

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2012.02.005

基于 ITS 序列探讨珍珠菜属过路黄组的系统关系

郑伟^{1,2}, 陈龙清^{1*}

(1. 华中农业大学 园林学院, 武汉 430070; 2. 昆明理工大学 现代农业工程学院, 昆明 650224)

摘要: 测定了紫脉过路黄、临时救和过路黄的 nrDNA ITS 序列, 并分析了珍珠菜属过路黄组 17 个物种的遗传距离及亲缘关系。结果表明, 过路黄组植物的 ITS 序列长度在 620~628 间, 一致性高达 90.59%, 种间遗传距离为 0.002~0.199。系统发育树表明: (1) 紫脉过路黄、临时救和小茄亲缘关系较近; (2) 大叶过路黄、落地梅和过路黄亲缘关系较近; (3) 山萝过路黄、贯叶过路黄、管茎过路黄、叶头过路黄、峨眉过路黄及三角叶过路黄亲缘关系较近。ITS 序列分析结果为组内植物的鉴定、分类及系统进化提供了新的参考。

关键词: 珍珠菜属; 过路黄组; ITS; 系统关系

中图分类号: Q949.773.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)02-0163-04

Phylogenetic relationships of sect. *Nummularia* (*Lysimachia*): evidence from ITS sequences

ZHENG Wei^{1,2}, CHEN Long-Qing^{1*}

(1. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Modern Agricultural Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: The rDNA ITS sequences of *L. rubinervis*, *L. congestiflora* and *L. christinae* were sequenced. The genetic distance and phylogenetic relationship of 17 species from sect. *Nummularia*(*Lysimachia*) were analyzed. The results showed that the length of ITS sequence of sect. *Nummularia* was 620—628 base pairs, the homology was 90.59%, and the genetic distance was 0.002—0.199. The ITS data suggested that: (1) *L. japonica*, *L. rubinervis* and *L. congestiflora* were closely related; (2) *L. fordiana*, *L. paridiiformis* and *L. christinae* were closely related; (3) *L. melampyroides*, *L. perfoliata*, *L. fistulosa*, *L. phyllocephala*, *L. omeiensis* and *L. deltoidea* had close relationship. The ITS analysis provided new reference for the relationship, identification and classification of the species in sect. *Nummularia*.

Key words: *Lysimachia*; *Nummularia*; nrDNA ITS; molecular phylogeny

过路黄组 (sect. *Nummularia*) 属报春花科 (Primulaceae) 珍珠菜属 (*Lysimachia*) 黄连花亚属 (subg. *Lysimachia*), 共 10 系约 51 种, 主要分布于我国华南、华中及西南地区 (陈封怀等, 1989)。过路黄组植物是著名的中草药植物, 含有黄酮类和三萜皂苷类等药用成分, 具有清热利湿、活血化瘀、解毒消痈、抗菌消炎的作用 (常海涛等, 2004)。近年来的研究表明, 过路黄组植物还是十分有前景的抗癌类药用植物 (Yang 等, 2009)。除了具有较高的药用价

值外, 过路黄组植物还是十分优良的乡土园林地被植物, 如过路黄 (*L. christinae*) (Zheng 等, 2009a)、临时救 (*L. congestiflora*) (Zheng 等, 2009b)、紫脉过路黄 (*L. rubinervis*) (Zheng 等, 2009c) 等, 不仅具有漂亮的黄花、较强的铺展能力, 还具有极强的适应性和抗性。目前, 过路黄组植物药用及观赏价值的开发利用程度正在快速提升。

珍珠菜属植物的系统发育一直是研究的热点。在形态学方面, 通过花粉形态和叶表皮纹饰分析了

① 收稿日期: 2011-08-23 修回日期: 2011-12-19

基金项目: 国家自然科学基金 (30771517, 30972019) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771517, 30972019)]

作者简介: 郑伟 (1980-), 男, 湖北宜昌人, 博士, 从事园林植物种质资源研究, (E-mail) yedizhw@yahoo.com.cn。

* 通讯作者: 陈龙清, 博士, 教授, 主要从事园林植物种质资源研究, (E-mail) chenlq0206@163.com。

属内植物的系统关系(邵剑文等,2005)。在分子方面,通过叶绿体 *rbcL* 基因(Anderberg 等,1998)、*trnL-F* 基因及核糖体的 ITS(internal transcribed spacer)序列(Hao 等,2004)分析,认为将珍珠菜属划为紫金牛科(Myrsinaceae)更为科学。同时,以上研究初步认为产于亚洲的过路黄组物种为单系群,但对组内各系之间的物种却没有进行详细的系统分析。核糖体 DNA 的 ITS 序列进化速度快且片段长度不大,不仅可用以分析科、属、亚属和组间的系统发育关系,还可用来分析组内种间(唐绍清等,2004),甚至种内不同地理类群(张宏意等,2008)的亲缘关系。本研究将通过核糖体 DNA 的 ITS 序列,对珍珠菜属过路黄组的物种进行较为详细的系统分析,以期过路黄组植物的亲缘关系、物种鉴定及分类提供参考,为过路黄组植物药用及观赏价值的开发利用奠定一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

从实验地采集临时救、紫脉过路黄及从野外引种驯化选育而成的紫心过路黄(*L. christinae* cv. Zixin)(Zheng 等,2009a)、紫蝶临时救(*L. congestiflora* cv. Zidie)(Zheng 等,2009b)和紫脉临时救(*L. congestiflora* cv. Zimai)的新鲜叶片,带回实验室洗净后剪成小片,用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取、扩增与测序

采用 CTAB 法(Doyle 等,1987)提取 DNA:在 10 mL 离心管中,加入 4 mL 的 CTAB,65 °C 预热。称取幼嫩组织材料 1 g,用蒸馏水冲洗干净,再用灭菌双蒸水冲洗 2 次,放入经液氮预冷的研钵中,加入液氮研磨至粉末状,用干净灭菌不锈钢勺转移粉末到预热的离心管中,混匀后置 65 °C 水浴中保温 30~45 min,并不时轻轻转动试管。加 4 mL 的氯仿/异戊醇,轻轻地颠倒混匀,室温下 10 000 rpm 离心 10 min,移上清至另一新管中。向管中加入 1/100 体积的 RNase A 溶液,置 37 °C 20~30 min。加入等体积异丙醇,会出现絮状沉淀,-20 °C 放置 30 min,12 000 rpm 离心 10~15 min 后回收 DNA 沉淀。用 70%乙醇清洗沉淀 2 次,吹干后溶于 1 mL TE 中。0.7%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。

获取 DNA 后,用特异引物 ITS4(5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5(5'-GGAAG-

TAAAAGTCGTAACAAGG-3') (金思特公司合成)进行 PCR 扩增,扩增程序为 94 °C 预变性 4 min,然后进入如下循环:94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 2 min,25 个循环后,72 °C 延伸 10 min。PCR 反应体系总体积为 50 μ L,其中包含:DNA 模板 2.0 μ L,dNTP 4.0 μ L,10 \times buffer 5.0 μ L,引物 2.0 μ L,Taq 酶 1.0 μ L。最后用含 EB 的 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,并将扩增产物送至金思特公司进行测序。

1.3 DNA 序列分析

测序结果提交到 NCBI 的 GenBank,同时,从 NCBI 查询珍珠菜属黄连花亚属过路黄组其它物种的 ITS 序列(表 1),并以珍珠菜属黄连花亚属 *Verticillatum* 组的 *L. quadrifolia* 作为外类群,采用 Dnaman 软件进行序列比对、遗传距离的计算及系统发育树的构建。

2 结果与分析

所测过路黄、临时救和紫脉过路黄的 ITS 序列提交 GenBank 后获得的登录号如表 1 所示。经过分析,过路黄组植物的 ITS 序列长度在 620~628 bp,其中 ITS1 为 243~247 bp,ITS2 为 218~219 bp。对位排列后,其一致性高达 90.59%。应用 Kimura 双参数计算样品间的 ITS 序列分化程度,过路黄组内样品间的遗传距离介于 0.002%~0.199%之间(表 2)。其中,长梗过路黄、*L. nummularia* 与其它物种的遗传距离较大,最大值存在于长梗过路黄与显苞过路黄之间,为 0.199。小茄、临时救、紫脉过路黄之间的遗传距离较小,最小值存在于小茄与临时救之间,仅为 0.002。

根据 ITS 序列结果,疏节系的小茄、侧枝系的紫脉过路黄和聚花系的临时救亲缘关系较近,一致性达到了 96.59%。厚叶系的大叶过路黄、伞叶系的落地梅和过路黄系的过路黄聚为一支,耳柄系的山萝过路黄和贯叶过路黄、叶头系的管茎过路黄和叶头过路黄、浅环系的峨眉过路黄及疏节系的三角叶过路黄亲缘关系较近。同时,组内其它物种与这三支相对独立。

3 结论与讨论

在中国植物志(陈封怀等,1989)过路黄组的 10

表 1 用于本研究的植物、凭证标本和 GenBank 检索号

Table 1 Plants and vouchers of accession used for this study and their GenBank accession numbers

物种 Species	系 Series	凭证标本 Voucher specimens	GenBank Accession
峨眉过路黄 <i>L. omeiensis</i>	浅环系 <i>Hypericoideae</i>	Hao 224	AF547695
紫脉过路黄 <i>L. rubinervis</i>	侧枝系 <i>Paracladae</i>	Zheng <i>et al.</i> 0811	FJ529520
长梗过路黄 <i>L. longipes</i>	侧枝系 <i>Paracladae</i>	Guo 200012	AF547702
山萝过路黄 <i>L. melampyroides</i>	耳柄系 <i>Elatae</i>	Deng 15945	AF547729
贯叶过路黄 <i>L. perfoliata</i>	耳柄系 <i>Elatae</i>	Guo 20009	AF547701
小茄 <i>L. japonica</i>	疏节系 <i>Deltoideae</i>	Hao 278	AF547687
三角叶过路黄 <i>L. deltoidea</i>	疏节系 <i>Deltoideae</i>	Han 314	AF547719
疏头过路黄 <i>L. pseudo-henryi</i>	叶头系 <i>Phyllocephalae</i>	Guo 20007	AF547698
管茎过路黄 <i>L. fistulosa</i>	叶头系 <i>Phyllocephalae</i>	Ye <i>et al.</i> 3561	AF547703
叶头过路黄 <i>L. phyllocephala</i>	叶头系 <i>Phyllocephalae</i>	Hao 219	AF547693
落地梅 <i>L. paridiiformis</i>	伞叶系 <i>Paridiiformes</i>	Hao 218	AF547692
大叶过路黄 <i>L. fordiana</i>	厚叶系 <i>Fordianae</i>	Ye <i>et al.</i> 3940	AF547705
显苞过路黄 <i>L. rubiginosa</i>	聚花系 <i>Rubiginosae</i>	Hao 226	AF547696
临时救 <i>L. congestiflora</i>	聚花系 <i>Rubiginosae</i>	Zheng <i>et al.</i> 0809	FJ529517
临时救 <i>L. congestiflora</i> 'Zimai'	聚花系 <i>Rubiginosae</i>	Zheng <i>et al.</i> 0810	FJ529518
临时救 <i>L. congestiflora</i> 'Zidie'	聚花系 <i>Rubiginosae</i>	Zheng <i>et al.</i> 0802	FJ529519
过路黄 <i>L. christinae</i>	过路黄系 <i>Drymarifoliae</i>	Hao 203	AF547690
过路黄 <i>L. christinae</i> 'Zixin'	过路黄系 <i>Drymarifoliae</i>	Zheng <i>et al.</i> 0801	FJ529510
金爪儿 <i>L. grammica</i>	金爪儿系 <i>Grammicae</i>	Hao 209	AF547691
<i>L. nummularia</i>	—	Yuan s. n.	AF547708
<i>L. quadriifolia</i> (外类群)	sect. <i>Verticillatum</i>	Douglas s. n.	AF547734

表 2 过路黄组植物间的遗传距离 (Kimura 双参数法)

Table 2 Kimura two-parameter distances of the plants in sect. *Nummularia*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	—																				
2	0.080	—																			
3	0.087	0.008	—																		
4	0.084	0.006	0.008	—																	
5	0.082	0.010	0.011	0.010	—																
6	0.018	0.086	0.089	0.089	0.087	—															
7	0.080	0.046	0.052	0.046	0.050	0.089	—														
8	0.077	0.053	0.059	0.053	0.053	0.086	0.046	—													
9	0.028	0.085	0.089	0.089	0.087	0.031	0.087	0.088	—												
10	0.083	0.103	0.107	0.105	0.105	0.091	0.105	0.109	0.100	—											
11	0.080	0.002	0.006	0.005	0.008	0.086	0.045	0.052	0.085	0.103	—										
12	0.131	0.164	0.168	0.166	0.168	0.141	0.178	0.170	0.153	0.176	0.162	—									
13	0.080	0.046	0.052	0.043	0.046	0.089	0.040	0.050	0.091	0.101	0.045	0.183	—								
14	0.146	0.173	0.180	0.175	0.173	0.148	0.191	0.186	0.156	0.166	0.171	0.113	0.186	—							
15	0.084	0.046	0.051	0.046	0.046	0.091	0.036	0.046	0.091	0.107	0.045	0.176	0.046	0.190	—						
16	0.029	0.087	0.091	0.087	0.087	0.033	0.091	0.093	0.031	0.100	0.087	0.147	0.091	0.158	0.096	—					
17	0.081	0.052	0.057	0.052	0.052	0.088	0.038	0.045	0.088	0.102	0.050	0.164	0.045	0.182	0.038	0.090	—				
18	0.071	0.048	0.053	0.048	0.048	0.073	0.038	0.038	0.078	0.098	0.046	0.170	0.038	0.178	0.045	0.080	0.047	—			
19	0.110	0.077	0.082	0.077	0.076	0.118	0.066	0.076	0.118	0.136	0.075	0.177	0.071	0.191	0.073	0.120	0.061	0.082	—		
20	0.100	0.059	0.064	0.059	0.059	0.108	0.062	0.062	0.106	0.119	0.057	0.194	0.055	0.199	0.057	0.112	0.053	0.057	0.084	—	
21	0.242	0.259	0.262	0.254	0.262	0.249	0.259	0.249	0.251	0.259	0.257	0.208	0.256	0.203	0.269	0.246	0.261	0.269	0.256	0.265	—

1. *L. christinae* 'Zixin'; 2. *L. congestiflora*; 3. *L. congestiflora* 'Zimai'; 4. *L. congestiflora* 'Zidie'; 5. *L. rubinervis*; 6. *L. christinae*; 7. *L. deltoidea*; 8. *L. fistulosa*; 9. *L. fordiana*; 10. *L. grammica*; 11. *L. japonica*; 12. *L. longipes*; 13. *L. melampyroides*; 14. *L. nummularia*; 15. *L. omeiensis*; 16. *L. paridiiformis*; 17. *L. perfoliata*; 18. *L. phyllocephala*; 19. *L. pseudo-henryi*; 20. *L. rubiginosa*; 21. *L. quadriifolia*.

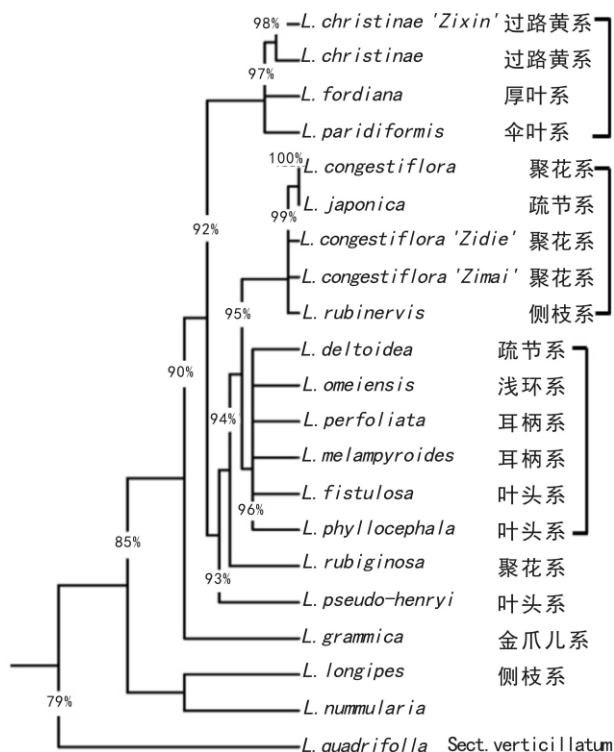


图 1 基于 ITS 序列构建的过路黄组植物的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetics dendrogram of *Lysimachia* sect. *Nummularia* based on ITS sequence

系分类中,紫脉过路黄属于侧枝系。但从形态上来看,紫脉过路黄茎基部匍匐、分枝,花在茎端腋生,排成短缩的总状花序,花梗较短,这些特征与临时救十分相近。尤其是与从野外直接引种驯化选育而成的‘紫脉’临时救,都具有十分明显的红褐色中脉及侧脉。本研究首次报道了紫脉过路黄的 ITS 序列,通过系统发育树分析,发现紫脉过路黄与临时救的亲缘关系较近。另外,小茄主要分布于江苏、浙江、台湾等地,紫脉过路黄主要分布于浙江东南部,两者在地理分布上十分相近。而且,本研究通过基于 ITS 的系统发育树分析,发现两者的亲缘关系较近,并且和临时救及其园艺品种聚为一支。因此,本研究认为将侧枝系的紫脉过路黄和疏节系的小茄一并归入聚花系更为合理。

过路黄系、厚叶系及伞叶系的亲缘关系较近,这与前人的报道一致(Hao 等,2004)。浅环系、耳柄系及叶头系聚为一支,但叶头系的疏头过路黄与叶头过路黄和管茎过路黄亲缘关系较远,从这一支中分裂出来,单独成为一支。同时,在过路黄组中,金瓜儿在形态上跟其它物种差别较大,尤其是茎上部

的叶片为互生,且多分枝。在本研究中,ITS 序列分析结果跟形态分类相符,金瓜儿系单独分裂出来,与组内其它物种的亲缘关系较远。

侧枝系的长梗过路黄与同系的紫脉过路黄亲缘关系较远,且跟原产欧洲的 *L. nummularia* 聚为一支。在形态上,长梗过路黄和紫脉过路黄差别明显,主要表现在长梗过路黄为一年生草本植物,且叶片无彩脉存在。紫脉过路黄为多年生草本植物,且具显著紫脉,而这两个特征与临时救十分相似,为紫脉过路黄并入聚花系提供了更多证据。总之,过路黄组各物种的 ITS 序列结果与中国植物志(陈封怀等,1989)的 10 系分类法存在一定差异,为组内植物的鉴定、分类及系统进化提供了新的参考。

参考文献:

- 陈封怀,胡启明. 1989. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社:1-160
Anderberg AA, Stahl B, Kallersjo M. 1998. Phylogenetic relationships in the Primulales inferred from *rbcL* sequence data[J]. *Plant Sys Evol*, **211**:93-102
Chang HT(常海涛), Kong WL(孔维梁), Tu PF(屠鹏飞). 2004. Chemical and pharmacological advances of study on *Lysimachia* (珍珠菜属植物化学成分及药理作用研究进展)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **29**(4):295-298
Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bull*, **19**:11-15
Hao G, Yuan YM, Hu CM, et al. 2004. Molecular phylogeny of *Lysimachia* (Myrsinaceae) based on chloroplast *trnL-F* and nuclear ribosomal ITS sequences[J]. *Molec Phylog Evol*, **31**(1):323-339
Shao JW(邵剑文), Zhang XP(张小平). 2005. Pollen morphology of *Lysimachia* and its systematic implication(珍珠菜属植物的花粉形态及其系统进化学意义)[J]. *Acta Micropalaeontol Sin* (微体古生物学报), **22**(1):78-86
Tang SQ(唐绍清), Shi SH(施苏华), Zhong Y(钟杨), et al. 2004. Phylogenetic relationships of golden camellia (sect. *Chrysantha*, *Camellia*) in China; evidence from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA(基于 ITS 序列探讨山茶属金花茶的系统发育关系)[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(6):488-492
Yang SL, Lihua TLH, Tian JK, et al. 2009. Anti-tumor constituents of four medicinal plants from *Lysimachia* genus[J]. *Planta Med*, **75**(4):412-412
Zhang HY(张宏意), Liao WB(廖文波), Chen YQ(陈月琴), et al. 2008. Analysis of rDNA ITS sequences of *Sargentodoxa cuneata* (大血藤的 rDNA ITS 序列分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(6):737-741
Zheng W, Liu XQ, Chen LQ. 2009b. *Lysimachia congestiflora* 'Zidie': an ornamental plant with fancy leaves[J]. *Hort Sci*, **44**(6):1771-1772
Zheng W, Xu XD, Zhao KG, et al. 2009a. *Lysimachia christinae* 'Zixin': a new groundcover plant[J]. *Hort Sci*, **44**(2):474-475
Zheng W, Xu XD, Dai H, et al. 2009c. Direct regeneration of plants derived from *in vitro* cultured shoot tips and leaves of three *Lysimachia* species[J]. *Sci Hort*, **122**(1):138-141