



邓绍勇, 李康琴, 贾全全, 等. 栀子栽培品种与近缘种的 ITS2 序列分析[J]. 江西农业大学学报, 2021, 43(5): 1140–1148.
DENG S Y, LI K Q, JIA Q Q, et al. ITS2 sequence analysis of cultivars and their related wild species in *Gardenia* genus[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2021, 43(5): 1140–1148.

栀子栽培品种与近缘种的 ITS2 序列分析

邓绍勇, 李康琴, 贾全全, 陈宜均, 朱培林, 杨春霞

(江西省林业科学院, 江西 南昌 330032)

摘要:【目的】栀子属植物是重要的观赏、药用、色素和油用资源植物, 有着悠久的栽培历史。由于生长环境的不同, 以及长期的人工栽培和选育, 使其习性、叶的形状、花的形态、果实的形状及大小等发生诸多变异, 使得栀子栽培群体的变异类型丰富, 并形成了一些较为稳定的品种类型。开展栀子栽培品种和近缘种核糖体 DNA 内部转录间隔区 2(nrDNA ITS2)序列变异程度、遗传距离和亲缘关系研究, 为栀子属植物品种鉴定、遗传育种及多样性保护提供科学依据。【方法】以保存于江西省林业科学院中药资源圃内的栀子 18 个栽培品种和 3 个近缘种共 38 个样品为试验材料, 进行聚合酶链式反应(PCR)直接测序法, 对样品进行 ITS2 片段扩增和双向测序, 所得序列用 Codon Code Aligner v6.0.1 软件拼接后, 采用 Lasergene Edit Seq 11.1 软件进行平均碱基组成百分比统计, 用 MEGA7.0 软件进行分析比对, 获得序列长度、GC 含量以及变异位点, 基于 K2P 模型分析遗传距离, 用 UPGMA 法构建系统聚类树。【结果】序列变异程度分析显示, 狭叶栀子和栀子的 ITS2 序列长度均为 347 bp, GC 含量为 66.86%, 大黄栀子序列长度为 355 bp, GC 含量为 67.61%, 栀子栽培品种序列长度除‘燃叶’、‘金福水栀’为 348 bp 外, 其他品种序列长度和栀子一致, 均为 347 bp, 栀子栽培品种与近缘种间的平均 GC 含量相差不明显, GC 含量为 66.28% ~ 67.15%, 其中‘白蟾’GC 含量最低, ‘雀舌栀子’和‘银边雀舌’GC 含量最高。所有样本 ITS2 序列比对共产生 12 个变异位点, 10 个碱基插入, 其中 8 个碱基插入是大黄栀子所独有的, 且存在 5 个特异的变异位点, 一部分表型特征有共性的品种之间有共同的变异位点, 如植株矮小、叶片小而窄长的品种‘雀舌栀子’和‘银边雀舌’在 50 bp 处, 果实相对较大的品种‘分关 1 号’、‘金福水栀’和‘金元’在 84 bp 处等。一些品种具有特异的变异位点, 如‘白蟾’(133 bp 处)、‘小白蟾’(229 bp 处)等。序列遗传距离分析显示, 栀子属种间遗传距离普遍小于近缘种和品种间的遗传距离, 大于栀子栽培品种之间的遗传距离, 所有样本平均遗传距离为 0.005 5, 大黄栀子和‘白蟾’间遗传距离最大, 为 0.020 6。聚类分析结果显示, 栀子属乔木树种大黄栀子单独成一支, 与栀子属其它种和栀子栽培品种亲缘关系最远, 狭叶栀子和野生栀子所有个体总体表现出较近的亲缘关系。【结论】分析结果表明, 3 种栀子属植物在 ITS2 序列长度和 GC 含量上表现出较高的保守性, 研究发现的品种共同变异位点以及部分品种特异变异位点将对栀子品种鉴定有较大的应用价值。部分聚类结果和以表型数据为基础的数量分类结果类似, 但并没有像数量分类结果那样以花重瓣、大果、小果等性状形成明显的系统分枝, 研究结果对栀子品种起源、资源保护和种质创新等方面有重要的指导价值。

关键词: 栀子属; DNA 条形码; ITS2 序列; 分子鉴定; 亲缘关系

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2021)05-1140-09

收稿日期: 2021-04-19 **修回日期:** 2021-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060356, 31760220)、江西省重点研发计划项目(20203BBF63024)和江西省林业科技创新专项(201706)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32060356, 31760220), Key Research and Development Projects in Jiangxi Province(20203BBF63024), Jiangxi Forestry Science and Technology Innovation Project(201706)

作者简介: 邓绍勇, 副研究员, 博士, 主要从事药用植物资源开发与利用研究, orcid.org/0000-0002-5029-0152, jxforestry@163.com。

ITS2 Sequence Analysis of Cultivars and Their Related Wild Species in *Gardenia* Genus

DENG Shaoyong, LI Kangqin, JIA Quanquan, CHEN Yijun,
ZHU Peilin, YANG Chunxia

(Forest Academy of Jiangxi Province, Nanchang 330032, China)

Abstract: [Objective] *Gardenia* plants are important ornamental, medicinal, pigment and oil resource plants with a long history of cultivation. Due to different growth environment and long-term artificial cultivation and breeding, their habits, leaf shapes, flower shapes, fruit shapes and sizes, etc. have undergone many variations. As a result, the variation types of *G. jasminoides* cultivated population are rich, and some relatively stable cultivars have been formed. This study is to investigate the variation degree of nrDNA ITS2 sequences, genetic distance and genetic relationship of *G. jasminoides* cultivars and their related species, so as to provide scientific basis for cultivar identification, genetic breeding and diversity protection of *Gardenia*. [Method] In the study, a total of 38 samples of 18 cultivars and 3 related species of *Gardenia* preserved in the resource garden of traditional Chinese medicine of Jiangxi Academy of Forestry were used as test materials. The samples were directly sequenced by polymerase chain reaction. The ITS2 fragments of the samples were amplified and sequenced in both directions. After the sequences were spliced by the Codon Code Aligner v6.0.1 software, the average base composition percentage statistics were calculated by the lasergene Edit Seq 11.1 software, and the sequence length, GC content and mutation sites were obtained by Mega 7.0 software. The genetic distance was analyzed based on K2P model, and a phylogenetic tree was constructed by UPGMA method. [Result] The analysis of sequence variation showed that the ITS2 sequence length of *G. stenophylla* and *G. jasminoides* was 347 bp, and the GC content was 66.86%. The sequence length of *G. sootepensis* was 355 bp, and the GC content was 67.61%. Except for 'Ranye' and 'Jinfu Shuizhi', whose sequence length was 348 bp, the sequence length of other cultivars was the same as that of *G. jasminoides*, all of which were 347 bp. There was no significant difference in the average GC contents between *G. jasminoides* cultivars and related species, which ranged from 66.28% to 67.15%, of which the GC content of 'Fortuneana' was the lowest, while that of 'Radicans' and 'Albomarginata' was the highest. There were 12 variable sites and 10 base insertions in ITS2 sequence alignment of all the samples, of which 8 base insertions were unique to *G. sootepensis*, and there were 5 specific variable sites. Some cultivars with common phenotypic characteristics had common variation sites. For example, cultivars with short plants, small and narrow leaves, such as 'Radicans' and 'Albomarginata', were at 50 bp, and cultivars with relatively large fruits, such as 'Fenguan 1', 'Jinfu Shuizhi' and 'Jinyuan', were at 84 bp. Some cultivars had peculiar variation sites, such as 'Fortuneana' (133 bp), 'Xiao Baichan' (229 bp) and so on. Sequence genetic distance analysis showed that the genetic distance among species of *Gardenia* was generally closer than that between related species and cultivars, and farther than that among cultivars. The average genetic distance of all the samples was 0.005 5, and the genetic distance between *G. sootepensis* and 'Fortuneana' was the largest, which was 0.020 6. The results of cluster analysis showed that *G. sootepensis* formed a separate branch, which had the farthest genetic relationship with other species of *Gardenia* and cultivars, and all individuals of *G. stenophylla* and wild *G. jasminoides* exhibited a relatively close genetic relationship. [Conclusion] The results showed that three *Gardenia* species showed high conservation in the length of ITS2 sequence and GC content. The common variation sites of some cultivars and the specific variation sites of some cultivars found in this study would be of great application value to the identification of *Gardenia* cultivars. Some of the clustering results were similar to

the quantitative classification results based on phenotypic data, but there was no obvious systematic branch formed by the characteristics of double petal, big fruit or small fruit. The results have certain guiding value for understanding the origin of *G. jasminoides* cultivars, resource conservation and germplasm innovation.

Keywords: *Gardenia*; DNA barcode; internal transcribed spacer 2 sequence; molecular identification; genetic relationship

【研究意义】我国天然分布梔子属(*Gardenia*)植物有6种^[1],其中仅梔子(*G. jasminoides*)分布广泛且普遍栽培,它是重要的观赏、药用、色素和油用资源植物,有着悠久的栽培历史^[2]。梔子不仅是传统的香花植物,深受人们喜爱,梔子的成熟干燥果实又是常用的大宗中药材原料,入药具有泻火除烦、清热利湿、凉血散瘀的功效,现代药理研究发现梔子具有保肝、抗炎、镇痛及改善心脑血管病等方面的作用^[3]。开展梔子栽培品种和近缘种ITS2序列变异程度、遗传距离和亲缘关系研究,为梔子属植物品种鉴定、亲缘关系提供科学依据,为梔子属植物品种鉴定、遗传育种及多样性保护提供科学依据。【前人研究进展】梔子在长期的栽培利用过程中,形成了丰富稳定的变异类型^[4-5]。在形态组织方面,黄颖雅^[6]研究了梔子和水梔子在组织构造和粉末特征等方面的变异特征,杨雄志^[7]研究了重瓣梔子、水梔子和梔子原种它们的根皮层中石细胞、茎纤维及草酸钙柱晶、方晶和簇晶等的区别,戈群妹等^[8]发现重瓣梔子花具有两类非蜜腺的分泌结构,邓绍勇等^[9]对梔子品种进行了系统的分类整理,并从数量分类视角对梔子栽培品种与近缘种亲缘关系进行了探讨^[10];在细胞学水平方面,杨兆起等^[11]发现梔子和水梔子长短染色体构成不同。郝大翠等^[12]发现大花梔子、狭叶梔子和梔子的核型不同且花粉粒育性从低到高变化,花重瓣的观赏型梔子有染色体数目加倍的现象;在分子水平方面,杨锐培^[13]采用RAPD标记分析江西樟树形态上区别明显的14个梔子样品发现分子聚类结果和表型聚类结果类似,葛菲等^[14]采用RAPD标记分析发现梔子与重瓣梔子亲缘关系最近,与雀舌梔子亲缘关系最远。伍美慧等^[15]发现通过*matK*引物扩增的序列对梔子属种内和种间的鉴定成功率相对更高,认为cpDNA条形码较适合梔子属物种鉴别的。【本研究切入点】ITS2位于5.8S和28S rRNA之间,碱基信息较多且核苷酸顺序变化较大,信息位点丰富。ITS2条形码技术是当前常见的分子鉴定技术之一,其片段普遍较短且在物种水平的变异较快,技术简便高效,不受样品形态性状限制等优点,在药材真伪鉴定、亲缘关系和系统进化等研究中都有广泛的应用^[16]。如吴波等^[17]发现ITS2 DNA条形码可以准确有效地用于吴茱萸药材3种不同基原植物及伪品楝叶吴茱萸的亲缘关系研究和真伪鉴别,陈镜安等^[18]研究得出其可作为鉴定竹节参与其非同属混伪品DNA条形码之一,王丽芝等^[19]同样以ITS2序列分析探讨了川芎的起源以及川芎种质间的亲缘关系。在对梔子进行分类鉴定研究方面,前人除了采用形态及数量分类方法外,伍美慧等^[15]杨中扬等^[19]采用国际通用的植物DNA条形码引物(*ITS2*、*matK*、*rbcL*及*psbA-trnH*)构建了梔子的DNA条形码,黄易等^[20]研究认为ITS2序列较适用于梔子及其近缘茜草科植物、混伪品物种的鉴别。因此,采用ITS2序列分析梔子栽培品种与近缘种的变异情况是很有必要的。【拟解决的关键问题】本研究以梔子18个栽培品种和3个近缘种共38个样品为研究对象,克服了前人对梔子资源DNA条形码鉴定研究中样品过少、研究材料形态分类界定模糊等不足,通过PCR扩增及测序获得ITS2序列数据,系统探讨了梔子栽培品种和近缘种的序列变异程度、遗传距离和亲缘关系,为梔子属植物品种鉴定、亲缘关系分析及品种起源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来源于云南、四川、广西、湖南、江西、浙江和福建等省,除大黄梔子(*G. sootepensis*)外,均栽植保存于江西省林业科学院中药资源圃内,共有梔子18个栽培品种^[9-10]和3个近缘种共38个样品(表1)。试验材料均由邓绍勇副研究员鉴定后,叶片用于DNA的提取。

表 1 试验材料编号、名称及来源
Tab.1 The code, name and origin of *Gardenia* materials

编号	中文名	品种名	来源	编号	中文名	品种名	来源
No.	Name	Cultivar names	Origin	No.	Name	Cultivar names	Origin
1	宽棱水栀	<i>G. Jasminoides</i> ‘Kuanleng Shuizhi’	江西南昌	20	分关 1 号	<i>G. jasminoides</i> ‘Fenguan 1’	福建福鼎
2	荷花	<i>H. Jasminoides</i> ‘Hehua’	江西赣州	21	分关 1 号	<i>G. jasminoides</i> ‘Fenguan 1’	福建福鼎
3	大花栀子	<i>G. Jasminoides</i> ‘Grandiflora’	四川重庆	22	金福水栀	<i>G. jasminoides</i> ‘Jinfu Shuizhi’	浙江安吉
4	大花栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Grandiflora’	四川重庆	23	金福水栀	<i>G. jasminoides</i> ‘Jinfu Shuizhi’	浙江安吉
5	大花栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Grandiflora’	四川重庆	24	狭叶栀子	<i>G. stenophylla</i>	广西上思
6	小白蟾	<i>G. jasminoides</i> ‘Xiao Baichan’	江西赣州	25	狭叶栀子	<i>G. stenophylla</i>	广西上思
7	小白蟾	<i>G. jasminoides</i> ‘Xiao Baichan’	江西赣州	26	狭叶栀子	<i>G. stenophylla</i>	广西上思
8	小白蟾	<i>G. jasminoides</i> ‘Xiao Baichan’	江西赣州	27	狭叶栀子	<i>G. stenophylla</i>	广西上思
9	雀舌栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Radicans’	江西南昌	28	大黄栀子	<i>G. sootepensis</i>	云南西双版纳
10	雀舌栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Radicans’	江西南昌	29	野生栀子	<i>G. jasminoides</i>	江西南昌
11	雀舌栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Radicans’	江西南昌	30	野生栀子	<i>G. jasminoides</i>	江西南昌
12	水栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Longicarpa’	广西金秀	31	野生栀子	<i>G. jasminoides</i>	江西南昌
13	水栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Longicarpa’	广西金秀	32	白盏	<i>G. jasminoides</i> ‘Baizhan’	江西南昌
14	水栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Longicarpa’	广西金秀	33	众恒	<i>G. jasminoides</i> ‘Zhongheng’	江西南昌
15	白蟾	<i>G. jasminoides</i> ‘Fortuneana’	江西南昌	34	舞凝	<i>G. jasminoides</i> ‘Wuning’	江西九江
16	白蟾	<i>G. jasminoides</i> ‘Fortuneana’	江西南昌	35	香雪	<i>G. jasminoides</i> ‘Xiangxue’	浙江嵊州
17	白蟾	<i>G. jasminoides</i> ‘Fortuneana’	江西南昌	36	燃叶	<i>G. jasminoides</i> ‘Ranye’	湖南郴州
18	花叶栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Variegata’	江西南昌	37	银边雀舌	<i>G. jasminoides</i> ‘Albomarginata’	湖南郴州
19	金花栀子	<i>G. jasminoides</i> ‘Chrysanthemum’	江西南昌	38	金元	<i>G. jasminoides</i> ‘Jinyuan’	江西南昌

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 野外采集植株枝梢嫩叶,置于液氮罐内带回实验室,−70 ℃低温冰箱内保存备用。用 Omega 植物基因组 DNA 抽提试剂盒,按其说明步骤提取样品的总 DNA。DNA 浓度和质量由分光光度计 (Nanodrop ND-2000) (thermo electron corporation, USA) 及 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, Lamda Hind III Marker (Mbi Fermentas, Shenzhen, Guangdong, China) 作为标准分子量。

1.2.2 PCR 扩增及测序 PCR 扩增和测序的正向引物为 5′-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3′, 反向引物为 5′-TCCTCCGCTTATTGATAT-3′, PCR 反应体系和程序参考黄易等^[20]的具体方法, 引物合成和 PCR 扩增产物经纯化后的测序工作均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 数据处理

测序后的峰图用 CodonCode Aligner v6.0.1 进行拼接校对, 并将引物区剔除。采用 Lasergene EditSeq 11.1 对所有样品 ITS2 序列的平均碱基组成百分比进行统计, 并用 MEGA7.0 (molecular evolutionary genetics analysis) 进行比对分析, 统计保守位点数和变异位点等, 基于 K2P 模型分析栀子栽培品种与近缘种的遗传距离, 用 UPGMA 法构建栀子栽培品种与近缘种的系统聚类树, 并以 Bootstrap 方法 (1000 次重复) 检验各分枝的支持率。

2 结果与分析

2.1 序列变异程度分析

为分析栀子栽培品种间及与近缘种间的遗传分化程度和差异大小, 本研究采用 EditSeq 11.1 统计了 38 个样品 ITS2 片段的长度范围和平均碱基组成百分比, 分析结果见表 2。狭叶栀子 (*G. stenophylla*) 和栀子的 ITS2 序列长度均为 347 bp, 平均 GC 含量为 66.86%。大黄栀子序列长度为 355 bp, GC 含量为 67.61%。栀子栽培品种序列长度除‘燃叶’、‘金福水栀’为 348 bp 外, 其他品种序列长度和栀子一致, 均为 347 bp, GC 含量为 66.28% ~ 67.15%, 其中‘白蟾’GC 含量最低 (66.28%), ‘金元’、‘分关 1 号’、‘众恒’、

‘舞凝’、‘荷花’、‘水栀子’6个品种GC含量为66.57%,金福水栀GC含量为66.62%,‘燃叶’GC含量为66.67%,‘香雪’、‘大花栀子’、‘小白蟾’、‘花叶栀子’、‘金花栀子’、‘白盏’、‘宽棱水栀’7个品种GC含量为66.86%,‘雀舌栀子’和‘银边雀舌’2个品种GC含量最高(67.15%)。栀子栽培品种间及与近缘种间的平均GC含量相差并不明显。

表2 栀子栽培品种与近缘种ITS2片段的长度范围、平均碱基组成

Tab.2 Length range and average base composition of ITS2 fragment of cultivars and their related wild species in the genus *Gardenia*

编号 No.	中文名 Names	T/%	C/%	A/%	G/%	(C+G)/%	片段长度/bp Fragment length
1	宽棱水栀	16.14	34.58	17.00	32.28	66.86	347
2	荷花	16.14	34.58	17.29	31.99	66.57	347
3~5	大花栀子	16.14	34.58	17.00	32.28	66.86	347
6~8	小白蟾	16.43	34.58	16.71	32.28	66.86	347
9~11	雀舌栀子	15.85	34.87	17.00	32.28	67.15	347
12~14	水栀子	16.43	34.58	17.00	31.99	66.57	347
15~17	白蟾	16.14	34.58	17.58	31.70	66.28	347
18	花叶栀子	16.14	34.58	17.00	32.28	66.86	347
19	金花栀子	16.14	34.58	17.00	32.28	66.86	347
20~21	分关1号	16.14	34.58	17.29	31.99	66.57	347
22~23	金福水栀	16.12	34.53	17.27	32.09	66.62	347 ~ 348
24~27	狭叶栀子	16.14	34.58	17.00	32.28	66.86	347
28	大黄栀子	15.49	36.06	16.90	31.55	67.61	355
29~31	野生栀子	16.14	34.58	17.00	32.28	66.86	347
32	白盏	16.14	34.58	17.00	32.28	66.86	347
33	众恒	16.43	34.29	17.00	32.28	66.57	347
34	舞凝	16.43	34.29	17.00	32.28	66.57	347
35	香雪	16.14	34.58	17.00	32.28	66.86	347
36	燃叶	16.38	34.48	16.95	32.18	66.67	348
37	银边雀舌	15.85	34.87	17.00	32.28	67.15	347
38	金元	16.14	34.58	17.29	31.99	66.57	347

用MEGA7.0对栀子栽培品种与近缘种38条ITS2序列进行对比分析,比对后共产生12个变异位点,10个碱基插入,各分析样品的变异位点详见表3。由表3可知,栀子和狭叶栀子种内各有1个变异位点,‘金福水栀’品种内有3个变异位点;10个碱基插入有8个是大黄栀子所独有的,且存在5个特异的变异位点(分别是187,268,274,286,287 bp处)。分析发现,一部分表型特征有共性的品种之间有共同的变异位点,如植株矮小、叶片小而窄长的品种‘雀舌栀子’和‘银边雀舌’在50 bp处,果实相对较大的品种‘分关1号’、‘金福水栀’和‘金元’在84 bp处等。一些品种还具有特异的变异位点,如‘白蟾’在133 bp处、‘小白蟾’在229 bp处等。

2.2 序列遗传距离分析

采用MEGA7.0软件,根据K2P模型计算栀子栽培品种与近缘种样品序列间的遗传距离(表4),栀子18个栽培品种和3个近缘种共38个样品间K2P平均遗传距离为0.005 5,大黄栀子和‘白蟾’间遗传距离最大,为0.020 6;栀子、狭叶栀子和大黄栀子8个样品间的平均遗传距离为0.005 2,最大遗传距离为0.017 6,其中栀子和大黄栀子间平均遗传距离为0.015 6,狭叶栀子和大黄栀子间平均遗传距离为0.016 1,栀子和狭叶栀子间平均遗传距离为0.001 4;大黄栀子和栀子18个栽培品种间遗传距离介于0.014 6~0.020 6,平均遗传距离为0.017 9,狭叶栀子、栀子和18个栽培品种间遗传距离介于0~0.008 7,平均遗传距离为0.005 1;栀子18个栽培品种间遗传距离介于0~0.008 7,平均遗传距离为0.005 4,其中‘雀舌栀子’、‘银边雀舌’、‘分关1号’、‘众恒’、‘舞凝’、‘金福水栀’、‘金元’等和‘白蟾’间遗传距离较大。

表 3 栀子栽培品种与近缘种 ITS2 片段的变异位点

Tab.3 Variable sites of ITS2 fragment of cultivars and their related wild species in the genus *Gardenia*

编号 No.	中文名 Names	50	84	121	133	166	167	187	229	268	274	279	280	281	282	283	284	286	287	303	340	343	344
1	宽棱水栀	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	C	G	-
2	荷花	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	A	-	C	G
3~5	大花栀子	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	C	G	-
6~8	小白蟾	T	G	C	G	-	-	T	G	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	T	-	C	G
9~11	雀舌栀子	C	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
12~14	水栀子	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	T	-	C	G
15~17	白蟾	T	G	C	A	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	A	-	C	G
18	花叶栀子	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	C	G	-
19	金花栀子	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
20~21	分关1号	T	A	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
22	金福水栀	T	A	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
23	金福水栀	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	C	G	A
24、27	狭叶栀子	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	C	G	-
25~26	狭叶栀子	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
28	大黄栀子	T	G	C	G	C	C	C	A	C	A	G	G	C	T	C	C	A	C	G	-	C	G
29~30	野生栀子	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
31	野生栀子	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	C	G	-
32	白盏	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
33	众恒	T	G	T	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
34	舞凝	T	G	T	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
35	香雪	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
36	燃叶	T	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	T	G	C	G
37	银边雀舌	C	G	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G
38	金元	T	A	C	G	-	-	T	A	A	G	-	-	-	-	-	-	G	T	G	-	C	G

表 4 基于 ITS2 序列的栀子栽培品种与近缘种的 K2P 遗传距离
Tab.4 K2P genetic distance between of *G. jasminoides* cultivars
and their related wild species based on ITS2 sequences

	9~11,37	1,3~5, 18,23, 24,27,31	15~17	2	6~8	12~14, 36	19,25, 26,29, 30,32,35	33,34	20~22, 38	28
9~11,37										
1,3~5,18,23,24,27,31	0.005 8									
15~17	0.008 7	0.008 7								
2	0.005 8	0.005 8	0.002 9							
6~8	0.008 7	0.008 7	0.008 7	0.005 8						
12~14,36	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.002 9	0.002 9					
19,25,26,29,30,32,35	0.002 9	0.002 9	0.005 8	0.002 9	0.005 8	0.002 9				
33,34	0.005 8	0.005 8	0.008 7	0.005 8	0.008 7	0.005 8	0.002 9			
20~22,38	0.005 8	0.005 8	0.008 7	0.005 8	0.008 7	0.005 8	0.002 9	0.005 8		
28	0.017 6	0.017 6	0.020 6	0.017 6	0.020 6	0.017 6	0.014 6	0.017 6	0.017 6	

2.3 梔子栽培品种与近缘种系统聚类树的构建

用UPGMA法基于ITS2序列构建梔子栽培品种与近缘种的系统聚类树。如图1所示,梔子属乔木种大黄花梔子单独成一支,与梔子属其它种以及梔子栽培品种的亲缘关系最远,而狭叶梔子和野生梔子所有个体总体表现出较近的亲缘关系;分枝较密集、枝条近于平展的梔子品种‘众恒’、‘舞凝’聚集在一起;花重瓣、花径较大的‘荷花’、‘白蟾’聚集在一起,而花重瓣、花小、叶片狭小的‘雀舌梔子’、‘银边雀舌’聚集在一起,也有花重瓣、花径相对较小的品种‘小白蟾’、‘燃叶’和花单瓣的‘水梔子’聚集在一起;‘分关1号’和果实个体较大的‘金元’、‘金福水梔’聚集在一起,大果品种‘宽棱水梔’、‘金福水梔’、‘大花梔子’也聚集在一起,表现出较近的亲缘关系;狭叶梔子和梔子既有与果实较小的品种‘香雪’、‘白盏’聚集一起的个体,又有与果实较大的品种‘宽棱水梔’、‘金福水梔’、‘大花梔子’聚集在一起的个体;叶形相似的狭叶梔子和‘雀舌梔子’、‘银边雀舌’并没聚集在一起,‘香雪’、‘白盏’、‘金花梔子’等非传统梔子品种,出现时间相对较短,和野生梔子、狭叶梔子表现出较近的亲缘关系。

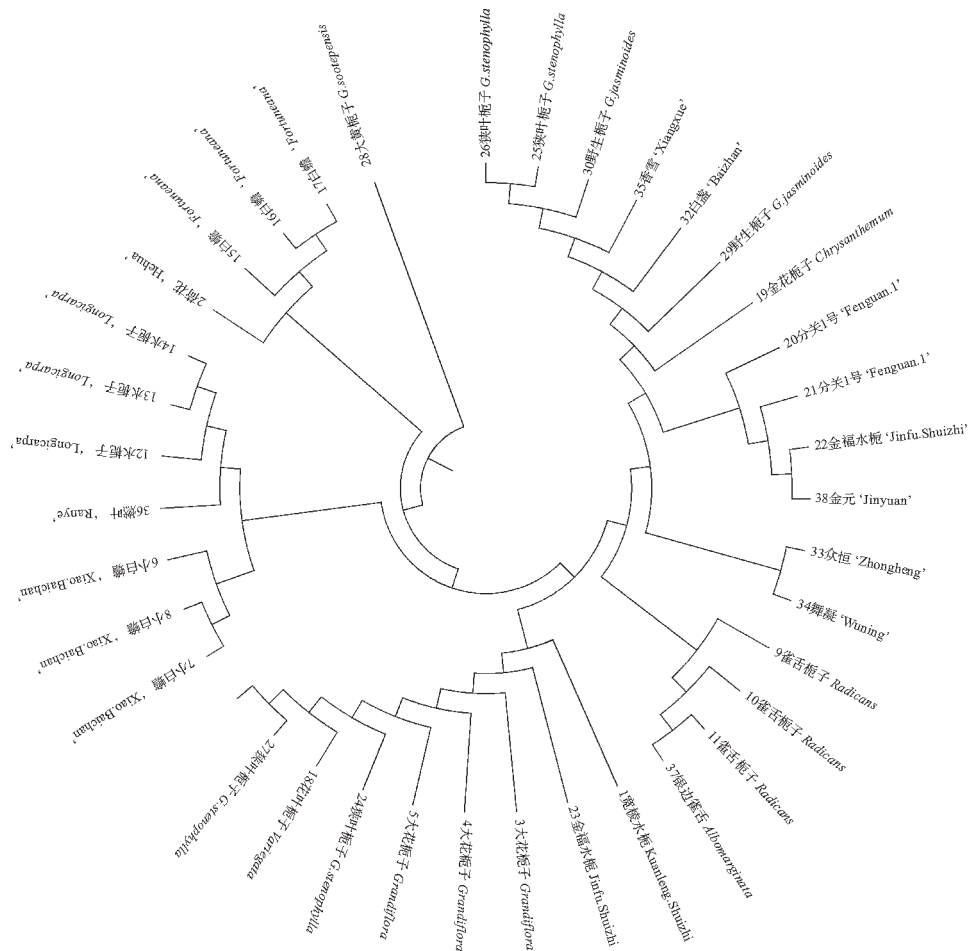


图1 基于ITS2序列构建梔子栽培品种与近缘种的UPGMA树

Fig.1 Construction of UPGMA tree of *G. jasminoides* cultivars and their related wild species based on ITS2 sequences

3 结论与讨论

梔子成熟果实是传统的中药和色素原料,因野生资源无法满足日益增长的市场需要,目前主要靠人工种植。果用梔子在长期人工种植过程中,形成了一些较为稳定且有一定种植规模的品种类型,如广西等地的长果型水梔子,浙江等地的果大棱宽型水梔子,果实相对野生梔子较大且产量高的福建省良种‘分关1号’^[10],这些品种在销售市场上的价格有较大差距,因此,能准确购买到自己选择的品种是种植梔子最为关键的一步,而梔子苗期通过叶片等营养器官性状无法准确可靠地鉴定梔子品种。由于DNA条形码技术不受检材形态性状限制,能在植物幼苗阶段通过叶片样品进行有效的鉴定,伍美慧等^[15]研究了引物序列 $matK$ 、 $rbcL$ 和 $psbA$ 对梔子属植物的鉴定效果,认为 $matK$ 是适合梔子属植物鉴别的较好

DNA 条形码。而杨中扬^[19]研究认为在以 *rbcL* 引物作为区分梔子品种的前提下, *matK*、*ITS2*、*psbA-trnH* 可以依次将梔子的不同种质逐渐细分下去。相对于其它种类的序列片段, 且 *ITS2* 区段具有扩增容易、通用性强和成本低等优点, 是目前普遍认可的植物 DNA 条形码通用序列。黄易等^[20]研究认为 *ITS2* 序列较适用于梔子混伪品的物种鉴别。因此, 在前人探索研究的基础上, 本研究选取了更多性状稳定的梔子品种和 3 个近缘种, 其中大黄梔子是所有供试样品中唯一的乔木树种, 且各部被毛。研究结果表明, 3 种梔子属植物中, 大黄梔子 *ITS2* 序列长度最长, 为 355 bp, 而狭叶梔子、梔子和大部分梔子品种的序列长度均为 347 bp, 序列长度明显长于黄易等^[20]对梔子及其茜草科植物、混伪品种间序列长度为 201 ~ 235 bp 的结果。梔子栽培品种间以及和近缘种间的平均 GC 含量相差也不明显, 表现出较高的保守性, 且均低于黄易等^[20]梔子平均 GC 含量为 74.1% 的结果。同时发现一部分表型特征有共性的品种之间发现有共同的变异位点, 如植株矮小、叶片小而窄长的品种‘雀舌梔子’、‘银边雀舌’在 50 bp 处, 果实相对较大的品种‘分关 1 号’、‘金福水梔’、‘金元’在 84 bp 处等; 一部分品种具有特异的变异位点, 如‘白蟾’在 133 bp 处, ‘小白蟾’在 229 bp 处等, 说明 *ITS2* 序列用于鉴定梔子属品种及近缘种达到了一定的预期效果, 这些研究结果对梔子品种鉴定有较大的应用价值。

在遗传距离和亲缘关系结论方面, 杨中扬^[19]研究得出梔子种内 K2P 距离介于 0.000 ~ 0.011, 种内平均 K2P 距离为 0.002 5, 黄易等^[20]的研究结果是梔子种内 K2P 距离介于 0.000 ~ 0.005, 种内平均 K2P 距离为 0.002, 其中重庆梔子、四川巴中梔子、水梔子与其他梔子遗传距离较近, K2P 距离为 0.005。本文研究得出梔子 18 个栽培品种和 3 个近缘种共 38 个样品间 K2P 平均遗传距离为 0.005 5, 其中梔子属种间平均遗传距离为 0.005 2, 梔子 18 个栽培品种间遗传距离介于 0.000 0 ~ 0.008 7, 平均遗传距离为 0.005 4, 与前人研究结论基本一致。另外, 梔子属种间遗传距离普遍小于近缘种和品种间的遗传距离, 大于梔子栽培品种之间的遗传距离, 大黄梔子和‘白蟾’间遗传距离最大。系统聚类显示大黄梔子单独成一支, 与梔子属其它种和梔子栽培品种亲缘关系最远, 狭叶梔子并没有和叶型相近的‘雀舌梔子’、‘银边雀舌’聚集在一起, 而和野生梔子表现出较近的亲缘关系; ‘分关 1 号’和果实个体较大的‘金元’、‘金福水梔’聚集在一起, 大果品种‘宽棱水梔’、‘金福水梔’、‘大花梔子’也聚集在一起, 表现出较近的亲缘关系; ‘香雪’、‘白盏’、‘金花梔子’等非传统梔子品种, 出现时间相对较短, 和野生梔子、狭叶梔子表现出较近的亲缘关系。部分聚类结果和以表型数据为基础的数量分类结果类似, 但并没有像数量分类结果那样以花重瓣、大果、小果等性状形成明显的系统分枝^[10], 研究结果对梔子品种起源、资源保护和种质创新等方面有重要的指导价值。

参考文献 References:

- [1] YE X E, XIA N H. *Gardenia reflexisepala* (Rubiaceae), A new species from Hainan Province, China with Typification of *G. angkorensis* and *G. cambodiana* [J]. *Phytotaxa*, 2016, 257(2): 193-197.
- [2] 陈雅林. 梔子属资源概况及梔子本草学研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
CHEN Y L. Study on resources survey of *Gardenia* and herbalism of *Gardenia jasminoides* J. Ellis [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2018.
- [3] 李晓雅, 吴敏, 王松子, 等. 中药梔子有效成分梔子苷的心血管系统药理作用研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(10): 1-6.
LI X Y, WU M, WANG S Z, et al. Pharmacological effects of geniposide on cardiovascular system of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. *Chinese journal of integrative medicine*, 2020, 40(10): 1-6.
- [4] 曹岚, 刘德文, 戴泽霞. 江西省梔子种质资源现状调查与分析 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(2): 288-290.
CAO L, LIU D W, DAI Z X. Investigation and analysis on the current situation of *Gardenia* germplasm resources in Jiangxi Province [J]. *Lishizhen medicine and materia medica research*, 2008, 19(2): 288-290.
- [5] 周昌华, 张兴翠, 罗健, 等. 山梔子品种资源的综合评价 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 44(3): 13.
ZHOU C H, ZHANG X C, LUO J, et al. Comprehensive evaluation of *Gardenia jasminoides* cultivars resources [J]. *China journal of Chinese materia medica*, 1998, 44(3): 13.
- [6] 黄颖雅. 梔子的混淆品: 水梔子的鉴别 [J]. *广东药学*, 2005, 5(4): 30.
HUANG Y Y. Identification of ‘Shui Zhizi’ which is a counterfeits of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. *Guangdong pharmaceutical journal*, 2005, 5(4): 30.

- [7] 杨雄志. 三种梔子属植物根和茎形态组织学的比较鉴别[J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(4): 289-293.
YANG X Z. Comparative identification on morphology of the roots and stems of *Gardenia* derived from three different species [J]. Chinese journal of modern applied pharmacy, 2005, 22(4): 289-293.
- [8] 戈群妹, 刘婉, 郑兴峰. 重瓣梔子花的分泌结构[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8): 180-182.
GE Q M, LIU W, ZHENG X F. Secretory structure of *Gardenia jasminoides* [J]. Jiangsu agricultural sciences, 2012, 40(8): 180-182.
- [9] 邓绍勇, 朱培林, 王贤荣. 梔子品种分类研究[J]. 南方林业科学, 2018, 46(1): 13-18.
DENG S Y, ZHU P L, WANG X R. Cultivar classification of *Gardenia* plants [J]. Jiangxi forestry science and technology, 2018, 46(1): 13-18.
- [10] 邓绍勇, 杨欢, 朱培林, 等. 梔子栽培品种与近缘种的数量分类[J]. 江西农业大学学报, 2020, 42(1): 92-100.
DENG S Y, YANG H, ZHU P L, et al. Numerical taxonomy of cultivars and their related wild species in the genus *Gardenia* [J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2020, 42(1): 92-100.
- [11] 杨兆起, 程尧楚, 田自强, 等. 梔子染色体核型带型研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 41(10): 588-590.
YANG Z Q, CHENG Y C, TIAN Z Q, et al. Karyological studies on the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. China journal of Chinese materia medica, 1995, 41(10): 588-590.
- [12] 郝大翠, 惠荣奎, 程志号, 等. 药用梔子和二种观赏型梔子的细胞学研究[J]. 北方园艺, 2010, 34(11): 193-196.
HAO D C, HUI R K, CHENG Z H, et al. Cytological study of two ornamental *Gardenia jasminoides* and medicinal *Gardenia jasminoides* [J]. Northern horticulture, 2010, 34(11): 193-196.
- [13] 杨锐培. 基地梔子优良种质的筛选与高产栽培技术研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
YANG R P. Germplasm screen of *Gardenia jasminoides* from a base and study on the highyield cultivation techniques [D]. Guangzhou: Guangzhou university of Chinese medicine, 2014.
- [14] 葛菲, 周至明. 梔子及其近缘类群的随机扩增多态DNA分析[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1917-1918.
GE F, ZHOU Z M. RAPD analysis for *Gardenia jasminoides* and relatives [J]. Lishizhen medicine and materia medica research, 2007, 18(8): 1917-1918.
- [15] 伍美慧, 鲁璨, 崔培梧, 等. 梔子叶绿体DNA条形码的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(2): 86-90.
WU M H, LU C, CUI P W, et al. Identification of *Gardenia* based on cpDNA barcoding [J]. Chinese journal of information on traditional Chinese medicine, 2015, 22(2): 86-90.
- [16] 王丽芝, 谭世强, 孙思杰, 等. 不同产地川芎种质与藁本、辽藁本的ITS2序列分析[J]. 河北农业大学学报, 2017, 40(1): 25-31.
WANG L Z, TAN S Q, SUN S J, et al. ITS2 sequence analysis of germplasms of *Ligusticum sinense* cv. 'Chuanxiong', *L. sinense* Oliv. and *L. jeholense* Nakai [J]. Journal of agricultural university of Hebei, 2017, 40(1): 25-31.
- [17] 吴波, 高丹, 张寿文. 基于ITS2序列的吴茱萸属植物亲缘关系及分子鉴别研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3681-3684.
WU B, GAO D, ZHANG S W. Study on genetic relationship analysis and molecular identification based on the ITS2 sequence of *Evodia rutaecarpa* [J]. China journal of traditional Chinese medicine and pharmacy, 2013, 28(12): 3681-3684.
- [18] 陈镜安, 杨璐, 李荣钊, 等. 基于ITS2的竹节参及其近缘物种和混伪品鉴定评估[J]. 中草药, 2018, 49(15): 3672-3680.
CHEN J A, YANG L, LI R Z, et al. Identification of *Panax japonicus* and its related species or adulterants using ITS2 sequence [J]. Chinese traditional and herbal drugs, 2018, 49(15): 3672-3680.
- [19] 杨中扬. 梔子DNA条形码及HPLC指纹图谱研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
YANG Z Y. Study on DNA barcode and HPLC fingerprint of *Gardenia jasminoides* Ellis [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019.
- [20] 黄易, 唐灿, 傅俊江, 等. 梔子及其近缘茜草科植物、混伪品的rDNA-ITS2序列分析[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(10): 1709-1715.
HUANG Y, TANG C, FU J J, et al. Identification of *Gardenia* and relative plants in Rubiaceae and its adulterants using DNA barcoding method based on ITS2 sequence [J]. Chinese journal of pharmaceutical analysis, 2015, 35(10): 1709-1715.