mitchell AD, Koch M. 2002. Molecular systematics of the New Zealand Pachycladon (Brassicaceae) complex: generic circumscription and relationship to *Arabidopsis* s. l. and *Arabis* s. l. [J]. *New Zealand J Bot*, **40**: 543—562
- Les DH. 1994. Molecular systematics and taxonomy of lake cress (*Neobeckia aquatica*; Brassicaceae), an imperiled aquatic mustard[J]. *Aquatic Bot*, **49**: 149—165
- Ma CL(马成亮). 2003. Studies on the seed morphology of *Rorippa* in Shandong and its systematic taxonomy significance(山东蔊菜属种子形态学研究及其系统分类学意义) [J]. *Guihaia* (广西植物), **3**(2): 145—148
- Rollins RC. 1993. The Cruciferae of Continental North America [M]. Stanford: Stanford Univ Press, 1—383
- Taberlet P, Gielly L, Pauton G, et al. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Mol Biol*, **17**: 105—109
- Takhtajan A. 1997. Diversity and Classification of Flowering Plants [M]. New York: Columbia University Press
- Wang F(王峰), Li DZ(李德铎), Yang JB(杨俊波). 2002. Molecular phylogeny of the Lardizabalaceae based on *TrnL-F* sequences and combined chloroplast data(基于叶绿体 *TrnL-F* 序列和联合数据分析木通科的分子系统发育)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **44**(8): 971—978
- Wang YJ(王玉金), Liu JQ(刘建全). 2004. A preliminary investigation on the phylogeny of *Saussurea* (Asteraceae; Cardueae) based on chloroplast DNA *TrnL-F* sequences(利用叶绿体 DNA *trnL-F* 序列初步探讨菊科风毛菊属的系统发育)[J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **42**(2): 136—153
- Warwick SI, Al-Shehbaz IA, Sauder C, et al. 2004. Phylogeny of *Smelowskia* and related genera (Brassicaceae) based on nuclear ITS DNA and chloroplast *trnL* intron DNA sequences[J]. *Ann Miss Bot Gard*, **91**: 99—123
- Zhang WH(张文衡), Chen ZD(陈之端), Chen HB(陈虎彪), et al. 2001. Phylogenetic relationships of the disputed genus *Triplostegia* based on *TrnL-F* sequences(从叶绿体 DNA *trnL-F* 序列论双参属的归属问题)[J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **39**(4): 337—344
- Zhou TY, Lu LL, Yang G, et al. 2001. Brassicaceae [M]//Wu ZY, Raven PH (eds). *Flora of China*. vol 8. Beijing: Science Press; St. Louis: the Missouri Botanical Garden Press, 66—136