

用 cpDNA *matK* 基因和 nrDNA ITS 区序列确定 我国特有植物四棱草属的系统位置

施苏华^{①*} 杜雅青^① David Bufford^② 龚 洵^① 黄柳林^① 何航航^① 钟 扬^{③*}

(① 中山大学生命科学院基因工程教育部重点实验室, 广州 510275; ② Harvard University Herbaria, MA 02138, USA; ③ 复旦大学生命科学院生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433. * 联系人, E-mail: lssssh@zsu.edu.cn, yangzhong@fudan.edu.cn)

摘要 测定了我国特有植物四棱草属以及马鞭草科 6 属和唇形科 13 属共 27 个代表种的叶绿体 DNA *matK* 基因和核糖体 DNA ITS 区序列. 应用相对表观衍征分析方法(RASA)对所测 DNA 序列的系统发育信号及所选择外类群的有效性进行了统计评价. 应用最大简约法(MP)、邻接法(NJ)和最大似然法(ML)对 *matK* 和 ITS 序列进行了独立的和联合的分子系统发育分析. 结果表明, 四棱草与三花莠为姐妹群; Contino 等提出的莠属复合群不构成单系类群, 莠属 4 种具有复系演化关系; Contino 系统中的筋骨草亚科形成一个单系分支. 此外, 本文结果支持马鞭草科与唇形科构成复系类群以及白骨壤属从马鞭草科中独立的观点. RASA 分析和多基因联合分析为确定复杂类群间的系统发育关系提供了有效的途径.

关键词 四棱草属 马鞭草科 唇形科 系统发育分析 相对表观衍征分析 cpDNA *matK* 基因 nrDNA ITS 区

四棱草属(*Schnabelia* Hand.-Mazz.)为我国特有种子植物, 含 2 个种, 主要分布于华中、华南和西南山区^[1]. 自从 Handel-Mazzetti 于 1921 年建立该属以来, 其系统位置一直存有争议. 按 Handel-Mazzetti 的意见, 四棱草属隶属于马鞭草科(Verbenaceae), 并与莠属(*Caryopteris*)相近. 陈介^[2]和《云南植物志》^[3]均采用这一观点. 裴鉴^[4]以四棱草属的子房深裂为依据, 主张将其归入唇形科(Lamiaceae), 并认为该属与筋骨草属(*Ajuga*)和香科科属(*Teucrium*)亲缘关系较近. 《中国植物志》^[5]也将四棱草属归于唇形科. 张遂申等^[6-9]通过比较四棱草属及其近缘属叶片毛状体微形态和叶表皮结构等特征, 认为四棱草属可能处于唇形科与马鞭草科系统演化框架内的中间过渡类型. 尽管已有一般形态学、孢粉学、解剖学、微形态学和地理分布等方面的研究工作, 但四棱草属的系统位置问题仍未得到很好的解决^[10]. 究其原因, 主要是四棱草属的形态解剖和花粉特征等经典分类学性状与马鞭草科与唇形科中的部分属均有重叠. 加上研究材料所限, 国外也缺乏对该属植物的深入研究.

近 10 年来, Cantino 等人^[10,11]和 Huang 等人^[12]对马鞭草科和唇形科进行了系统的比较研究和初步的分子系统学分析, 认为 2 个科中的部分类群(包括四棱草属、*Trichostema* 属和莠属部分种)可组成一个复合群, 这为重新审视相关类群的系统位置提供了线

索. 近来, 我们测定了上述两科的叶绿体 DNA *matK* 基因和核糖体 DNA ITS 区序列, 据此对四棱草属等有争议的类群进行分子系统发育分析, 结果初步表明, 四棱草属与马鞭草科莠属若干种相近, 同时也认为有必要采用更多的 DNA 序列以及更细致的分析手段, 才能确定四棱草属的系统位置及相关类群间的系统发育关系^[13].

1 材料与方法

(i) 植物材料. 采集四棱草属代表种四棱草(*Schnabelia oligophylla*), 并从马鞭草科和唇形科 19 个属中选取 27 个代表种. 新鲜叶片取自广东、云南等地及美国北卡罗来纳州和宾夕法尼亚州的野生及栽培植物, 用硅胶干燥保存备用(凭证标本均存于中山大学标本馆, 凭证号见表 1).

(ii) DNA 序列. 用改进的 CTAB 法提取总 DNA^[14]. *matK* 基因的 PCR 扩增引物采用 MG15 和 MG1, 测序引物为 MS4R, MS5R, MS2F, *matK*-1470R, *matK*5 和 *matK*F6^[15]. ITS1 和 ITS2 间隔区以及 5.8S 编码区扩增引物为 ITS4 和 ITS5^[16]. 扩增产物用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(CN28104, QIAGEN)纯化, 用 BigDye 循环测序试剂盒在 ABI 377 自动测序仪上测定 DNA 序列. 序列对齐排列采用 Clustal-X 程序^[17], 并经人工检查与校正. 间隔(gap)作为缺失数据.

表 1 本研究所用代表种及 GenBank 序列收录号

代表种	凭证标本号	取样栽培地点	GenBank 登录号	
			ITS	matK
筋骨草 <i>Ajuga ciliata</i>	S. H. Shi 739	广州华南植物园	—	AF477756
金仓小草 <i>Ajuga decumbens</i>	X. He 729	广州华南植物园	AF477768	AF315299
	Jian 0399	广州华南植物园	AF477769	—
	H. Zhang 253	海南	AF477770	—
白骨壤 <i>Avicennia marina</i>	Q. Zan 629	深圳	AF477771	AF477757
	X. Gong 658	云南	AF477772	AF315300
心叶石蚕 <i>Cardioteucris cordifolia</i>	S. H. Shi 848	美国宾夕法尼亚	AF477773	—
蕨 <i>Caryopteris divaricata</i>	X. Gong 656	云南	AF477774	AF315294
灰毛蕨 <i>Caryopteris forrestii</i>	X. Gong 0132	云南	AF477775	AF477758
锥花蕨 <i>Caryopteris paniculata</i>	X. Gong 0155	云南	AF477776	AF477759
三花蕨 <i>Caryopteris terniflora</i>	S. H. Shi 732	广州华南植物园	AF477777	AF315297
状元红 <i>Clerodendrum japonicum</i>	C. C. Yuan 616	中山大学	AF477778	AF315298
龙吐珠 <i>Clerodendrum thomsonae</i>	Y. Wang 0157	北京	AF477779	AF477760
海州常山 <i>Clerodendrum trichotomum</i>	X. Gong 655	云南	AF477780	AF477761
簇序草 <i>Craniotome furcata</i>	C. C. Yuan 622	中山大学	AF477781	AF315301
假连翘 <i>Duranta repens</i>	C. Ye 619	中山大学	AF477782	AF477762
<i>Duranta repens</i> cv. 'Variegata'				
<i>Harveya capensis</i> ^{a)}		—	AF120224	—
<i>Harveya purpurea</i> -		—	—	AF051984
全唇花 <i>Holocheila longipedunculata</i>	X. Gong 657	云南	AF477783	AF315304
马缨丹 <i>Lantana Camara</i>	C. C. Yuan 623	中山大学	AF477784	AF315303
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> ^{a)}		—	AJ300215	Z00044, S54304
白苏 <i>Perilla frutescens</i>	C. Ye 618	中山大学	AF477785	—
溪黄草 <i>Rabdosia serra</i>	S. H. Shi 740	广州华南植物园	—	AF477763
掌叶石蚕 <i>Rubiteucris palmata</i>	X. Gong 793	云南	AF477786	—
	X. Gong 0131	云南	AF477787	AF477764
一串红 <i>Salvia splendens</i>	C. Ye 625	中山大学	AF477788	AF477765
四棱草 <i>Schnabelia oligophylla</i>	X. Gong 614	四川	AF477789	AF315296
光柄筒冠花 <i>Siphocranion nudipes</i>	S. H. Shi 43	湖南	—	AF477766
二齿香科科 <i>Teucrium bidentatum</i>	X. Gong 795	云南	AF477790	AF477767
<i>Trichostema dichotomum</i>	J. Massey 858	美国北卡罗莱纳州	AF477791	AF336235
铺地马鞭草 <i>Verbena hybrida</i>	C. C. Yuan 620	中山大学	AF477792	AF315302
马鞭草 <i>Verbena officinalis</i>	Y. Du	广州华南植物园	AF477793	—
山牡荆 <i>Vitex quinata</i>	C. C. Yuan 624	中山大学	AF477794	AF315305

a) 示外类群

(iii) 外类群选择与 RASA 分析. 根据最新的 APG II 系统^[18], 从 GenBank 中选取玄参科(Scrophulariaceae)的 *Harveya purpurea* (matK)和 *H. capensis* (ITS)以及茄科(Solanaceae)的烟草(*Nicotiana tabacum*) (matK 和 ITS)作为系统发育分析的复合外类群. 相对表观衍征分析(relative apparent synapomorphly analysis)(RASA)通过估计序列中的系统发育信号统计量来评价潜在的长枝(long branch)类群和所选复合外类群的有效性. 系统发育信号统计量 tRASA 用 RASA 2.4 软件包计算^[19].

(iv) 系统发育分析. 应用最大简约法(MP)、邻接法(NJ)和最大似然法(ML)对 matK 和 ITS 序列数据集进行独立的和联合的系统发育分析. 所有计算均

采用 PAUP 4.0 软件包完成^[20]. 程序选项及参数为: MP 采用启发式搜索, TBR 枝长交换, MULPARS, ACCTRAN 优化, 500 次随机序列加入, 所有核苷酸等权; NJ 所采用的距离矩阵按非校正 “p” 模式计算, BioNJ 构树; ML 搜索所用核苷酸置换为 HKY 模型, 同时考虑置换速率和核苷酸频率的异质性. 采用分划同质性检验(partition homogeneity test)评价联合分析的可可靠性^[20]; 系统树分枝的支持率为自展(bootstrap)百分率(1000 次重复, 启发式搜索).

2 结果

2.1 DNA 序列及 RASA 分析

所测 24 个种的 cpDNA matK 基因和 nrDNA ITS

区序列的 GenBank 收录号见表 1. 在对位排列矩阵中, *matK* 序列长度为 1362 bp, ITS 序列长度为 713 bp.

对 *matK* 序列, 具外类群和无外类群两种情况下的 tRASA 分别为 9.58 和 4.94; 对 ITS 序列, tRASA 分别为 12.09 和 10.77. 两种序列的 RASA 分析表明, 内类群中不包含具有统计显著性的长枝, 所选外类群也适合进一步的系统发育分析. 在保证系统树拓扑结构不变的情况下, RASA 分析可将联合数据集的总长度由 2057 bp 减少为 1867 bp.

2.2 系统发育分析

应用 3 种系统发育分析方法(MP, NJ 和 ML)分别构建了 *matK* 和 ITS 系统树. 同一种序列用不同方法所获得的系统树在拓扑结构上基本一致, 仅在自展支持率上略有差异. 图 1 所示为用 MP 方法获得的 *matK* 和 ITS 序列独立的严格一致树.

对 *matK* 和 ITS 数据进行分划同质性检验的结果为 $P = 0.01$, 说明可以运用联合分析来提高系统发育的准确性^[21]. 因而, 进一步用 3 种方法对共有 *matK*

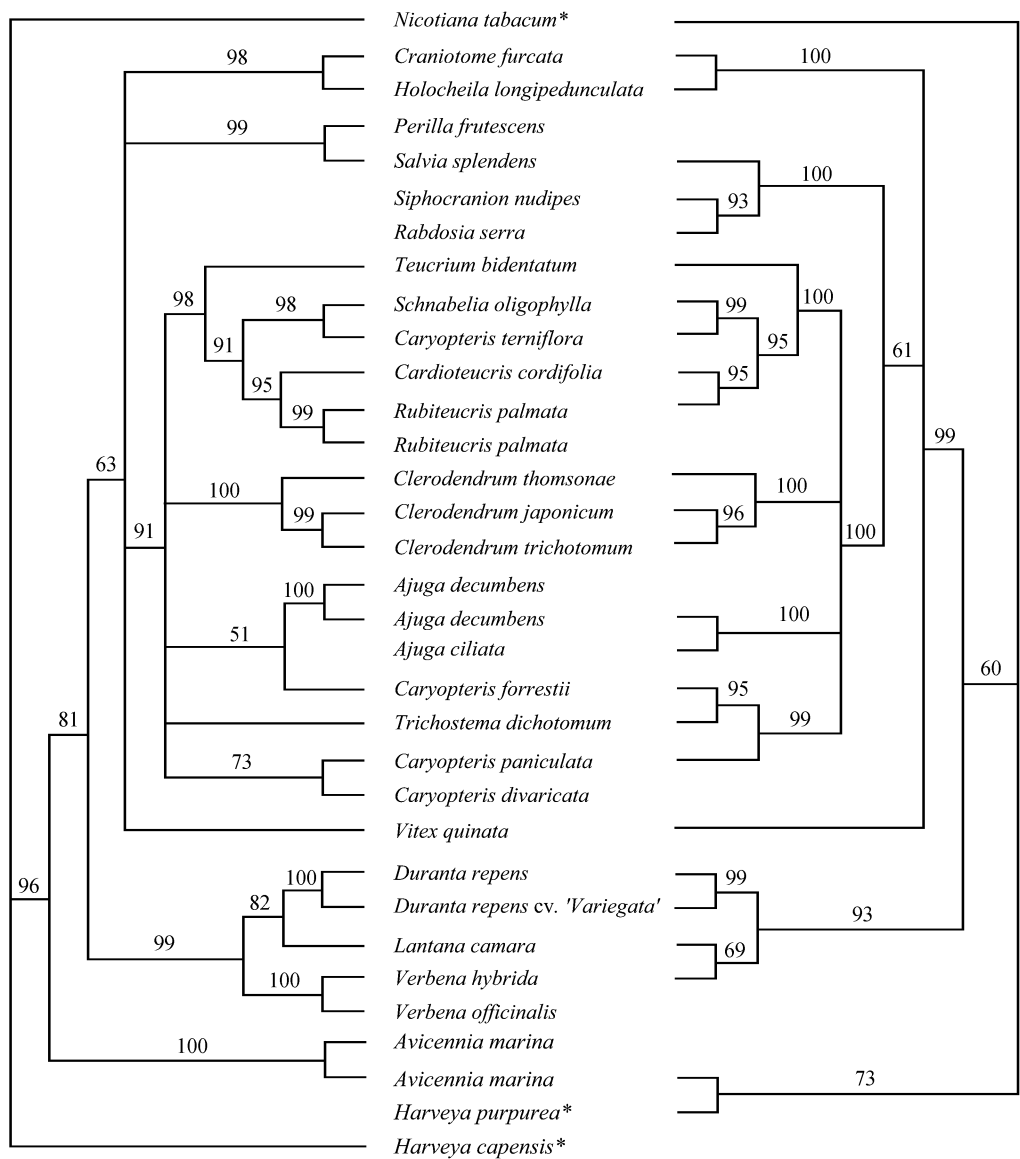


图 1 独立分析 MP 树
图中数字表示分支自展支持率(%), 左为 *matK* 树, 右为 ITS 树

和 ITS 序列的 21 个类群进行了联合分析, 其中 NJ 法产生的系统树用作 ML 方法的初始树. 图 2 所示为联合分析所获得的 MP 和 ML 树.

3 讨论

根据已有研究结果, 本研究取样主要集中于四棱草属的近缘类群, 其中马鞭草科中的近缘属为莸属和桉桐属(*Clerodendrum*), 唇形科中的近缘属则包括心叶石蚕属(*Cardioteucris*)、掌叶石蚕属(*Rubiteucris*)、香科科属、筋骨草属、水棘针属(*Amethystea*)和 *Trichostema* 属. 除水棘针属因取样困难未能采集到之外, 本研究中已包含四棱草属的所有近缘属. 所构建的各种系统发育树均支持四棱草与三花莸(*Caryopteris terniflora*)的姐妹群关系, 自展支持率分别为 98%~100%(图 1 和 2), 但该分支与莸属的其他 3 个种(灰毛莸(*C. forrestii*)、锥花莸(*C. paniculata*)、莸

(*C. divaricata*))关系较远. Cantino 等人^[11]曾根据叶绿体 DNA 序列(*rbcL* 和 *ndhF*)和非分子数据的分支分析结果, 提出莸属为复系类群并建议莸属中的若干种应与四棱草属合并的观点. 对 *matK* 和 ITS 序列的联合分析表明, *Trichostema* 与灰毛莸和锥花莸先构成一个单系分支, 再与莸属复合群的其他类群形成并系关系. 换言之, Contino 等建议的莸属复合群并不构成单系分支, 但本研究支持莸属具有复系演化关系的观点.

另一方面, Contino^[10]修订系统中属于筋骨草亚科(*Ajugoideae*)的 8 个属组成一个单系分支, 其中包括四棱草属与本研究中的莸属 4 种以及香科科属(*Teucrium*)1 种、掌叶石蚕属(*Rubiteucris*)2 种、心叶石蚕属 1 种、桉桐属(*Clerodendrum*)3 种、筋骨草属(*Ajuga*)2 种和 *Trichostema* 属 1 种, 自展支持率为 91%~100%.

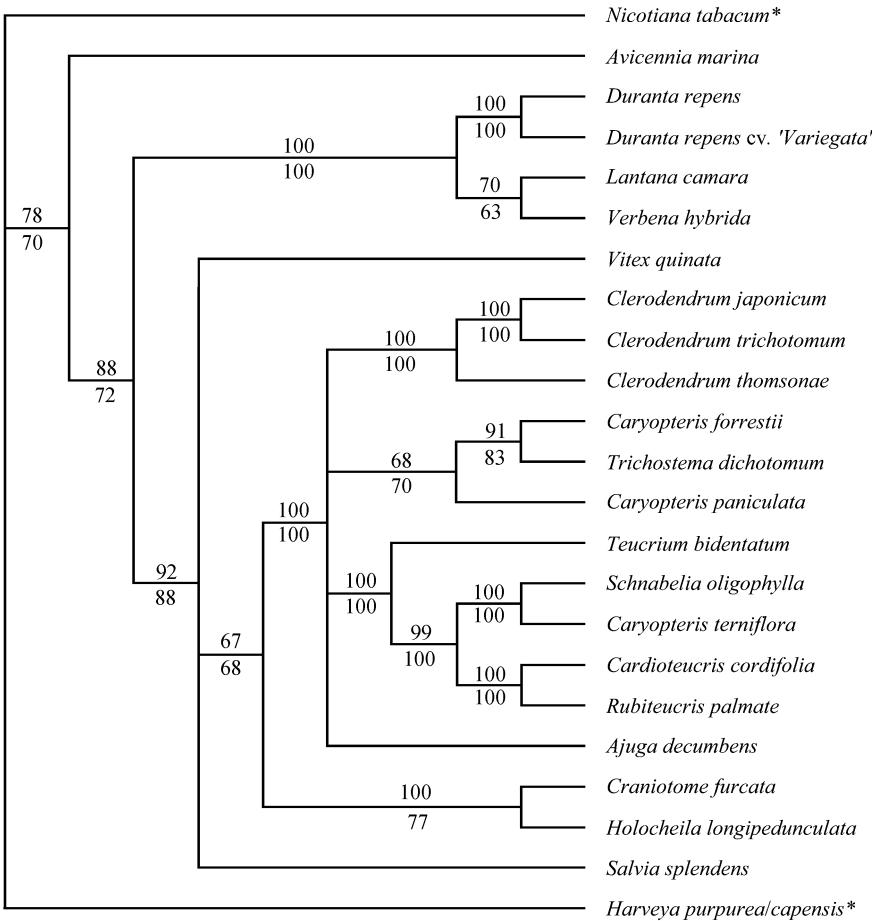


图 2 联合分析系统树
图中数字表示分支自展支持率(%), 上端为 MP 树, 下端为 ML 树

此外,本研究对 *matK* 和 ITS 序列的系统发育分析也支持了马鞭草科与唇形科构成复系类群的观点. 结果还表明,马鞭草科中惟一的红树植物属——白骨壤属(*Avicennia*)位于所有系统树的基出位置,支持了将该属从马鞭草科中独立的观点^[10~12]. 运用分子数据重建复杂类群间的系统发育关系时,一直存在着两个突出的问题:一是外类群的选择,虽然可以采用一些参照系统(如被子植物的 APG 系统),但仍需统计评价所选外类群的有效性以及判断后续分析中是否可能出现长枝吸引等问题^[19,21];二是多基因的联合分析,必须对多基因序列数据集进行分划同质性检验,据此判断是否可以运用联合分析来提高系统发育的准确性^[22]. 本研究显示出 RASA 分析和多基因联合分析是确定复杂类群间的系统发育关系的有效工具,因而在植物分子系统学与进化研究中具有广阔的应用前景.

致谢 感谢 Jim Massey、王建波、唐绍清、何兴金、袁长春等博士提供实验材料; Ki-Joong Kim 博士提供测序帮助. 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 39825104, 30070053, 30170071, 30230030)、广东省自然科学基金(批准号: 001223)、教育部博士点基金(批准号: 20010558013)和骨干教师基金以及美国哈佛大学阿诺德树木园资助项目.

参 考 文 献

1 云南省植物研究所, 中国科学院北京植物研究所. 中国植物志, 第 65 卷第 2 分册, 北京: 科学出版社, 1977. 85~87

2 陈介. 四棱草属系统位置问题的探讨. 植物分类学报, 1964, 9(1): 1~13

3 云南省植物研究所. 云南植物志, 第 1 卷, 马鞭草科. 北京: 科学出版社, 1977. 390~490

4 裴鉴. 中国的马鞭草科植物. 中国科学社研究丛刊, 1932, 7: 8

5 裴鉴, 陈守良. 中国植物志, 第 65 卷第 1 分册, 马鞭草科. 北京: 科学出版社, 1982. 487~489

6 张遂申, 常朝阳, 张文澄, 等. 四棱草属比较形态及其分类系统位置的研究(I . 四棱草属及近缘属叶片毛状体微形态). 西北植物学报, 1994, 14(4): 255~258.

7 张文澄, 吕海亮, 张遂申. 四棱草属比较形态及其分类系统位置的研究(II . 四棱草属及近缘属叶片宏观结构). 西北植物学

报, 1995, 15(2): 110~115

8 吕海亮, 张文澄, 张遂申. 四棱草属比较形态及其分类系统位置的研究(IV . 四棱草属及其近缘属叶表皮结构特征). 西北植物学报, 1996, 16(3): 245~250

9 吕海亮, 张文澄, 张遂申. 四棱草属比较形态及其分类系统位置的研究(V . 四棱草属及近缘属茎和叶柄的解剖). 西北植物学报, 1997, 17(2): 233~237

10 Cantino P D. Evidence for a polyphyletic origin of the Labiatae. Ann Missouri Bot Gard, 1992, 79: 361~379

11 Cantino P D, Wagstaff S J, Olmstead R G. *Caryopteris* (Lamiaceae) and the conflict between phylogenetic and pragmatic consideration in botanical nomenclature. Syst Bot, 1999, 23: 369~386

12 Huang M J, Freudenstein J V, Crawford D J. Phylogenetic relationships of the *Caryopteris-Trichostema* complex (Lamiaceae) based on *ndhF* sequence data. Amer J Bot, 2000, 87 (Suppl): 174~175

13 Du Y, Shi S, Zhong Y, et al. Phylogenetic position of *Schnabelia* (Lamiaceae): A preliminary analysis of chloroplast *matK* sequences. J Genet Mol Biol, 2001, 12: 138~144

14 Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19: 11~15

15 Hilu K W, Liang H. The *matK* gene: Sequence variation and application in plant systematics. Amer J Bot, 1997, 84: 830~839

16 Shi S, Huang Y, Zhong Y, et al. Phylogeny of the Altingiaceae based on cpDNA *matK*, PY-IGS and nrDNA ITS sequences. Pl Syst Evol, 2001, 230: 13~24

17 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl Acids Res, 1997, 25: 4876~4882

18 Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II . Bot J Linn Soc, 2003, 141: 399~436

19 Lyons-Weiler J, Hoelzer G A, Tausch R J. Relative apparent synapomorphy analysis (RASA) I : The statistical measurement of phylogenetic signal. Mol Biol Evol, 1996, 13: 749~757

20 Swofford D L. PAUP* 4.0. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sunderland: Sinauer Associates, 1999

21 Cunningham C W. Can tree incongruence tests predict when data should be combined? Mol Biol Evol, 1997, 14: 733~740

(2003-03-10 收稿, 2003-05-06 收修改稿)