

基于 ITS 序列探讨金线草的系统学位置

许崇梅¹, 曲畅游^{2,3}, 于文光^{2,4}, 张学杰², 李法曾^{2*}

(1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 山东师范大学 生命科学学院, 济南 250014; 3. 山东药品食品职业学院, 山东 威海 264400; 4. 山东胜利股份有限公司, 济南 250101)

摘要: 金线草的系统位置一直存在争议, 该试验以 *Triplaris weigeltiana* 为外类群, 采用最大简约法对金线草及其近缘类群的 ITS 序列进行了系统发育分析。结果表明: (1) 金线草和蓼属的春蓼组、刺蓼组形成三个并列的分支, 因此, 金线草没有必要独立成属, 分子证据支持金线草成立为组; (2) 金线草和春蓼组、刺蓼组植物聚在一起, 自展支持率为 96%, 说明它们之间有很近的亲缘关系。

关键词: 金线草; ITS 序列; 春蓼组

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)03-0300-04

Phylogenetic origin of *Antenoron filiforme* inferred from nuclear ITS sequences

XU Chong-Mei¹, QU Chang-You^{2,3}, YU Wen-Guang^{2,4},
ZHANG Xue-Jie², LI Fa-Zeng^{2*}

(1. *WeiFang Medical University*, Weifang 261053, China; 2. *College of Life Sciences, Shandong Normal University*, Jinan 250014, China; 3. *Shandong Drug and Food Vocational College*, Weihai 264400, China; 4. *Shandong Shengli Co. Ltd.*, Jinan 250101, China)

Abstract: Phylogenetic origin of *Antenoron filiforme* remains unknown. Phylogenetic analyses were conducted on sequences of nuclear ITS sequences for species of *A. filiforme* and allies. *Triplaris weigeltiana* was designed as outgroup. The analyses were performed using parsimony reconstruction methods. Some conclusions could be drawn as follows: (1) *A. filiforme* and sect. *Persicaria*, sect. *Echinocaulon* formed three paratactic clades. Therefore, it was unnecessary to accord *A. filiforme* as genus rank and it was appropriate to accord *A. filiforme* as section rank. (2) *A. filiforme* clustered with sect. *Persicaria*, sect. *Echinocaulon* with a bootstrap value of 96%, indicating their close affinity.

Key words: *Antenoron filiforme*; ITS; sect. *Persicaria*

金线草属由 Adanson 于 1763 年建立, 学名为 *Tovara*, 因是晚出异名而被废弃, 现在采用 Rafin 于 1817 年建立的属名 *Antenoron*。金线草属 *Antenoron* 全球共 3 种, 中国仅分布 1 种。金线草以其花柱 2, 花柱果时伸长、硬化等特征区别于其他蓼科植物, 所以, Steward(1930)、Hara(1966)、Tzvelev(1987)、

李安仁等(1998, 2003)、吴征镒等(2003)都承认金线草属。Bentham & Hooker(1880)、Gross(1913)则把金线草归为蓼属的金线草组 sect. *Tovara*。Haraldson(1978)、Ronse Decraene & Akeroyd(1988)、Ronse Decraene 等(2000)根据茎和叶解剖、花被片、果实特征认为金线草与蓼属春蓼组有很近的关系, 也把

收稿日期: 2010-10-27 修回日期: 2011-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(30270107); 潍坊市科技局资助项目(201001012); 潍坊医学院博士科研启动基金[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30270107); Weifang Science and Technology Bureau(201001012); Scientific Research Foundation for the Doctors, Weifang Medical University]

作者简介: 许崇梅(1979-), 女, 山东诸城人, 博士, 从事植物系统及资源分类学研究, (E-mail)xuchongmei2006@yahoo.com.cn.

* 通讯作者: 李法曾, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物系统学及资源学, (E-mail)Lifz@sdu.edu.cn.

金线草成立为蓼属的金线草组。由此可见,金线草的系统位置存在分歧,需要进一步的研究。

ITS 序列已经被非常广泛地用于植物属间以及族间的系统发育分析(崔光芬等,2008;孙爱群等,2008),在确定蓼科植物属间乃至族间的系统发育关系中也得到了广泛应用(Sun 等,2008),但未见有关于金线草 ITS 序列研究的报道。本实验测定了金线草及相关类群的 ITS 序列,以期为解决金线草的系统学问题提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料的分类依据 Flora of China (Li 等,2003),来源见表 1,部分序列来源于 GenBank。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增和测序 总 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法(Doyle & Doyle,1987)。ITS 序列的扩增采用 White 等(1990)报道的引物

ITS1 (5'-AGAAG TCGTAACAAGGTTTCCG-TAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3'),PCR 扩增程序为 94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1.5 min,30 个循环,最后 72 °C 延伸 4 min。ITS 序列的 PCR 扩增产物经用 Pharmacia 系统纯化后直接用于测序反应,测序在 Invitrogen Biotechnology 公司的 ABI 3770 自动测序仪上完成。为保证所测序列的准确性,每一个类群的 ITS 序列分别用 ITS1 和 ITS4 引物对 ITS 序列的正、反链进行测序并校准。

1.2.2 序列的分析 所测序列和从 GenBank 中下载的序列用 ClustalX1.83 排序,排好的序列用 PAUP * 4.0b 软件(Swofford DL,Sinauer.com)进行数据分析。空位(gap)始终作为缺失状态。采用最大简约法分析,简约性(parsimony)分析采用如下选项完成,即树二组重新连接 TBR、启发式搜索 heuristic search、多重性选择 MULPARS、ACCTRAN 优化和 100 次随机附加的重复,用自展法(bootstrap analysis)检验系统树,自展数据集为 1 000 次。

表 1 试验材料及其来源

Table 1 Experimental materials and their sources

类群 Taxa	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	GenBank Accession No.
金线草 <i>Antenoron filiforme</i>	山东艾山	20021234(* SDNU)	JF922106
春蓼 <i>Polygonum persicaria</i>	山东艾山	20021030(SDNU)	JF922105
辣蓼 <i>P. hydropiper</i>	山东艾山	20020716(SDNU)	EF653702
杠板归 <i>P. perfoliatum</i>	山东艾山	20021053(SDNU)	JF922107
尼泊尔蓼 <i>P. nepalense</i>	山东泰山	0203(SDNU)	JF922100
火炭母 <i>P. chinense</i>	华南植物园	20021011(SDNU)	FJ648806
珠芽拳参 <i>P. viviparum</i>	新疆天山	03005(SDNU)	JF922101
支柱拳参 <i>P. suffultum</i>	山东蒙山	20020812(SDNU)	JF922104
准噶尔神血宁 <i>P. songaricum</i>	新疆天山	03004(SDNU)	JF922102
叉分神血宁 <i>P. divaricatum</i>	山东崂山	20020708(SDNU)	JF922103
篇蓄 <i>P. aviculare</i>	山东艾山	2013(SDNU)	EF653684
何首乌 <i>Fallopia multiflora</i>	—	—	FJ514497
蔓首乌 <i>F. convolvulus</i>	—	—	AF040064
—	—	—	AF189734
虎杖 <i>Reynoutria japonica</i>	—	—	HM137446
<i>Triplaris weigeltiana</i>	—	—	—

注: * SDNU. 山东师范大学植物标本室。 Note: * SDNU. Herbarium of Shandong Normal University.

2 结果与分析

2.1 ITS 序列长度及变异

ITS 序列的范围根据已发表的蓼科植物确定。对位排列的长度为 695 bp,包括 357 个可变位点,245 个位点是信息位点。每个种的 ITS 长度及 G+C 含量列于表 2。G+C 含量在 ITS1 区的变化范围

为 58.6%~71.7%,G+C 含量在 ITS2 区的变化范围为 64.3%~79.1%。ITS1 的变异位点有 162 个,信息位点有 114 个;ITS2 的变异位点有 185 个,信息位点有 135 个。PAUP 分析得到的 15 个 ITS 序列间的绝对遗传距离和平均遗传距离见表 3。

2.2 ITS 序列的系统发育分析

用简约法寻找到 822 个简约树,步长为 864,CI 指数为 0.673,RI 指数为 0.605。最大简约法得到

的严格一致树见图 1。采用蓼科植物 *Triplaris weigeltiana* 作为外类群,分支上的数字代表大于 50%的支持率。ITS 序列的严格一致树分成了 2 支,分别为分支 I 和分支 II,分支 I 又进一步分为 2

表 2 ITS1 和 ITS2 的长度及 GC 含量

Table 2 Sequence sizes and percent G+C content of ITS1 and ITS2

类群 Taxa	ITS1		ITS2	
	Size (bp)	% (GC 含量)	Size (bp)	% (GC 含量)
<i>Antenoron fili forme</i>	243	66.3	241	66.4
<i>Polygonum persicaria</i>	242	59.5	244	67.2
<i>P. hydro Piper</i>	242	61.5	239	65.7
<i>P. perfoliatum</i>	200	62.5	240	70.4
<i>P. nepalense</i>	243	60.9	252	60.7
<i>P. chinense</i>	218	62.4	257	65.8
<i>P. viviparum</i>	196	63.2	249	69.4
<i>P. suffultum</i>	197	63.9	254	60.4
<i>P. songaricum</i>	192	64.6	239	67.3
<i>P. divaricatum</i>	192	62.5	240	68.7
<i>P. aviculare</i>	183	63.9	195	75.8
<i>Fallopia multiflora</i>	196	71.2	187	79.1
<i>F. convolvulus</i>	217	71.0	189	75.7
<i>Reynoutria japonica</i>	216	71.7	187	76.4
<i>Triplaris weigeltiana</i>	160	58.6	276	64.3

个亚支,亚支 A 的支持率为 62%,亚支 B 的支持率为 69%。在亚支 A 上,又进一步分为 2 个小分支,其中,头状蓼组的尼泊尔蓼和火炭母聚为一支,自展

分析的支持率为 99%;在另一小分支上,金线草属的金线草和刺蓼组的杠板归以及春蓼组的辣蓼、春蓼形成三个并列的分支,并得到了 96%的支持率。拳参组和分叉蓼组构成了亚支 B。分支 II 为何首乌属、虎杖和蓼属的蒿蓄。

3 讨论

3.1 金线草的系统位置

ITS 序列构建的系统发育树显示金线草和刺蓼组的杠板归以及春蓼组的辣蓼、春蓼聚在一起,并得到了 96%的支持率。从 ITS 序列构建的系统发育树来看,金线草达不到单立属的水平,因此,ITS 的分子证据不支持金线草独立成属,不支持 Steward (1930)、Hara (1966)、李安仁等 (1998, 2003)、吴征镒等 (2003) 的观点。在分子系统树上,金线草与刺蓼组、春蓼组形成 3 个并列的分支,而且从外部形态看,金线草的柱头 2,果时伸长、硬化等。因此,金线草成立为金线草组 sect. *Tovara* 比较合理,这与 Bentham & Hooker (1880)、Gross (1913)、Haraldson (1978)、Ronse Decraene & Akeroyd (1988)、Ronse Decraene 等 (2000) 的观点是一致的。

3.2 金线草和春蓼组、刺蓼组有很近的亲缘关系

在 ITS 的系统发育树上,金线草和春蓼组、刺

表 3 ITS 序列间的绝对遗传距离和平均遗传距离

Table 3 Pairwise genetic distances of nrDNA ITS sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Polygonum nepalense</i>	—	0.203	0.150	0.204	0.222	0.190	0.187	0.254	0.244	0.231	0.223	0.218	0.230	0.202	0.277
2 <i>P. suffultum</i>	122	—	0.214	0.202	0.218	0.212	0.191	0.253	0.249	0.218	0.201	0.198	0.216	0.139	0.278
3 <i>P. chinense</i>	95	124	—	0.163	0.167	0.153	0.149	0.214	0.212	0.210	0.202	0.193	0.218	0.172	0.285
4 <i>P. hydro Piper</i>	131	119	101	—	0.062	0.099	0.081	0.217	0.209	0.216	0.213	0.199	0.207	0.189	0.254
5 <i>P. persicaria</i>	144	129	104	40	—	0.103	0.090	0.215	0.214	0.212	0.214	0.204	0.206	0.191	0.286
6 <i>Antenoron fili forme</i>	123	125	95	64	67	—	0.071	0.204	0.203	0.183	0.179	0.170	0.182	0.176	0.258
7 <i>P. perfoliatum</i>	113	112	86	49	55	43	—	0.195	0.195	0.201	0.181	0.185	0.196	0.181	0.260
8 <i>P. songaricum</i>	150	146	121	127	127	120	114	—	0.047	0.236	0.231	0.228	0.243	0.213	0.295
9 <i>P. divaricatum</i>	145	144	120	123	127	120	114	28	—	0.234	0.231	0.223	0.233	0.207	0.301
10 <i>Fallopia convolvulus</i>	131	118	113	122	120	104	110	128	127	—	0.073	0.067	0.110	0.183	0.245
11 <i>F. japonica</i>	126	108	108	120	121	101	99	125	125	42	—	0.054	0.105	0.187	0.220
12 <i>F. multiflora</i>	119	103	100	108	111	93	97	121	118	37	30	—	0.099	0.173	0.217
13 <i>P. aviculare</i>	124	111	111	111	111	98	102	127	122	59	56	53	—	0.196	0.250
14 <i>P. viviparum</i>	123	84	101	113	115	105	108	124	121	100	102	91	102	—	0.272
15 <i>Triplaris weigeltiana</i>	159	159	158	142	162	145	146	165	169	125	112	110	125	158	—

蓼组聚合在一起自展分析的支持率为 96%,说明金线草和春蓼组、刺蓼组有很近的亲缘关系,它们之间

的亲缘关系也被 Ronse Decraene 等 (2000) 依据果实的微形态所支持。

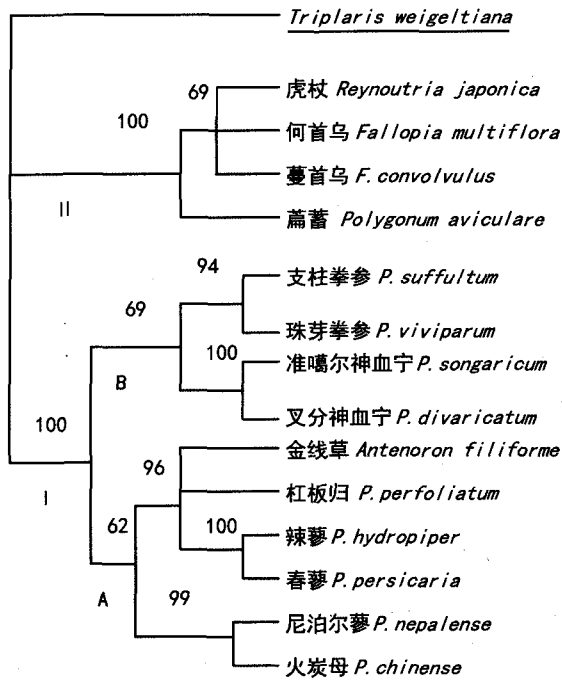


图 1 基于 ITS 序列的严格一致树

Fig. 1 The strict consensus tree of equally parsimony trees based on ITS sequences

分支上的数字代表支持率

Numbers above branches are bootstrap value

参考文献:

- 李安仁. 1998. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 25(1): 1-237
- 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: 164-168
- Adanson M. 1763. Familles des Plantes[M]. Paris: 37
- Bentham G, Hooker JD. 1880. Genera Plantarum[M]. London: Lovell Reeve & Co., 3(1): 88-105
- Cui GF(崔光芬), Wu LF(吴丽芳), Wu XW(吴学尉), et al. 2008. Relationships among species in *Nomocharis* and *Lilium* based on ITS sequences(基于 ITS 序列分析豹子花属与 5 种百合的亲缘关系)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学

报), 28(10): 1 941-1 946

- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phyt Bull*, 19: 11-15
- Gross H. 1913. Beitrage zur Kenntnis der Polygoneen[J]. *Bot Jahrb Syst*, 49: 234-339
- Hara H. 1966. The Flora of Eastern Himalaya[M]. Japan: University of Tokyo: 67-76
- Haraldson K. 1978. Anatomy and taxonomy in Polygonoideae Meisn. emend. Jaretsky[J]. *Symb Bot Upsalienses*, 22(2): 1-95
- Li AR, Bao BJ, Grabovskaya Borodina AE, et al. 2003. Polygonaceae[M]//Flora of China. Beijing, St. Louis: Science Press; Missouri Botanical Garden Press, 5: 277-350
- Ronse Decraene LP, Akeroyd JR. 1988. Generic limits in *Polygonum* and related genera(Polygonaceae) on the basis of flora characters[J]. *Bot J Linn Soc*, 98: 321-371
- Ronse Decraene LP, Hong SP, Smets E. 2000. Systematic significance of fruit morphology and anatomy in tribes Persicarieae and Polygoneae(Polygonaceae)[J]. *Bot J Linn Soc*, 134: 301-337
- Steward AN. 1930. The Polygoneae of Eastern Asia[J]. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*, 5(88): 1-129
- Sun AQ(孙爱群), Xiang H(向红), Wang XY(王绪英). 2008. Sequence analysis of internal transcribed spacer of *Lysimachia* and its systematic utility(珍珠菜 rDNA ITS 序列扩增及分析)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 28(11): 2 172-2 177
- Sun W, Zhou ZZ, Liu MZ, et al. 2008. Reappraisal of the generic status of *Pteroxygonum*(Polygonaceae) on the basis of morphology, anatomy and nrDNA ITS sequence analysis[J]. *J Syst Evol*, 46(1): 73-79
- Tzvelev N. 1987. Notulae de Polygoneis in Flora Orientis Extremi, Novitates Systematicae Plantarum Vascularium[M]. Leningrad: Officina Editoria Nauka, 24: 72-79
- White TJ, Bruns T, Lee S, et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press, 315-322