

基于叶绿体 *rps16* 基因和核基因 ITS 片段研究 肉苁蓉属系统位置

李汐^{1*}, 祝铭^{2,3*}, 孙延霞^{2,3}, 钟扬^{1,4**}, 李建强^{2**}

(1. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433; 2. 中国科学院武汉植物园, 中国科学院特色农业重点实验室, 武汉 430074;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 4. 西藏大学生物多样性与地生物学研究所, 拉萨 850000)

摘要: 在前人对列当科系统发育研究的基础上, 追加了肉苁蓉属 (*Cistanche*) 的基因序列数据, 运用最大简约法、最大似然法和贝叶斯推断方法探讨了其在列当科中的系统位置及列当科中属间关系。基于 *rps16* 基因序列及 *rps16* + ITS 联合序列建立了列当科系统发育树, 结果显示, 肉苁蓉属、列当属 (*Orobanche*) 以及草苁蓉属 (*Boschniakia*) 聚在同一进化枝内, 肉苁蓉属和列当属表现出最近亲缘关系; 列当科中的全寄生类群、半寄生类群和非寄生类群分属在 3 个不同分支中。

关键词: 列当科; 肉苁蓉属; *rps16*; ITS; 系统发育树

中图分类号: Q949.778.3

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2012)05-0431-06

Systematic Position of *Cistanche* (Orobanchaceae) Based on cpDNA *rps16* and ncDNA ITS Sequences

LI Xi^{1*}, ZHU Ming^{2,3*}, SUN Yan-Xia^{2,3}, ZHONG Yang^{1,4**}, LI Jian-Qiang^{2**}

(1. Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China; 4. Institute for Biodiversity Science and Geobiology, Tibet University, Lhasa 850000, China)

Abstract: Based on previous study of Orobanchaceae, we added sequence data of the genus *Cistanche*, used maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference to perform phylogenetic analysis, and investigated the systematic position of *Cistanche* in Orobanchaceae, as well as the generic relationships within Orobanchaceae. The phylogenetic trees respectively basing on sequences of *rps16* and *rps16* + ITS revealed that *Cistanche*, *Orobanche*, and *Boschniakia* formed a one single clade, *Cistanche* was a sister to *Orobanche*, and holoparasitic, semiparasitic and non-parasitic taxon in Orobanchaceae fell into three separate clades.

Key words: Orobanchaceae; *Cistanche*; *rps16*; ITS; Phylogenetic tree

由于叶绿体基因组具有结构及基因含量比较保守等优点, 其序列被广泛用于植物系统发育研究。而对于许多寄生植物而言, 由于其光合作用很弱或不进行光合作用而使其叶绿体基因组的基因含量相对于光合作用植物而言明显减少了许多。这便影响了人们对寄生植物类群之间进化关系的研究^[1]。

广义列当科含有 89 属, 约 2061 种, 包含了丰富的非寄生、半寄生和全寄生植物类群^[2]。列当科植物的系统学研究, 可以帮助我们了解寄生植物之间, 以及寄生植物和非寄生植物间的关系。

自从 *rps16* 内含子序列第一次被用于石竹科蝇子草族 (*Sileneae*) 的系统发育研究以来^[3], 便被越来越

收稿日期: 2012-04-27, 修回日期: 2012-05-18。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070197)。

作者简介: 李汐(1986-), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 研究方向为寄生植物叶绿体基因组学研究。

* 同等贡献作者(The two authors contributed equally to this work)。

** 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yangzhongfudan@hotmail.com; lijq@wbqcas.cn)。

越广泛地应用于许多被子植物的系统发育研究^[4-7]。

前人对于列当科全寄生植物肉苁蓉属(*Cistanche*)的系统学位置一直存在争议^[8-12]。前人的观点大体上归成两类:一类支持肉苁蓉属和列当属(*Orobanch*)亲缘关系较近;还有一类支持肉苁蓉属和草苁蓉属(*Boschniakia*)关系较近^[8]。

肉苁蓉属植物是名贵的中药材,一般寄生在疏松沙地中的梭梭树的根上,吸收梭梭根的分泌物,完全依靠寄主的水分和养分生活,享有“沙漠人参”的美称。肉苁蓉属植物由于药用价值高被大量采挖,其数量已急剧减少,现在已经被列入濒危物种^[13]。

本研究用叶绿体 *rps16* 内含子序列和 *rps16* + ITS 联合序列进一步探讨肉苁蓉属的系统学位置以及列当科下的属间关系。

1 材料与方法

1.1 样品采集

用于本研究的肉苁蓉属实验材料系复旦大学生命科学学院的王庆彪于 2007 年采于中国北部的内蒙古自治区乌海市。凭证标本保存在复旦大学生命科学学院标本馆,用于本研究的类群及相关信息见表 1。

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒(Plant Genomic DNA Kit)对肉苁蓉(*Cistanche deserticola*)进行总 DNA 的提取。

我们用 3 对引物完成了肉苁蓉属 *rps16* 基因的扩增,所用引物如下:

rps16f1 和 *rps16r1*^[14]; *trnQ* (5'-GCGTGGC-CAAGYGGTAAGGC-3') 和 *rps16* (5'-GTTGCTT-TYACCACATCGTTT-3'); *trnK* (5'-TAAAAGC-CGAGTACTCTACCGTTG-3') 和 *rps16r* (5'-AAT-TAAATGGCAAATGGG-3')。

PCR 反应体系采用 TIANGEN 公司的 2 × *Taq* PCR MasterMix 反应体系: 25 μL MasterMix (2.5 mmol/L), 正反向引物(10 μmol/L)各 2 μL, 1 μL 总 DNA (10 μmol/L), 20 μL ddH₂O。

反应程序如下: ①预变性 94℃ 2 min; ②变性 94℃ 20 s; ③退火 46 ~ 60℃ 30 s; ④延伸 72℃ 2 min; ⑤后延伸 72℃ 10 min。其中②~④重复 30 个循环。

PCR 反应产物的纯化及测序工作由上海美吉测序公司(ShangHai Majorbio Bio-pharm Technology Co., Ltd)完成。

1.3 系统发育分析

用于本研究的 DNA 序列首先用 Clustal X 软件进行序列比对,之后通过手工调整完成校对。我们用 Mega 软件、MrBayes v. 3.1^[15] 和 PhyML 3.0 软件分别构建进化树。模型检验通过 Modeltest 完成,最终产生了 GTR + I + G 模型。

包括了肉苁蓉属在内的列当科 19 属 31 种的叶绿体 *rps16* 基因序列,以及列当科 9 属 15 种的叶绿体核基因组序列组合 *rps16* + ITS 被用于本研究的系统发育树的构建。系统发育树的构建采用的是贝叶斯法和最大似然法。马铃薯(*Solanum tuberosum*)、泡桐(*Paulownia tomentosa*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)和油橄榄(*Olea europaea*)因其和列当科的近缘关系^[12]而被选为外类群。

2 结果与分析

我们用 *rps16* 基因构建的系统进化树的拓扑结构与前人基于核基因 *PHYA* 构建的列当科系统发育树^[11]和 *rps2* + ITS 联合序列构建的进化树^[12]的拓扑结构基本一致。

2.1 *rps16* 序列构建的进化树结果分析

基于 *rps16* 基因序列构建的贝叶斯树显示列当科 19 属 31 种可以分为 3 个进化枝(图 1),其中列当科非寄生植物 *Lindenbergia* 构成了进化枝 I; *Orobanch*、*Boschniakia* 和 *Cistanche* 三种列当科全寄生植物聚在进化枝 II 中; *Cyclocheilon*、*Micrargeria*、*Buchnera*、*Pedicularis* 和 *Ophiocephalus* 等半寄生植物聚在进化枝 III 中。

基于 *rps16* 基因内含子序列构建的进化树以绝对的支持率(MP/ML/PP = 91/97/1.00)支持肉苁蓉属和列当属的近缘关系,而上述两个属一起又同草苁蓉属聚在了同一进化枝 II 里。

2.2 *rps16* + ITS 组合序列构建的进化树结果分析

我们在 *rps16* + ITS 的分析中涵盖了列当科 9 属 15 个种。在此进化树中, *Cistanche*、*Orobanch* 及 *Boschniakia* 也聚在同一进化枝里(MP/ML/PP = 96/99/1.00), *Cistanche* 和 *Orobanch* 亲缘关系较近(图 2)。

表 1 用于本研究的 *rps16*、ITS 序列信息
Table 1 Information of *rps16* and ITS sequences used in the present study

分类群 Taxon	<i>rps16</i> 基因序列号 GenBank number for <i>rps16</i>	ITS 基因序列号 GenBank number for ITS
<i>Lindenbergia</i> sp. Thulin	AJ431049	
<i>Lindenbergia philippinensis</i> Benth.	AJ609169	
<i>Seymeria laciniata</i> Standl.	EF103820	EF103742
<i>Lamourouxia rhinanthifolia</i> Kunth.	EF103822	
<i>Pedicularis attollens</i> A. Gray	EF103821	EF103743
<i>Pedicularis verticillata</i> L.	EU348857	AY596818
<i>Orthocarpus imbricatus</i> Torr ex S. Watson	EF103811	EF103733
<i>Orthocarpus cuspidatus</i> Greene	EF103809	EF103731
<i>Orthocarpus bracteosus</i> Benth.	EF103807	AY911243
<i>Cordylanthus ramosus</i> Nutt.	EF103803	EF103725
<i>Cordylanthus wrightii</i> A. Gray	EF103801	EF103724
<i>Clevelandia beltingii</i> Greene	EF103818	
<i>Ophiocephalus angustifolius</i> Wiggins	EF103819	
<i>Castilleja cerroana</i> Edwin	FJ939275	
<i>Castilleja lasiorhyncha</i> (A. Gray) T. I. Chuang & Heckard	EF103750	
<i>Castilleja rubicundula</i> (Jeps.) T. I. Chuang & Heckard	EF103751	
<i>Castilleja tenuis</i> (A. Heller) T. I. Chuang & Heckard	EF103748	
<i>Castilleja profunda</i> T. I. Chuang & Heckard	FJ939277	
<i>Castilleja vadosa</i> T. I. Chuang & Heckard	FJ939273	FJ939248
<i>Triphysaria eriantha</i> T. I. Chuang & Heckard	FJ939278	AY911259
<i>Triphysaria versicolor</i> Fisch. & C. A. Mey	FJ939280	FJ939254
<i>Triphysaria pusilla</i> T. I. Chuang & Heckard	FJ939279	AY911260
<i>Brandisia hancei</i> Hook. f.	AJ609205	
<i>Euphrasia stricta</i> J. P. Wolff ex J. F. Lehm.	FN794093	
<i>Buchnera cruciata</i> Buch. -Ham.	EU366155	
<i>Buchnera hispida</i> Buch. -Ham.	FN794082	
<i>Micrargeria filiformis</i> Hutch. & Dalziel	FN794102	
<i>Cyclocheilon somaliense</i> Oliver	AJ609192	
<i>Boschniakia himalaica</i> Hook. f. & Thomson	EU366156	AY911212
<i>Orobanche hederæ</i> Duby	AJ431050	AY209273
* <i>Cistanche deserticola</i> Ma	JX065216	AB217873
<i>Paulownia tomentosa</i> Steudy	AJ431051	
<i>Antirrhinum majus</i> L.	GQ997033	
<i>Solanum tuberosum</i> L.	U11638	AY875827
<i>Olea europaea</i> L.	AF225275	AJ585193

* 本研究新增加的类群。
* Taxa added in present study .

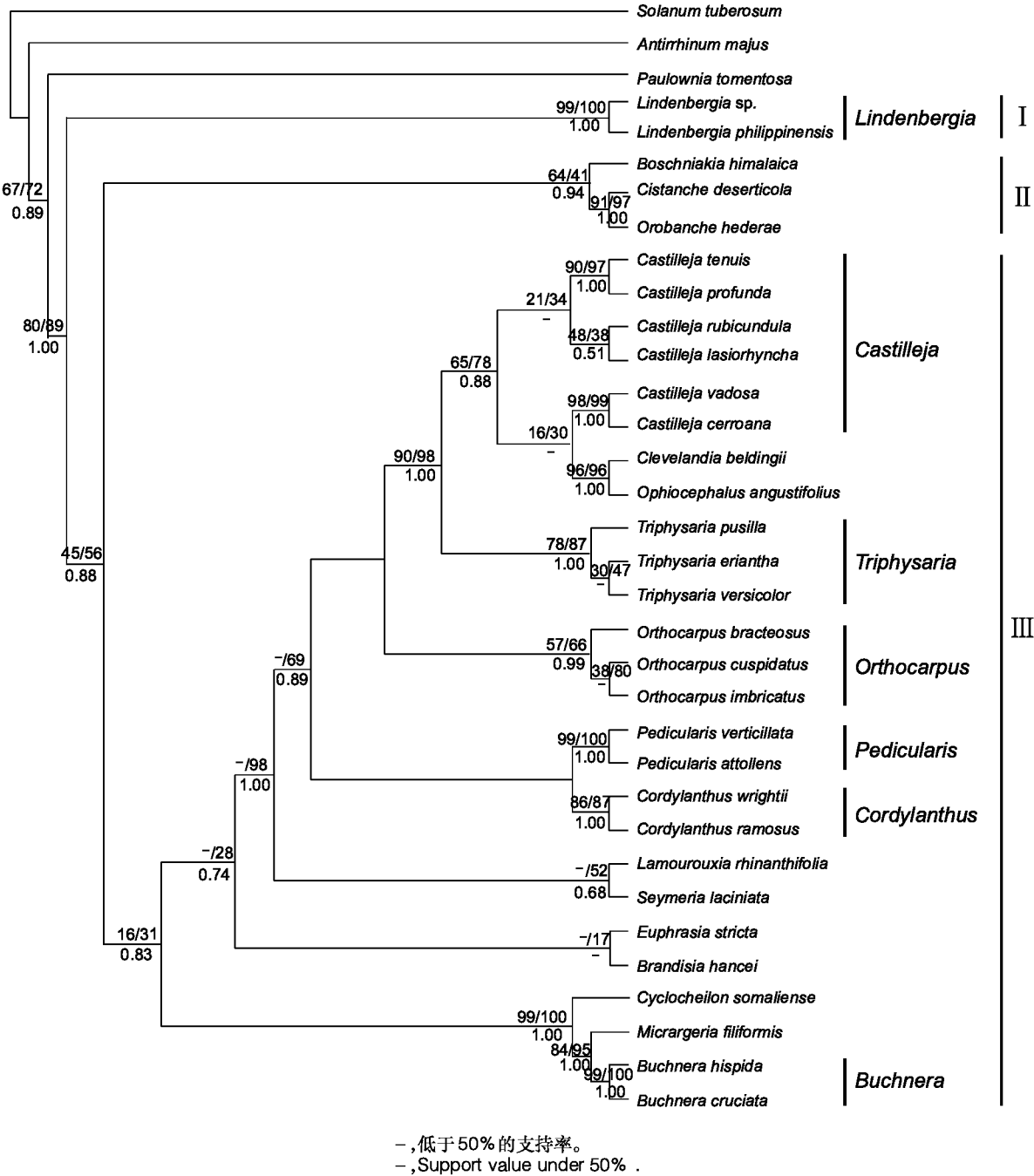


图 1 对 *rps16* 序列数据进行最大似然法分析得到的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree generated based on ML analysis of *rps16* sequences

基于 *rps16* + ITS 序列组合和 *rps16* 序列得到的进化树的拓扑结构基本一致。

3 讨论

3.1 肉苁蓉属的系统位置

前人对于列当科所做的系统发育研究中^[8-12]，肉苁蓉属的系统位置尚不统一。如上所述，前人的

工作主要有两种观点：一类支持肉苁蓉属和列当属亲缘关系较近^[8]；还有一类支持肉苁蓉属和草苁蓉属关系较近^[8]。我们的研究结果支持 Manen 等^[8]的观点，认为肉苁蓉属和列当属关系较近，也支持前人关于肉苁蓉属、列当属和草苁蓉属三者关系较近的观点^[9]。

在广义列当科中，肉苁蓉属、列当属、草苁蓉属

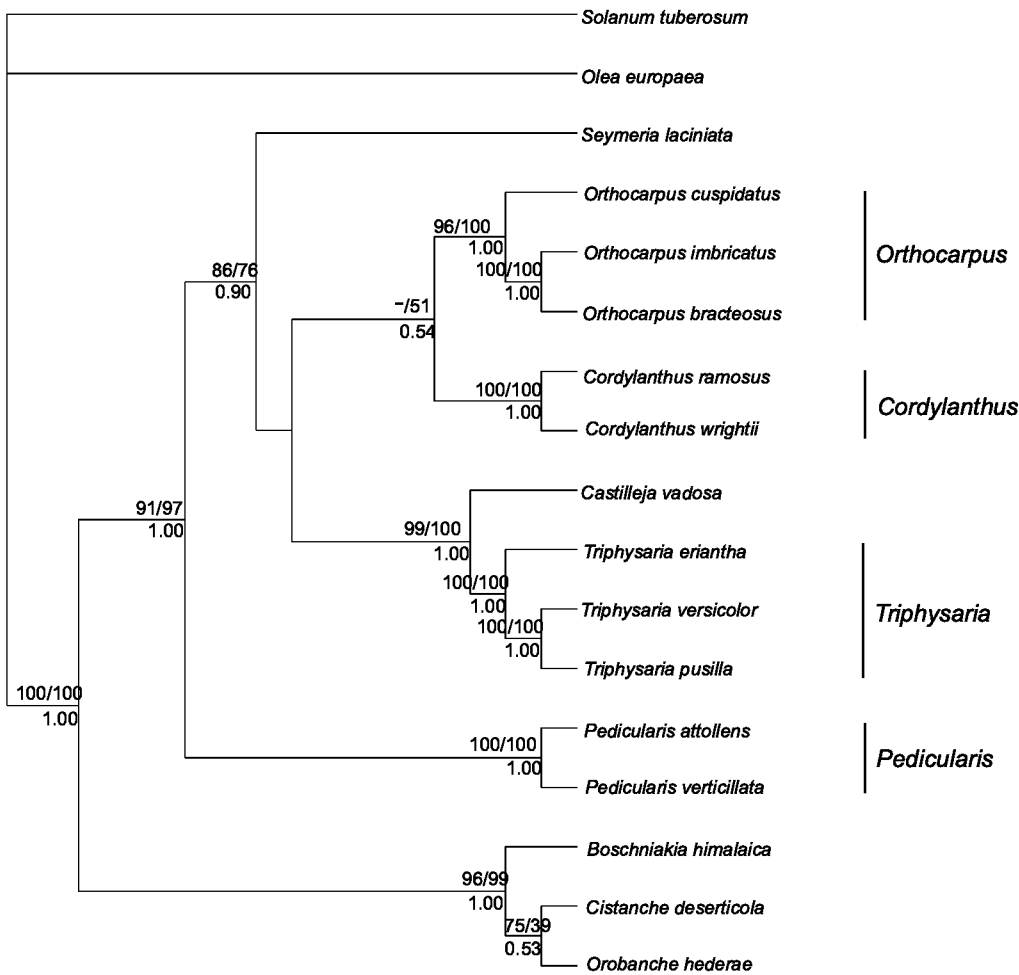


图 2 对 *rps16* + ITS 进行最大似然法分析得到的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree generated from ML analysis of *rps16* + ITS

和前人^[16]报道的 *Epifagus virginiana* 均属于全寄生的类群,它们都不含叶绿素或含少量叶绿素,基本不进行光合作用,靠摄取寄主植物的营养生存。这三属能聚到一起或许与它们的全寄生习性、叶绿体基因组基因数量的退化程度以及基因序列的变异程度密切相关。

在列当科全寄生类群中肉苁蓉属和列当属因为心皮差异(2 个心皮)而和草苁蓉属(2 ~3 个心皮,若为 2 个心皮则花冠筒部膨大成囊状)相区别。

3.2 列当科下属间关系

在我们的研究中虽然没有涵盖列当科下所有属,但是所涵盖的类群也能很好地划分为非寄生类群、半寄生类群以及全寄生类群三类。纵观前人的研究结果以及本文的研究结果,我们不难发现,列当科下各属以寄生程度进行的类群划分,得到了分子

生物学证据的支持。

3.3 叶绿体 *rps16* 基因序列在植物系统发生学分析中的实用性

Oxelman 等^[3]用 *rps16* 基因的内含子序列对石竹科蝇子草族的 46 个种做了系统发育分析,并和之前的核基因组 ITS 片段的系统发育树比较,其结果显示,基于 *rps16* 基因内含子序列得到的结果与 ITS 的结果完全一致。另外 Oxelman 等通过 *rps16* 内含子序列建立的系统进化树首次定义了 *Steris*、*Atocion*、*Behenantha* 以及 *Erectorefractae* 的系统发育位置。

在我们的研究中,虽然仅涵盖了列当科 19 属的类群,但是我们的结果(图 1)所展示的进化树的拓扑结构与 Bennett 等^[11]的结果基本一致。可见 *rps16* 内含子序列在系统发育分析中的高分辨性及

实用性。

列当科全寄生植物是一类很特殊的类群,几乎不进行光合作用,前人的研究^[16]也显示此类群的叶绿体基因组基因含量明显少于光合作用植物类群,也就是说尽管大多数绿色植物的叶绿体基因组都包含约110个基因,dePamphilis和Palmer^[16]首次对列当科全寄生植物 *Epifagus virginiana* 的叶绿体全基因组进行测序后却发现其叶绿体基因组中与光合作用有关的基因大量丢失,其叶绿体基因组仅仅包含42个基因。故在其明显变小的叶绿体基因组中去发现更多合适的基因序列用于列当科的系统发育研究是亟需进一步开展的工作。

参考文献:

- [1] Young N D, Steiner K E, dePamphilis C W. The evolution of parasitism in Scrophulariaceae/Orobanchaceae: plastid gene sequences refute an evolutionary transition series [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1999, 86: 876–893.
- [2] Nickrent D L. The parasitic plant connection: parasitic plant genera [EB/OL]. 2010, Department of Plant Biology, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois, USA. <http://www.parasiticplants.siu.edu/ListParasites.htm>.
- [3] Oxelman B, Lidén M, Berglund D. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae) [J]. *Plant Syst Evol*, 1997, 206: 393–410.
- [4] Andersson L, Rova J H E. The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae) [J]. *Plant Syst Evol*, 1999, 214: 161–186.
- [5] Asmussen C B, Chase M W. Coding and noncoding plastid DNA in palm systematics [J]. *Am J Bot*, 2001, 88: 1103–1117.
- [6] Lee J, Hymowitz T. A molecular phylogenetic study of the subtribe Glycininae (Leguminosae) derived from the chloroplast DNA *rps16* intron sequences [J]. *Am J Bot*, 2001, 88: 2064–2073.
- [7] Downie S R, Katz-Downie D S. Phylogenetic analysis of chloroplast *rps16* intron sequences reveals relationships within the woody southern African Apiaceae subfamily Apioideae [J]. *Can J Bot*, 1999, 77: 1120–1135.
- [8] Manen J F, Habashi C, Jeanmonod D, Park J M, Schneeweiss G M. Phylogeny and intraspecific variability of holoparasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) inferred from plastid *rbcl* sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 33: 482–500.
- [9] Schneeweiss G M, Colwell A, Park J M, Jang C G, Stuessy T F. Phylogeny of holoparasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) inferred from nuclear ITS sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 30: 465–478.
- [10] Carlón L, Gómez Casares G, Laínz M, Moreno Moral G, Sánchez Pedrajaó, Schneeweiss G M. Más, a propósito de algunas *Orobanche* L. y *Phelipanche* Pomel (Orobanchaceae) del oeste del Paleártico [J]. *Doc Jardín Bot Atlánt Gijón*, 2005, 3: 1–71.
- [11] Bennett J, Mathews S. Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae inferred from *Phytochrome A* [J]. *Am J Bot*, 2006, 93(7): 1039–1051.
- [12] Park J M, Manen J F, Colwell A E, Schneeweiss G M. A plastid gene phylogeny of the non-photosynthetic parasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) and related genera [J]. *J Plant Res*, 2008, 121: 365–376.
- [13] 国家林业局保护司. 中国珍稀濒危植物名录 [EB/OL]. 2010. <http://www.03964.com/read/0c5042f2734b28277fdb2f8d.html>.
- [14] Shaw J, Lickey E B, Beck J T, Farmer S B, Liu W S, Miller J, Siripun K C, Winder C T, Schilling E E, Small R L. The tortoise and the hare. II. Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis [J]. *Am J Bot*, 2005, 92: 142–166.
- [15] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1572–1574.
- [16] dePamphilis C W, Palmer J D. Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant [J]. *Nature*, 1990, 348: 337–339.