

孙传伯, 李姚碧琪, 马洋山, 赵群. 基于ITS序列分析霍山石斛及其近缘物种之间的亲缘关系[J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27 (2): 472-477
Sun CB, Li YBQ, Ma YS, Zhao Q. Interspecific relationships among *Dendrobium huoshanense* and its related species based on ITS sequences [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2021, 27 (2): 472-477

基于ITS序列分析霍山石斛及其近缘物种之间的亲缘关系

孙传伯¹ 李姚碧琪^{1,2} 马洋山¹ 赵群¹✉

¹皖西学院生物与制药工程学院 六安 237000

²安徽中医药大学 合肥 230000

摘要 通过分析部分石斛属植物的ITS序列, 研究霍山石斛与其近缘物种之间的亲缘关系, 并分析石斛属的起源及分化时间. 从GenBank下载了1种*Malaxis*属、1种*Liparis*属的ITS核苷酸序列为外群, 27种石斛属的ITS核序列为内群. 经比对应后序列长度为682 bp, 外群及石斛属的A + T含量均高于C + G, 其中序列中有416个变异位点. A + T平均含量为46.4%, C + G平均含量为53.6%. 从系统发育树中看出内群分为6支, 霍山石斛与石斛组中其他物种的亲缘关系最近, 与顶叶组的亲缘关系较近, 而与*Spatulata*组、*Dendrocoryne*组和*Latouria*组的亲缘关系最远. 对石斛属系统发育的分析显示大部分石斛属分组与传统石斛分组相同, 与传统石斛分组不同的是顶叶组的鼓槌石斛、叉唇组和瘦轴组的物种都聚类到石斛组, 顶叶组小黄花石斛与聚石斛可能应该另立新的石斛组. 通过贝叶斯法估算得出石斛属的最近共同祖先时间为21.410 9 Ma, 而石斛组的最近共同祖先时间为16.552 2 Ma, 组内平均分化时间约为7.344 5 Ma. 本研究表明石斛组起源于中新世早期, 组内分化主要发生在中新世后期, 气候的改变可能促使了石斛组内分化. (图1 表2 参27)

关键词 霍山石斛; 石斛属; 近缘物种; ITS序列; 亲缘关系

Interspecific relationships among *Dendrobium huoshanense* and its related species based on ITS sequences

SUN Chuanbo¹, LI Yaobiqi^{1,2}, MA Yangshan¹ & ZHAO Qun¹✉

¹ College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Liu'an 237000, China

² Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China

Abstract Based on the ITS sequence analysis of various *Dendrobium* plants, the interspecific relationships between *Dendrobium huoshanense* and its related species were studied. The origin of *Dendrobium* and the divergence time between *D. huoshanense* and other species were also studied. The ITS nucleotide sequences of one species from *Malaxis* and one species from *Liparis* were downloaded from GenBank as the outgroup, and 27 *Dendrobium* species were used as the ingroup. After comparison, the length of the sequence was 682 bp. The A + T content of the outgroup and *Dendrobium* was higher than the C + G content. There were 416 variable sites throughout the sequences. The average contents of A + T and C + G percentages were 46.4% and 53.6%, respectively. In the phylogenetic tree, the ingroup was divided into six clades. *D. huoshanense* displayed the closest relationship with other *Dendrobium* species and a closer relationship with *D. chrysotoxum*, while it exhibited the furthest relationship with *Spatulata*, *Dendrocoryne*, and *Latouria*. The phylogeny analysis of *Dendrobium* showed that the grouping of the majority of *Dendrobium* is the same as that of the traditional *Dendrobium*. Unlike the traditional groupings, *D. chrysotoxum*, *Stuposa*, and *Breviflores* were clustered in the *Dendrobium* section. *D. jenkinsii* and *D. lindley* were most likely added to members of the new genus *Dendrobium*. Using the Bayesian method, the most recent common ancestor of *Dendrobium* was estimated to occur approximately 21.410 9 Ma. The section *Dendrobium* evolved and diversified from the Upper Miocene and Lower Miocene in 16.552 2 Ma and 7.344 5 Ma, respectively. These results indicate that the *Dendrobium* Group originated in the early Miocene, and divergence within the groups predominantly occurred in the late Miocene. Climate change may have contributed to the division of the *Dendrobium* groups.

Keywords *Dendrobium huoshanense*; *Dendrobium*; related species; ITS; relationship

收稿日期 Received: 2019-02-21 接受日期 Accepted: 2020-06-28

国家自然科学基金面上项目(81872955)、安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2017A403)、安徽省优秀青年人才计划项目(gxyq2018061)和安徽高校自然科学研究重大项目(KJ2016SD61)资助 Supported by the Natural Science Foundation of China (81872955), the Key Science Foundation of High Education of Anhui Province (KJ2017A403), the Project for Excellent Young Talents in Colleges and Universities of Anhui Province (gxyq2018061) and the Major Science Foundation of High Education of Anhui Province (KJ2016SD61)

✉通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhaoqun626@163.com)

霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* 是安徽省大别山区特有的、国家重点保护的名贵中草药, 隶属兰科 Orchidaceae 石斛属 *Dendrobium*, 其主要特征为肉质的直立茎, 长约 3-9 cm, 从下往上逐渐变细, 基部以上粗约 3-18 mm, 颜色为淡黄, 有的具有淡紫色或红色斑点, 干燥以后为淡黄色^[1]。霍山石斛的药效为滋阴清热和生津止渴等^[2]。霍山石斛含多种生物活性物质, 如生物碱、氨基酸和石斛多糖等, 也含有人体必需的微量元素, 如铁、镁、钙和钾等; 而且还具有养精明目、阴阳调和、护肝利胆、补肾壮阳和驻容养颜等作用, 能够促进人体的健康^[3]。

《中国植物志》第十九卷将中国原产的石斛属的 74 个种及 2 个变种分为 12 个组, 主要包括石斛组 Section *Dendrobium*、顶叶组 Section *Chrysotoxae*、禾叶组 Section *Grastidium* 等, 霍山石斛隶属于石斛组^[1]。因其拥有重要的药用价值及观赏价值, 石斛属植物的需求量不断增加, 导致野生资源日益匮乏, 部分种类已濒临灭绝^[4]。石斛属植物形状相似, 很容易混淆, 根据形态及化学特征进行鉴定十分困难, 而植物 DNA 中的一些序列具有种间差异, 因此可以利用植物特定的 DNA 序列作为石斛相似种的鉴别依据。目前通常用核基因组 DNA 和质体基因组 DNA (主要是叶绿体基因组) 对药用植物进行鉴别, 其中, 核糖体 RNA 基因 rDNA 内部转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 已经广泛用于植物的种间鉴别和亲缘关系的研究^[5]。丁小余等建立了枫斗类石斛的 rDNA ITS 全序列数据库, 其中包括霍山石斛一个单倍型的 ITS 序列^[6]。栗丹等测定了霍山石斛的 ITS 序列^[7]。Xiang 等以 5 个 DNA 序列为分子标记 (包括 4 个质体 DNA 标记 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 和 *trnL intron*, 1 个 ITS), 对来自亚洲大陆的 109 种石斛属植物的亲缘关系进行了研究^[8]。王晖等用 ITS 序列成功鉴别霍山石斛、铜皮石斛与铁皮石斛^[9]。刘红梅等运用 ITS 序列将石斛属黑毛组与顶叶组成功鉴别^[10]。高静等运用 ITS 序列作为 DNA 条形码准确鉴别了石斛属的 12 种药用植物^[11]。另外近几年对石斛属系统发育的研究中发现, 与植物志传统分组发现了一定偏差, 卢江杰等发现重唇石斛与细叶石斛应归于石斛组^[12]。白音等对石斛的亲缘关系分析结果判定叉唇石斛应归于石斛组^[13]。Wang 等基于 ISSR 标记将叉唇石斛分子于石斛组^[14]。栗丹等基于 ITS 序列发现重唇石斛、钩状石斛、鼓槌石斛与叉唇石斛均归于石斛组^[7]。钟志敏等基于 IRA 序列发现来自顶叶组的鼓槌石斛、密花石斛, 来自石斛属的紫皮石斛、马鞭石斛和来自黑毛组的翅萼石斛聚为一个类群^[15]。本研究将进一步验证石斛分组与传统分组的差异。然而, 以上研究所用霍山石斛及相近物种的相关分子标记的单倍型数目较少, 同时也没有对物种之间的分化时间进行分析。本研究尽可能多地利用基因库中已发布的 ITS 序列为分子标记, 对石斛属的起源与分化以及霍山石斛近缘物种的亲缘关系进行探讨。对于资源濒危的霍山石斛来说, 研究它与近缘物种之间的亲缘关系可为霍山石斛种群遗传结构的研究提供基础, 更有利于寻找新的替代药源。

1 材料与方法

1.1 序列下载

本研究以 Malaxideae 科 *Malaxis* 属的 *Malaxis spicata* 和 *Liparis* 属的 *Liparis kumokiri* 为外群, 内群则包括兰科石斛属 7 个组 27 个物种。内群和外群的分子标记为 ITS 部分序列, 这些序列全部从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 的 GenBank

下载。所有相关序列数据详见表 1。

1.2 分子数据处理

用软件 Clustal X 1.81 对本研究中所有 ITS 基因序列进行对位排序, 同时运用人工校正。用 MEGA 4.0 软件^[16] 统计所得序列的核苷酸组成和变异位点等遗传变异, 按照 Kimura 双参数法, 估算每个核苷酸位点的替换数、物种间的 DNA 序列差异和不同序列间的变异位点与转换颠换比率。

1.3 系统发育分析

用贝叶斯法 (bayesian inference, BI) 对霍山石斛及其他石斛属部分物种进行系统发育分析, 所用分析软件为 MrBayes version 3.1.2^[17]。MrModeltest version 2.3^[18] 软件根据 AIC (akaike information criterion) 检验标准选择数据的最适模型, 所选最适模型是 SYM + I + G。马尔科夫链的蒙特卡洛方法 (markov chains monte carlo, MCMC) 设置为 4 条链并运行 3 000 000 代。为了确定其收敛情况, MCMC 分别运行两次。每 100 代抽取一个样本, 共形成 60 000 个样本。经过分析得知, 整个运行在 100 000 代后达到平稳, 这样, 总共剩余的样本数为 58 000, 用剩余样本重建系统树并估计其后验概率值。

1.4 分化时间

在松散分子钟模式下估算石斛属系统发育树中各个节点的分化时间, 所用软件为 BEAST 1.6.1^[8]。在估计分化时间时引入前面所构建的系统发生树, 运算时用一个时间标定点, 此标定设定在系统树中 *D. cunninghamii* 的最近共同祖先处, 该最近共同祖先的时间为 21.5 ± 0.765 百万年 (Myr)^[19]。用 MrModeltest version 2.3^[18] 软件通过 AIC (akaike information criterion) 检验标准选择的替换模型为 GTR + I + G。贝叶斯分析的 MCMC 运行设为 10 000 000 代, 在舍弃前 200 000 代后, 每 200 代取样一次。在 TRACER version 1.4.1 软件中分析运行后所得的记录文件, 根据有效取样大小 (effective sample sizes, ESS) 判定 MCMC 运行的收敛情况。

2 结果与分析

2.1 DNA 序列分析

用于内、外群的序列经过 Clustal X 1.81 软件比对, 得到包括 Gaps 的序列长度为 682 bp。所有序列 (包括外群有 266 个不变位点和 416 个可变位点) 在可变位点中, 包括 58 个非同义信息位点和 358 个简约信息位点。A + T 的含量平均为 46.4%, C + G 的含量平均为 53.6%, 因此 A + T 的含量低于 C + G 含量。在 MEGA 4.0 软件中, 用 Kimura 双参数法, 通过转换比颠换比分别计算包括外群和内群的所有不同物种之间的转换颠换比值 ($R = S/V$) 为 0.873 至 6.064 之间, 平均值为 1.783。

2.2 系统发育分析

图 1 是通过贝叶斯法, 用 ITS 序列的单倍型构建的石斛属部分物种的系统发育树。N1-N40 是系统树的主要节点, 分类单元 (位于顶点) 是单倍型, 单倍型后面注明了所属物种名称, 在系统树谱系分支的节点处标有相应的后验概率 (posterior probability, PP) 值。总体来说, 整个系统发育树的内群分为 6 个明显的谱系分支。其中第 1 个分支仅由 *Spatulat* 组 *D. cunninghamii* 的 1 个单倍型 cun01 构成。其他 5 个分支分别节点 N3、N4、N6、N8 和 N11 所引导, 支持度很高, 其 PP 值均为 1.00。N3 节点所引导的分支由 *Dendrocoryne* 组的 2 个单倍型构成; 由 N4 引导的分支由 *Latouria* 组的 2 个单倍型构成; 由 N6 引导的分支由顶叶组的 2 个单倍型构成; 由 N8 引导的分支由来自

表1 本研究中霍山石斛及其近缘物种的DNA序列数据来源

Table 1 DNA sequence data sources for *Dendrobium huoshanense* and its related species in this study

属名 Genus	组名 Section	种名 Species	单倍型 Haplotype	GenBank登录号 GenBank number
石斛属 <i>Dendrobium</i>	顶叶组 Section <i>Chrysotoxae</i>	鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i>	chrso01	JN388585
石斛属 <i>Dendrobium</i>	顶叶组 Section <i>Chrysotoxae</i>	鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i>	chrso02	EU477501
石斛属 <i>Dendrobium</i>	顶叶组 Section <i>Chrysotoxae</i>	具槽石斛 <i>D. sulcatum</i>	sul01	KF143517
石斛属 <i>Dendrobium</i>	顶叶组 Section <i>Chrysotoxae</i>	具槽石斛 <i>D. sulcatum</i>	sul02	EU477510
石斛属 <i>Dendrobium</i>	顶叶组 Section <i>Chrysotoxae</i>	小黄花石斛 <i>D. jenkinsii</i>	jen01	JN388595
石斛属 <i>Dendrobium</i>	顶叶组 Section <i>Chrysotoxae</i>	小黄花石斛 <i>D. jenkinsii</i>	jen02	DQ058785
石斛属 <i>Dendrobium</i>	顶叶组 Section <i>Chrysotoxae</i>	聚石斛 <i>D. lindley</i>	lind01	JN388568
石斛属 <i>Dendrobium</i>	顶叶组 Section <i>Chrysotoxae</i>	聚石斛 <i>D. lindley</i>	lind02	GU339114
石斛属 <i>Dendrobium</i>	叉唇组 Section <i>Stuposa</i>	叉唇石斛 <i>D. stuposum</i>	stu01	JN388599
石斛属 <i>Dendrobium</i>	叉唇组 Section <i>Stuposa</i>	叉唇石斛 <i>D. stuposum</i>	stu02	GU339104
石斛属 <i>Dendrobium</i>	瘦轴组 Section <i>Breviflores</i>	重唇石斛 <i>D. hercoglossum</i>	her01	JN388576
石斛属 <i>Dendrobium</i>	瘦轴组 Section <i>Breviflores</i>	钩状石斛 <i>D. aduncum</i>	adu01	JN388580
石斛属 <i>Dendrobium</i>	瘦轴组 Section <i>Breviflores</i>	钩状石斛 <i>D. aduncum</i>	adu02	GU339110
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	矩唇石斛 <i>D. linawianum</i>	lina01	JN388573
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	矩唇石斛 <i>D. linawianum</i>	lina02	EU003117
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	疏花石斛 <i>D. henryi</i>	hen01	EF629323
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	长苏石斛 <i>D. brymerianum</i>	bry01	JN388581
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	长苏石斛 <i>D. brymerianum</i>	bry02	AF362036
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	罗河石斛 <i>D. lohohense</i>	loh01	JN388574
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	罗河石斛 <i>D. lohohense</i>	loh02	AF363024
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	黄花石斛 <i>D. dixanthum</i>	dix01	KF143454
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	黄花石斛 <i>D. dixanthum</i>	dix02	DQ058788
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	off01	GU339109
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	mon01	GU339111
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	mon02	EU003114
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	mon03	AF521615
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	广东石斛 <i>D. wilsonii</i>	wil01	KC205190
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	广东石斛 <i>D. wilsonii</i>	wil02	KF143526
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	霍山石斛 <i>D. huoshanense</i>	huo01	JN388567
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	霍山石斛 <i>D. huoshanense</i>	huo02	EU840696
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	尖刀唇石斛 <i>D. heterocarpum</i>	het01	JN388593
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	尖刀唇石斛 <i>D. heterocarpum</i>	het02	GU339101
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	黄石斛 <i>D. tosaense</i>	tos01	EU003113
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	肿节石斛 <i>D. pendulum</i>	pen01	JN388596
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	肿节石斛 <i>D. pendulum</i>	pen02	GU339115
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	喇叭唇石斛 <i>D. lituiflorum</i>	lit01	AF355571
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	喇叭唇石斛 <i>D. lituiflorum</i>	lit02	HQ114258
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>	chrsa01	JN388584
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>	chrsa02	EU003119
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	齿瓣石斛 <i>D. devonianum</i>	dev02	EU477502
石斛属 <i>Dendrobium</i>	石斛组 Section <i>Dendrobium</i>	齿瓣石斛 <i>D. devonianum</i>	dev03	FJ384735
石斛属 <i>Dendrobium</i>	<i>Spatulata</i> 组 Section <i>Spatulata</i>	<i>D. cunninghamii</i>	cun01	AY240019
石斛属 <i>Dendrobium</i>	<i>Dendrocoryne</i> 组 Section <i>Dendrocoryne</i>	<i>D. aemulum</i>	aem01	EU430372
石斛属 <i>Dendrobium</i>	<i>Dendrocoryne</i> 组 Section <i>Dendrocoryne</i>	<i>D. callitrophilum</i>	cal01	EU430374
石斛属 <i>Dendrobium</i>	<i>Latouria</i> 组 Section <i>Latouria</i>	人面石斛 <i>D. macrophyllum</i>	mac01	AY239979
石斛属 <i>Dendrobium</i>	<i>Latouria</i> 组 Section <i>Latouria</i>	<i>D. bifalce</i>	bif01	EU430373
外群 Outgroup				
<i>Malaxis</i>		<i>M. spicata</i>	malspi	AF521068
<i>Liparis</i>		<i>L. kumokiri</i>	lipkum	AY907087

顶叶组2个物种的4个单倍型构成；由N11引导的分支最大，由石斛组、1个顶叶组物种鼓槌石斛、叉唇组和瘦轴组的单倍型构成，并且后三者聚类在石斛组的不同分支中。

除铁皮石斛、细茎石斛、广东石斛和矩唇石斛外，其他所有物种的同种单倍型都聚类在一起，各自形成单系（PP值均大于0.99）。而重唇石斛和矩唇石斛的单倍型聚类在1个谱系分支中（N30, PP = 1.00）形成单系。铁皮石斛分别聚类到细茎石斛、霍山石斛、广东石斛、矩唇石斛、重唇石斛、尖刀唇石斛、钩状石斛和黄石斛所在的分支中，因此铁皮石斛不是单系。顶叶组小黄花石斛和聚石斛聚为1个支持度非常好的分支（N8, PP = 1.00），且与该组另1个物种具槽石斛的系统发育关系不明确，它们之间分支的支持度非常低（N7, PP = 0.51）。

霍山石斛与石斛组的其他物种首先聚为1个大分支，该分支由节点N21引导（N21, PP = 1.00），然后这个分支又与顶叶组聚为1个支持度很好的分支（N5, PP = 1.00），最后由N5引导的分支又与*Spatulata*组、*Dendrocoryne*组和*Latouria*组在N1聚为一大支。因此，霍山石斛与石斛组其他物种的亲缘关系最近，与顶叶组的亲缘关系较近，而与*Spatulata*组、*Dendrocoryne*组和*Latouria*组的亲缘关系最远。

2.3 分化时间

根据图1所显示的系统发育树，通过贝叶斯法估算石斛属各分支之间的分化时间，系统树的节点用N1至N40表示。表2给出了各节点的分化时间后验分布值以及95%的置信区间。石斛属的最近共同祖先位于N1节点，时间为21.410 9百万年。

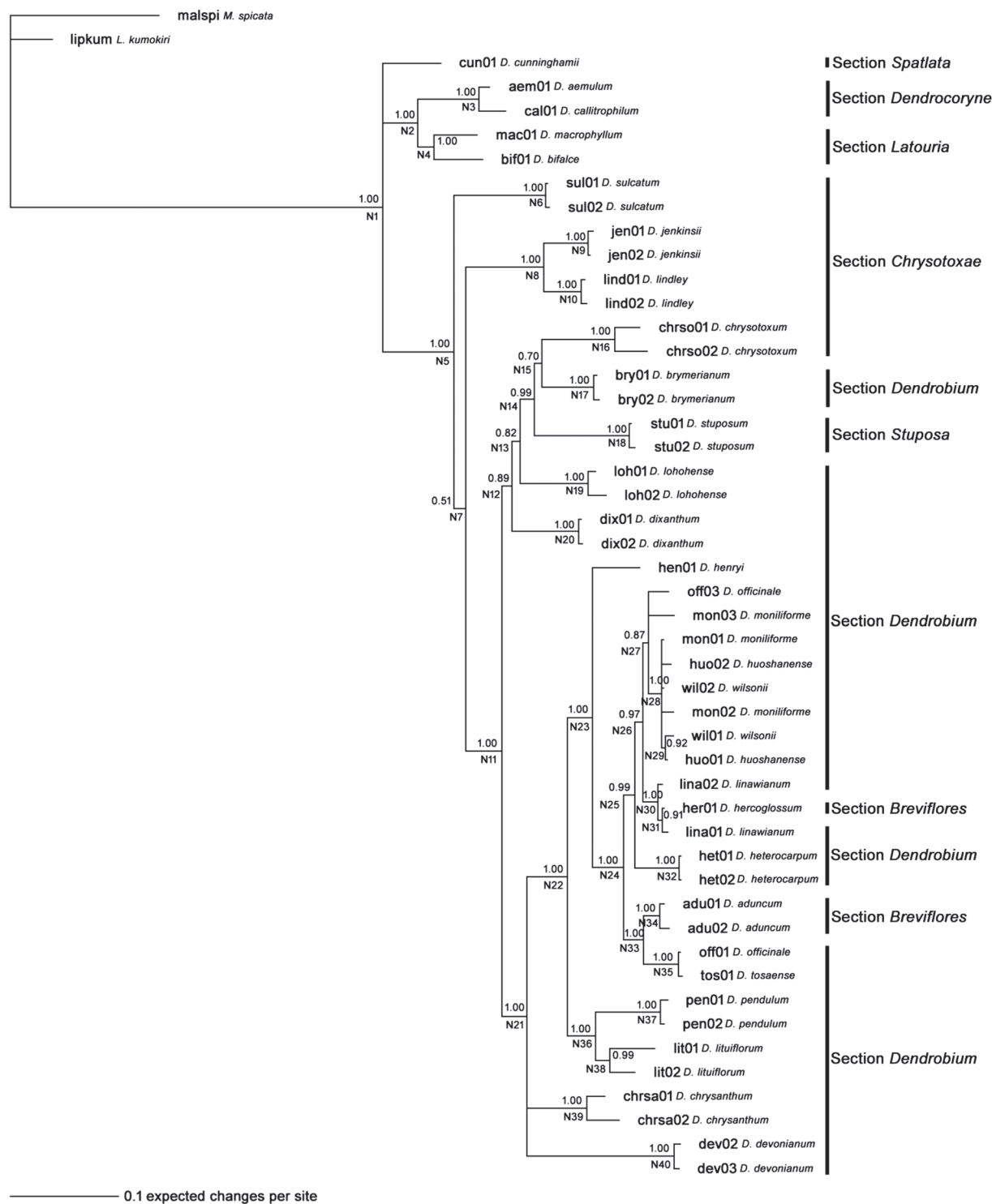


图1 基于ITS序列单倍型贝叶斯分析法重建的霍山石斛及其近缘物种的系统发育树。
Fig. 1 The systematic development tree of the *Dendrobium huoshanense* and its related species reconstructed by its sequence single-fold Bayesian analysis.

前 (Ma), 95%置信区间是19.892 7-22.892 8 Ma. 节点N1、N2、N5和N7的时间表示组间分化时间, 范围在约7.596 7-21.410 9 Ma之间, 平均分化时间约为16.742 0 Ma. 节点N11的时间表示石斛组起源时间, 为16.552 2 Ma, 95%置信区间是12.729 3-20.499 2 Ma. N11-N15、N21-N31、N33、N35和N36为石斛组的组内分化时间, 范围在约0.315 8-16.552 2 Ma之间, 平均分化时间约为7.344 5 Ma.

3 讨论与结论

通过对ITS序列分析结果显示, 外群及石斛属的A + T含量均高于C + G, 这与对其他物种的研究报道^[20-21]相一致. 如果碱基的转换颠换比率小于2.0, 则表明基因位点的突变可能达到饱和^[22]. 本研究碱基的转换颠换比率的平均值为1.783, 小于2.0, 表明ITS序列位点的突变已到达顶值, 那么在构建系

表2 基于贝叶斯分子钟估算的分化时间及其95%置信区间的后验概率分布 (分化时间单位为百万年)

Table 2 The post-mortem probability distribution based on the estimated differentiation time of Bayesian molecular clock and its 95% confidence interval (the differentiation time unit is a million years)

节点序号 Node	分化时间 Divergence time	95%置信区间 The 95% credibility interval
N1	21.4109	19.8927-22.8928
N2	7.5967	5.1784-10.2501
N3	1.9461	0.8342-3.1435
N4	5.3986	3.0428-7.7713
N5	19.0220	15.6084-22.1546
N6	0.2852	0.008-0.7126
N7	18.9384	15.6485-22.192
N8	6.0878	3.2736-9.1972
N9	0.3854	0.0309-0.8791
N10	0.5308	0.0736-1.1206
N11	16.5522	12.7293-20.4992
N12	14.0993	10.1221-18.1614
N13	13.0116	9.2899-17.0621
N14	11.0953	7.552-14.666
N15	10.1582	6.7491-13.7621
N16	3.3223	1.5769-5.1558
N17	0.5621	0.0728-1.2022
N18	0.3800	0.0227-0.8403
N19	1.6936	0.6069-3.01
N20	0.2767	0.0058-0.7034
N21	14.2590	10.5808-17.9763
N22	10.3502	7.5322-13.2666
N23	7.9501	5.5369-10.3451
N24	5.4135	3.7171-7.2105

统发育树时,可能会影响其分支的支持度^[23]。因此,必须谨慎地分析各物种之间的系统发育关系。

根据对石斛属系统发育关系的分析,由于除铁皮石斛、细茎石斛、广东石斛和矩唇石斛外的其他所有物种的同种单倍型都聚类在一起,各自形成单系,因此这些物种为有效种。重唇石斛聚类到矩唇石斛中并和矩唇石斛形成单系,因此重唇石斛不是有效种,而是重唇石斛的一个种内居群。

铁皮石斛与细茎石斛、霍山石斛、广东石斛、矩唇石斛、重唇石斛、尖刀唇石斛、钩状石斛和黄石斛这些石斛之间的系统发育关系并不明确,有研究讨论霍山石斛和细茎石斛是复合

种^[8],本研究支持了这一结论。

由于顶叶组的小黄花石斛和聚石斛与顶叶组其他物种之间的关系不明确,建议把这2个物种从顶叶组中区分出来,另立为1个新的组。而顶叶组的鼓槌石斛、叉唇组和瘦轴组的物种都聚类到石斛组中,这与卢江杰、白音、Wang、栗丹、钟志敏等人的研究^[12-15]相符合,因此建议把它们都归入石斛组中。

霍山石斛与石斛组很多物种之间的系统发育关系无法确定,但可以判定该物种与本研究石斛属各组之间的亲缘关系的远近。其中,霍山石斛与石斛组中其他物种的亲缘关系最近,与顶叶组的亲缘关系较远,而与*Spatulata*组、*Dendrocoryne*组和*Latouria*组的亲缘关系最远,这与其他研究人员的研究结果^[8]一致。由于霍山石斛与同组复合种以及部分物种在ITS序列上没有明显差异,因此很难仅凭ITS序列的碱基特征把它和其他石斛区分开来,要对霍山石斛进行物种鉴定,必须结合其他分子标记才能达到准确的结果。研究表明,亲缘关系越近的物种,其体内所含的化学成分和活性成分越近似^[24],因此可以优先在与霍山石斛亲缘关系较近的物种(如石斛组的大多数种类)中寻找其新的替代药源。

本研究中石斛属的最近共同祖先时间为21.410 9 Ma,由于中新世早期,出现了季风气候,中国也开始产生了东西部之间的自然环境差异,草本植物开始增多^[25-27],这种古地理环境的变化可能导致了石斛属的起源。石斛属的组间分化时间范围约为7.596 7-21.410 9 Ma之间,表明石斛属可能分化于中新世。石斛组起源时间为16.552 2 Ma,石斛组的平均分化时间为7.344 5 Ma,说明石斛组可能起源于中新世早期(upper miocene)和分化于中新世后期(lower miocene)。由于中新世期间中国东部气候逐渐湿润,干旱地带逐渐缩小,草本植物逐渐增多^[25],这种气候可能促使了石斛属各组之间发生了分化以及石斛组内的分化。

通过对部分石斛属植物及霍山石斛的ITS序列分析研究,发现霍山石斛与石斛组内物种亲缘关系最近。但是只用1个ITS为分子标记研究石斛属部分物种之间的系统发育关系,得出的结论不太可靠,在进一步的工作中,可以增加物种的种类,并结合多个分子标记对它们的系统发育关系进行研究,以得到更加可靠的结论,为石斛属的系统发育研究提供依据。

参考文献 [References]

- 吉占和, 陈心启, 罗毅波. 中国植物志(第十九卷 被子植物门 单子叶植物纲 兰科) [M]. 北京: 科学出版社, 1999 [Ji ZH, Cheng XQ, Luo YB. Flora of China (Volume 19 Angiospermae Monocotyledoneae Orchidaceae) [M]. Beijing: Science Press, 1999]
- 魏刚, 顺庆生, 李名海. 中华仙草霍山石斛[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2015: 148 [Wei G, Shun QS, Li MH. *Dendrobium huoshanense* [M]. Chengdu: Sichuan Sci-tech Publishing House, 2005: 148]
- 郑海磊. 九仙至尊, 霍山石斛[J]. 博览群书, 2015 (1): 91-93 [Zheng HL. Nine immortals, *Dendrobium huoshanense* [J]. *Chin Book Rev Monthly*, 2015 (1): 91-93]
- 任洁. 药用石斛的研究进展[J]. 绿色科技, 2017 (23): 172-174 [Ren J. Research progress of medicinal *Dendrobium* [J]. *J Green Sci Technol*, 2017 (23): 172-174]
- Zhao ZL, Zhou KY, Dong H. Characters of nrDNA ITS region sequences of fruits of *Alpinia galangal* and their adulterants [J]. *Planta Med*, 2001, **67** (4): 381-383
- 丁小余, 王峥峥, 徐红. 枫斗类石斛rDNA ITS区的全序列数据库及其序列分析鉴别[J]. 药学报, 2002, **37** (37): 567-573 [Ding XY, Wang ZZ, Xu H. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium* species of "Fengdou" and authentication by analysis of their sequences [J]. *Acta Pharm Sin*, 2002, **37** (37): 567-573]
- 栗丹, 李振坚, 毛萍. 基于ITS序列石斛材料的鉴定及系统进化分析[J]. 园艺学报, 2012, **39** (8): 1539-1590 [Li D, Li ZP, Mao P. Phylogenetic analysis and identification of *Dendrobium* species based on ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence [J]. *Acta Horti Sin*, 2012, **39** (8): 1539-1590]
- Xiang XG, Schuitman A, Li DZ. Molecular systematics of *Dendrobium* (Orchidaceae, Dendrobieae) from mainland Asia

- based on plastid and nuclear sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2013, **69**: 950-960
- 9 王晖, 时玲玲, 周珏, 朱国萍. 基于DNA条形码分析的霍山石斛及其常见混伪品的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2018, **43** (20): 4055-4061 [Wang H, Shi LL, Zhou Y, Zhu GP. DNA barcoding identification of *Dendrobium huoshanense* and its adulterants [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2018, **43** (20): 4055-4061]
- 10 Liu HM, Fang CX, Zhang TM. Molecular authentication and differentiation of *Dendrobium* species by rDNA ITS region sequence analysis [J]. *AMB Express*, 2019, **9**: 53
- 11 高静, 蔡金龙, 陈军文, 谢世清, 杨生超, 张敬丽. 基于ITS序列对12种石斛属植物的鉴定研究[J]. 中药材, 2019, **42** (6): 1255-1260 [Gao J, Cai JL, Chen JW, Xie SQ, Yang SC, Zhang JL. Identification research of twelve *Dendrobium* species based on ITS Sequences [J]. *Chin Med Mat*, 2019, **42** (6): 1255-1260]
- 12 王慧中, 卢江杰, 施农农, 应奇才. 利用RAPD分析13种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系[J]. 中草药, 2006 (4): 588-592 [Wang HZ, Lu JJ, Shi NN, Ying QC. Analysis of genetic diversity and affinity relationships among 13 species of *Dendrobium* Sw. by RAPD [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2006 (4): 588-592]
- 13 武荣花. 我国石斛属植物种质资源及其亲缘关系研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007 [Wu RH. Studies on the germplasm resources of *Dendrobium* in China and their genetic relationships [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry Sciences, 2007]
- 14 白音, 包英华, 王文权, 姜丽丽, 阎玉凝. 国产石斛属植物亲缘关系的AFLP分析[J]. 园艺学报, 2007 (6): 1569-1574 [Bai Y, Bao YH, Wang WQ, Jiang LL, Yan YN. Analysis of the phylogenetic relationship of *Dendrobium* in China by AFLP technique [J]. *Acta Horti Sin*, 2007 (6): 1569-1574]
- 15 钟志敏, 张桂芳, 黄松, 赖小平. 石斛属叶绿体DNA序列的系统发育及变异位点分析[J]. 中草药, 2017, **48** (17): 3605-3611 [Zhong ZM, Zhang GF, Huang S, Lai XP. Phylogenetic and mutation sites analysis on chloroplast DNA sequences in *Dendrobium* Sw. [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2017, **48** (17): 3605-3611]
- 16 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**: 1596-1599
- 17 Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**: 1572-1574
- 18 Nylander JAA. MrModeltest V2 [CP]. Program distributed by the author. Uppsala: Uppsala University, 2004
- 19 Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees [J]. *BMC Evol Biol*, 2007, **7**: 214
- 20 蔡金娜, 周亚开, 徐珞珊. 中国不同地区蛇床的rDNA ITS序列分析[J]. 药学报, 2000, **35** (1): 56-59 [Cai JN, Zhou YK, Xu LS. Ribosomal DNA ITS sequence analyses of *Cnidium monnieri* from different geographical origin in China [J]. *Acta Pharm Sin*, 2000, **35** (1): 56-59]
- 21 张利, 周永红, 丁春邦. 基于ITS序列分析仲彬草属植物的亲缘关系[J]. 西北植物学报, 2007, **27** (3): 490-496 [Zhang L, Zhou YH, Ding CB. The phylogenetic relationships of *Kengyilia* species based on evidences from ITS sequences [J]. *Acta Bot Bor Occid Sin*, 2007, **27** (3): 490-496]
- 22 唐庆华, 刘昌利, 刘应红, 赵群. 基于生物信息学对部分鸡形目鸟类系统发生关系的研究[J]. 生物技术世界, 2013 (1): 39-40+42 [Tang QH, Liu CL, Liu YH, Zhao Q. Study on the relationship between some chicken-shaped bird systems based on bioinformatics [J]. *Biotechnol World*, 2013 (1): 39-40+42]
- 23 Knight A, Mindell DP. Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of Fea's viper [J]. *Syst Biol*, 1993, **42** (1): 18-31
- 24 黄璐琦, 肖培根. 分子生药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008 [Huang LQ, Xiao PG. Molecular Pharmacognosy [M]. Beijing: Chinese Medicine Press, 2008]
- 25 张兰生, 万修琦. 中国古地理. 中国自然环境的形成[M]. 北京: 科学出版社, 2012 [Zhang LS, Wang XQ. Ancient geography of China: the formation of China's natural environment [M]. Beijing: Science Press, 2012]
- 26 姜超, 谭珂, 任明迅. 季风对亚洲热带植物分布格局的影响[J]. 植物生态学报, 2017, **41** (10): 1103-1112 [Jiang C, Tan K, Ren MX. Effects of monsoon on distribution patterns of tropical plants in Asia [J]. *Acta Phytoecol Sin*, 2017, **41** (10): 1103-1112]
- 27 周渐昆, 黄健, 丁文娜. 若干重要地质事件对中国植物区系形成演变的影响[J]. 生物多样性, 2017, **25** (2): 123-135 [Zhou ZK, Huang J, Ding WN. The impact of major geological events on Chinese flora [J]. *Biodiv Sci*, 2017, **25** (2): 123-135]