

基于*rbcL*和*matK*序列探讨马鞭草科部分植物的系统学位置

杨金宏, 孔卫青*

(安康学院, 陕西省蚕桑重点实验室, 陕西 安康 725000)

摘要: 为探究适用于马鞭草科植物的 DNA 条形码及该类群的系统分类关系, 对豆腐柴(*Premna microphylla*)的叶绿体基因 *ycf6-psbM*、*trnV-atpE*、*rbcL*、*trnL-F*、*psbM-trnD*、*atpB-rbcL*、*trnC-ycf6*、*trnH-psbA*、*rpl36-infA-rps8* 和核基因 ITS 序列进行了 PCR 扩增和测序, 结果表明, 仅 *rbcL*、*trnL-F*、*trnH-psbA* 序列的 PCR 扩增以及测序效果较好, 而 ITS 不能得到明显的扩增条带, *ycf6-psbM* 不能成功测序, 其它序列存在有部分双峰或噪值高等问题。根据 DNA 条形码标准, *rbcL* 序列是所有测试条码中相对最适合的。应用 *rbcL* 和 *matK* 序列对马鞭草科(Verbenaceae)豆腐柴属、牡荆属(*Vitex* L.)、马鞭草属(*Verbena* L.)和大青属(*Clerodendrum* L.)等 4 属与唇形科宝盖草属(*Lamium* L.)、水苏属(*Stachys* L.)、鼠尾草属(*Salvia* L.)和香科科属(*Teucrium* L.)等 4 属的分类和系统发育关系进行分析, 以紫草科 *Lithospermum multiflorum* L. 为外类群, 最大简约法对 2 个片段的单独和联合矩阵分别构建系统发育树。豆腐柴属和大青属应从马鞭草科划入唇形科, 马鞭草属仍归于马鞭草科, 而牡荆属的系统学位置还需更多的证据。

关键词: *rbcL*; *matK*; 马鞭草科; 豆腐柴属; 系统学

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.02.003

Systematic Position of Partial Plants of Verbenaceae Inferred from Sequences of Chloroplast *rbcL* and *matK*

YANG Jin-hong, KONG Wei-qing*

(Key Laboratory of Sericulture in Shaanxi, Ankang University, Ankang 725000, China)

Abstract: In order to understand systematic relationship of Verbenaceae, chloroplast genes, such as *ycf6-psbM*, *trnV-atpE*, *rbcL*, *trnL-F*, *psbM-trnD*, *atpB-rbcL*, *trnC-ycf6*, *trnH-psbA*, *rpl36-infA-rps8* and nrDNA ITS of *Premna microphylla* Trucz. were amplified by PCR and sequenced. Among these loci, *rbcL*, *trnL-F* and *trnH-psbA* were efficient for both PCR amplification and DNA sequencing, while other sequences don't conform to DNA barcode standard, ITS had no specific bands, *ycf6-psbM* could not sequence successfully, and the others had double peaks or high noisy values. However, *rbcL* is better than others according to DNA barcoding standard. The phylogenetic relationships among four genera from Verbenaceae, such as *Premna* L., *Vitex* L., *Verbena* L., and *Clerodendrum* L., and four genera from Labiatae, such as *Lamium* L., *Stachys* L., *Salvia* L., and *Teucrium* L., were studied by both combined and individual analyse using the chloroplast genes *rbcL* and *matK* sequences. The gene trees were constructed by maximum parsimony method with *Lithospermum multiflorum* as outgroup. It suggested that *Premna* L. and *Clerodendrum* L. were supposed to be moved to Labiatae from Verbenaceae and *Verbena* L. in Verbenaceae taxonomically, and the systematic position of *Vitex* L. was worthy of further study.

Key words: *rbcL*; *matK*; Verbenaceae; *Premna* L.; Phylogenetics

收稿日期: 2012-04-13

接受日期: 2012-08-24

基金项目: 陕西省教育厅科技计划项目(2010JK391); 陕西省科技厅科技计划项目(2011K01-40)资助

作者简介: 杨金宏, 硕士, 讲师, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: yjhjhyang@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: weiqing_kongwq@126.com

马鞭草科(Verbenaceae)隶属于被子植物门双子叶植物纲唇形目,有 80 余属 3000 余种,主要分布于热带和亚热带地区,少数延至温带。我国有 21 属 175 种 31 变种 10 变型^[1],多分布在长江以南地区,大部分是重要的中药材来源。马鞭草科和唇形科(Labiatae)植物有时容易混淆,在系统位置及进化关系方面存在争议,如恩格勒系统中,认为马鞭草科是由紫草科发展到唇形科而位于管花目(Tubiflorae),将马鞭草科分成 7 个亚科。而哈钦森分类系统中,本科起源于茜草科(Rubiaceae),位于马鞭草目(Verbenales),而塔赫他间等近代分类学者则认为仅有马鞭草亚科(Verbenoideae Briq.)、牡荆亚科(Viticoideae Briq.)及荛亚科(Caryopteridoideae Briq.)属于本科^[2-3]。而利用 DNA 信息进行的系统分类则将马鞭草科分成 8 个类群,包括 1 个新类群 Neospartoneae trib. nov.,并且认为马鞭草族(Verbeneae)和马缨丹族(Lantaneae)的进化关系最近,这与所有的传统分类方法的结果不一致^[4]。

豆腐柴(*Premna microphylla* Turcz.)分布于我国华东、华中、中南、西南各省,其叶和嫩枝含有大量的果胶、蛋白质和纤维素,可制作豆腐^[5],叶中富含维生素和氨基酸。植株体可入药,具清热解毒、消肿止血、医治毒蛇咬伤、无名肿毒等功能,具有重要的食用和药用价值。传统分类学将豆腐柴归于马鞭草科豆腐柴属(*Premna* L.),但近来利用 DNA 信息进行的系统分类则将其归入唇形科,而大青属(*Clerodendrum* L.)的分类同样经历了由最初位于马鞭草科后划入唇形科的变化。

针对马鞭草科植物在分类与系统研究上存在的争论,本文利用 DNA 条形码在生物分类上的应用,对豆腐柴属豆腐柴的 *ycf6-psbM*、*trnV-atpE*、*rbcL*、*trnL-F*、*psbM-trnD*、*atpB-rbcL*、*trnC-ycf6*、*trnH-psbA*、*rpl36-infA-rps8*、ITS 基因进行扩增和测序,并从 NCBI 下载马鞭草科和唇形科的 *trnH-psbA*、*rbcL* 和 *matK* 序列进行分析,以期为马鞭草科豆腐柴属和大青属的系统位置和进化关系提供参考和分子方面的依据,同时也为该类群筛选合适的 DNA 条形码。

1 材料和方法

1.1 材料

研究材料包括马鞭草科豆腐柴属、牡荆属

(*Vitex* L.)、马鞭草属(*Verbena* L.)和大青属与唇形科宝盖草属(*Lamium* L.)、水苏属(*Stachys* L.)、鼠尾草属(*Salvia* L.)和香科科属(*Teucrium* L.)(表 1)。实验材料豆腐柴(*Premna microphylla* Turcz.)取自陕西安康市农业科学研究所植物示范园,其它数据从 GenBank 数据库中下载。

1.2 样品DNA的提取、PCR扩增和测序

称取新鲜植物叶片 100 mg,用组织匀浆仪匀浆后,使用植物 DNA 提取试剂盒(Tiangen Biotech Co., China)提取植物总 DNA。各候选序列的 PCR 反应条件、通用引物及扩增程序参照 Chen 等^[6]的方法。PCR 扩增产物经纯化后,在生工武汉测序部使用 ABI 3730XL 测序仪进行双向测序。

1.3 数据处理

所测各序列峰图使用 CodonCode Aligner V 2.06 (CodonCode Co., USA)软件进行校对拼接,取出低质量序列及引物区,后利用 ClustalX 1.83 进行多序列比对并查错,可用序列纳入后续分析。*psbA-trnH* 序列根据 GenBank 上的注释,取出 *psbA* 和 *trnH* 区段,获得 *psbA-trnH* 间隔区。其余序列采用 CodonCode Aligner 软件处理,剔除不确定碱基数目大于 10 个和长度小于 100 bp 的序列^[7]。后根据理想的 DNA 条形码序列应当具有明显的种间变异,同时种内变异足够小的标准,对各序列的变异进行分析,选取后续用于系统发育分析的 DNA 条形码序列。

1.4 系统发育分析

ClustalX 1.83 基于相似性标准对马鞭草科豆腐柴属、大青属、牡荆属、马鞭草属和唇形科水苏属、香科科属、宝盖草属、鼠尾草属等的序列进行比对和排序,并以各基因片段的单独及其联合矩阵分别构建系统发育树。系统发育树及自展分析应用 PAUP V. 4.0b10 软件,数据均处理为等权重和有序,空位(Gap)处理为缺失(Missing),采用最大简约法(Maximum parsimony),1000 次随机加入, TBR (Tree bisection-reconnection)枝长交换,进行启发式搜索(Heuristic search),寻找最简约树。系统树的可靠性评价采用自展检验(Bootstrap)来评估,启发式搜索 1000 次重复取样,计算各分支的支持率,50% 严格一致树采用。

表 1 使用的基因或间隔区

Table 1 Genes or spacer regions tested

科 Family	种 Species	基因 Gene		科 Family	种 Species	基因 Gene	
		<i>matK</i>	<i>rbcL</i>			<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
马鞭草科 Verbenaceae	<i>Premna microphylla</i>	HQ427331	JN899597	马鞭草科 Verbenaceae	<i>Clerodendrum fragrans</i>		L11689
	<i>P. mooliensis</i>	JF270900			<i>Verbena bonariensis</i>	HM850974	HM850444
	<i>P. puberula</i>		JQ322526	<i>V. officinalis</i>	GQ434146	GQ436523	
	<i>P. odorata</i>	HQ384494	Q384866	<i>V. rigida</i>	HM850975	HM850445	
	<i>P. obtusifolia</i>		FJ976163	唇形科 Labiatae	<i>Stachys arvensis</i>	HM850806	HM850384
	<i>Vitex negundo</i>	GQ434148	GQ436525		<i>S. sylvatica</i>	FJ395437	AF502022
	<i>V. agnus-castus</i>		U78716	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	FJ513168	HM590063	
	<i>V. rotundifolia</i>	AB284177	GQ436526	<i>Salvia</i> sp.	FR719105	FR720578	
	<i>V. trifolia</i>	AB284175		<i>S. uliginosa</i>	FR719102	FR720577	
	<i>Clerodendrum</i>	HQ427334	HQ384865	<i>S. rutilans</i>	FR719100	FR720575	
	<i>trichotomum</i>	HQ384492		<i>S. officinalis</i>	FR719097	FR720574	
	<i>C. japonicum</i>	AF315297		<i>S. sclarea</i>	FR719101	FR720576	
		HQ911380	GQ436521	<i>Teucrium scorodonia</i>	HM850801	HM850397	
	<i>C. glabrum</i>	JF270694		<i>T. chamaedrys</i>	FR865047	FR865125	
	<i>C. thomsonae</i>	AF315298		<i>T. montanum</i>	FR865045	R865120	
	<i>C. fortunatum</i>	HQ415394		<i>Lamium purpureum</i>	JF779876	AB266224	
	<i>C. cyrtophyllum</i>	HQ415393		<i>L. galeobdolon</i>	JF779869	HM850102	
		HQ427333		<i>L. amplexicaule</i>	JF779865	AB266225	
	<i>C. inerme</i>		AY289684	<i>L. album</i>	JF779864	FJ395588	
	<i>Clerodendrum</i> sp.		AB586352	紫草科 Boraginaceae	<i>Lithospermum multiflorum</i>	FJ827263	EU599856

2 结果和分析

2.1 PCR扩增效率和测序成功率

本实验进行了 *ycf6-psbM*、*trnV-atpE*、*rbcL*、*trnL-F*、*psbM-trnD*、*atpB-rbcL*、*trnC-ycf6*、*trnH-psbA*、*rpl36-infA-rps8*、ITS 序列在豆腐柴中的扩增和测序,除 ITS 外,PCR 扩增均获得成功(出现明显的扩增条带),除 *ycf6-psbM* 外,PCR 产物测序均获得成功,并已在 NCBI 登陆(登陆序列号分别为: *trnV-atpE*, JN899595; *rbcL*, JN899596; *trnL-F*, JN899597; *psbM-trnD*, JN899598; *atpB-rbcL*, JN899599; *trnC-ycf6*, JN899600; *trnH-psbA*, JN899601; *rpl36-infA-rps8*, JN986809)。而测序成功的 8 条序列中, *rbcL*、*trnL-F*、*trnH-psbA* 的序列峰图较好,其它 5 条序列存在部分有双峰或噪值高等问题,结果稍差。

根据理想 DNA 条形码标准,继续对 *rbcL*、*matK* 和 *trnH-psbA* 序列进行分析,结果编码基因

rbcL 和 *matK* 序列在同一属内物种间的变异较小,在不同属和科间的变异相对较大,适合于对各属序列间的分化进行分析。而非编码区片段 *trnH-psbA* 在不同种属间存在较多的插入/缺失和小的 DNA 条形码序列,虽然物种识别所需要的信息增多了,但变异较大,可能更适于种属内物种的鉴定,因此本研究选取 *rbcL*、*matK* 两条序列进行后续研究。

2.2 基于 *rbcL*、*matK* 序列的系统进化分析

本文以紫草科 *Lithospermum multiflorum* L. 为外类群,用 PAUP V. 4.0b10 软件对来自马鞭草科和唇形科共 8 属 64 条 *matK* 和 *rbcL* 序列的单独及其联合矩阵构建最大简约树(图 1~3)。3 个矩阵中,简约信息位点与变异位点的比例很接近,而与总长度的比例有很大差距, *matK* 为 24%,而 *rbcL* 仅 10%。*matK* 的变异位点和简约信息位点较多,所含的信息量相对较丰富,且基于 *matK* 的系统树的一致性指数(CI)和维持性指数(RI)分别为 0.756 和

0.850, 系统树的拓扑结构较为可信。

在 3 个系统树中, 大青属均处在最晚的分支上, 与香科科属或先(图 1, 3)或后(图 2)聚合在一个分支上, 分支支持率分别是 100%、87% 和 66%。水苏属和宝盖草属是比较相近的类群, 聚合分支的支持率分别为 100% (图 1)、80% (图 2)和 100% (图 3), 豆腐柴属在所构建的 3 个系统树中, 与水苏属和宝盖草属聚合形成的分支(图 2, 3)或与更多的包

括鼠尾草属和牡荆属在内的种属聚合(图 1)分支的支持率为 62% ~ 64%。牡荆属在以 *matK* 序列构建的系统树中与宝盖草属、水苏属和鼠尾草属聚合的分支相聚合后, 再与豆腐柴属聚合(图 1), 在 *rbcL* 序列构建的系统树中, 其与除马鞭草属之外的所有属聚合后的总分支相聚合(图 2), 而在 *matK* 和 *rbcL* 序列的联合矩阵构建的系统树(图 3)中, 其处于与水苏属、宝盖草属和豆腐柴属聚合的分支处, 3 个系统树

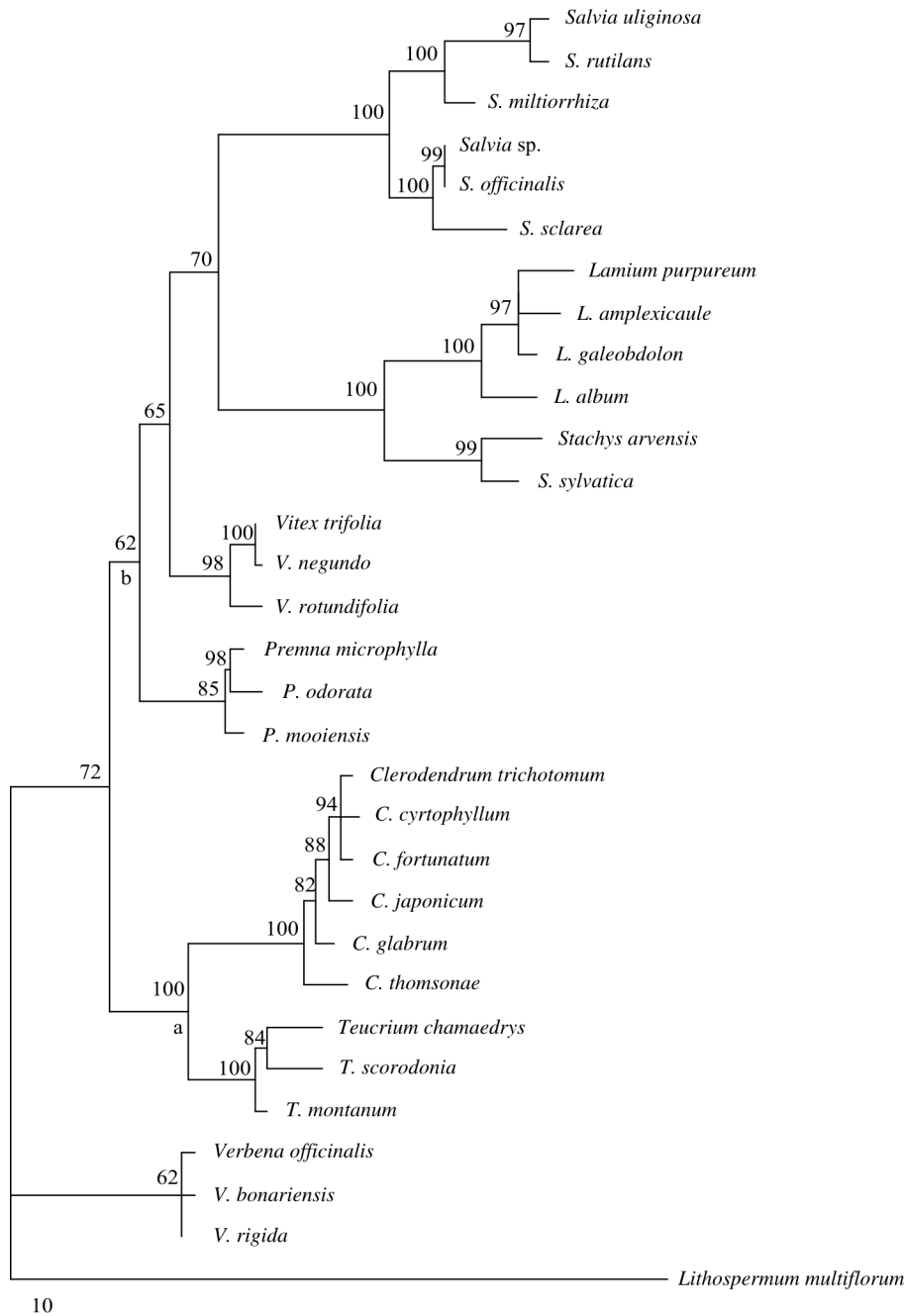


图 1 基于 *matK* 的 50% 严格一致树

Fig. 1 Fifty percent strict consensus tree from maximum parsimony for *matK*

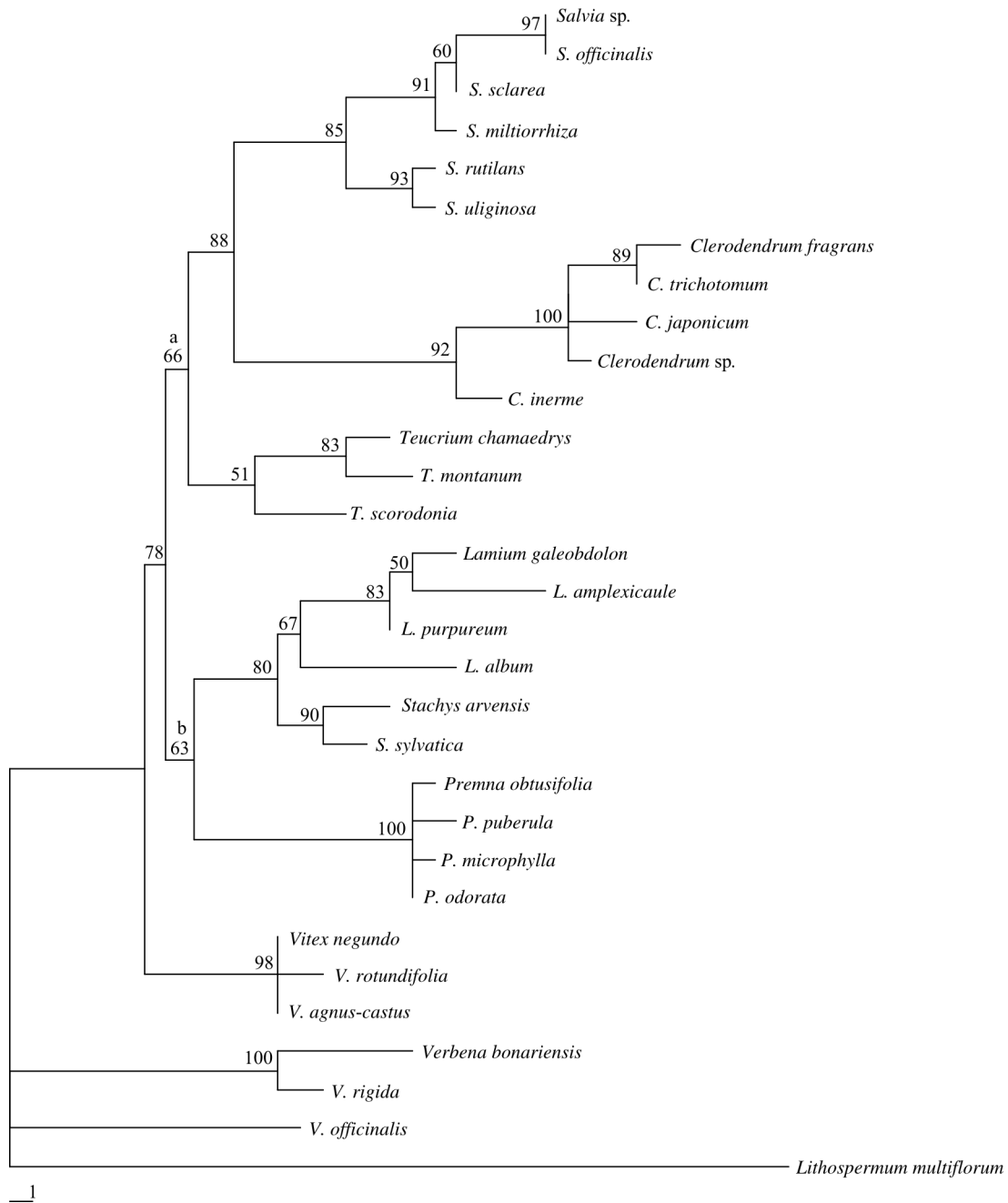


图 2 基于 *rbcL* 的 50% 严格一致树

Fig. 2 Fifty percent strict consensus tree from maximum parsimony for *rbcL*

中的支持率分别是 65%、92% 和 95%。马鞭草属 3 种马鞭草的序列均处于最靠近根目录的位置。

3 讨论

DNA 条形码作为一种新的性状构建分类系统, 实现序列本身变异信息与现有形态分类学的结合, 可以弥补传统分类学方法的不足, 加快全球生物物种分类和鉴定的步伐, 自 2003 年 Hebert 等

提出后, 已在哺乳动物、鸟类、鱼类、昆虫以及真菌和藻类等物种的鉴定研究中广泛应用^[8-15]。理想的 DNA 条形码不仅应具有明显的种间变异, 同时种内变异足够小, 而且片段应该尽量短, 两端连接应相对保守, 可以应用通用引物扩增。而植物因线粒体基因进化速率相对较慢, 且由于植物容易发生杂交和网状进化, 同一基因在不同类群中的进化速率可能不同, 导致人们寻找理想的 DNA 条形码的研究较动物复杂得多而发展缓慢^[6,16]。叶绿体基因

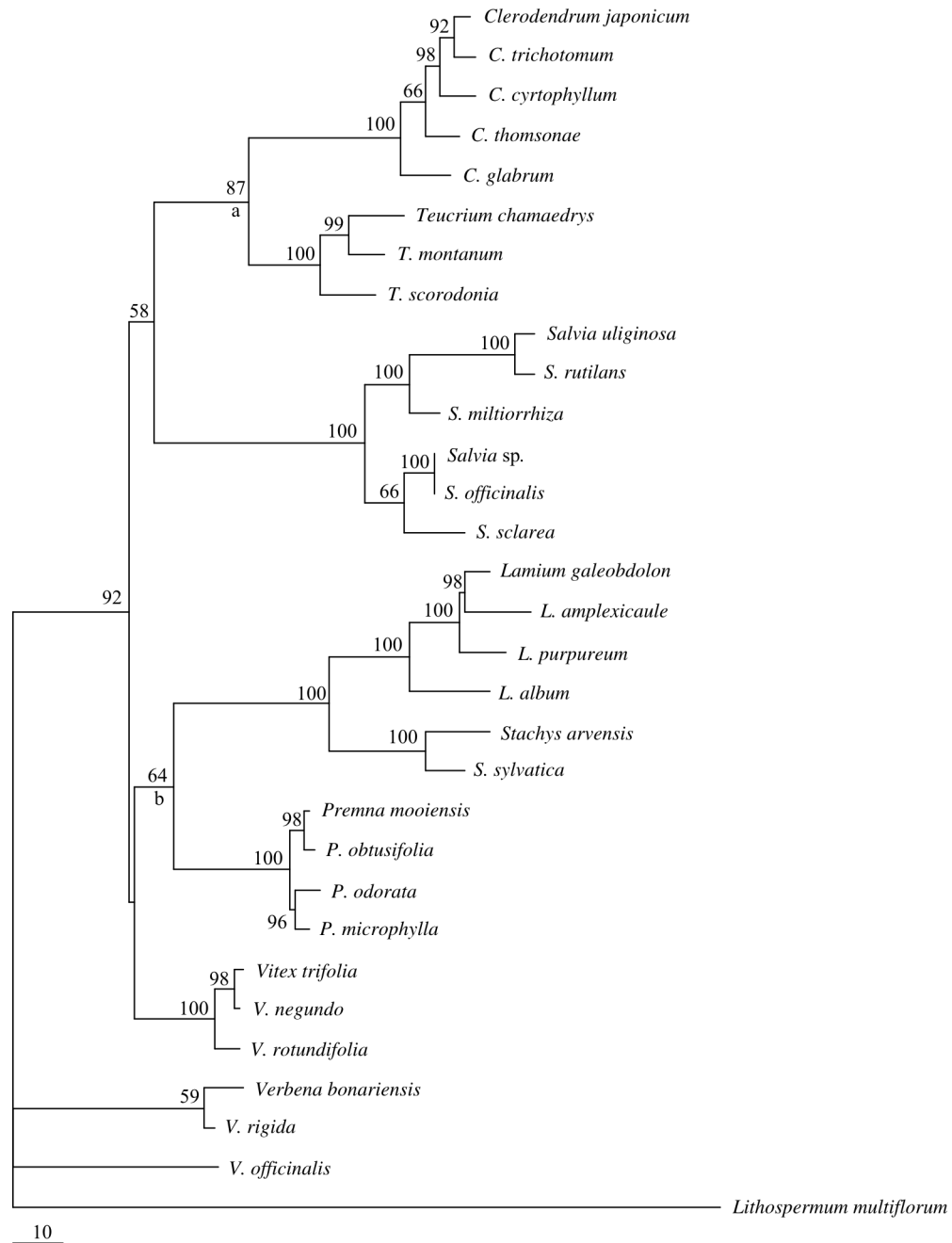


图 3 基于 *matK*、*rbcL* 联合矩阵的 50% 严格一致树

Fig. 3 Fifty percent strict consensus tree from maximum parsimony for combined data of *matK* and *rbcL*

间隔区 (*trnH-psbA*、*atpB-rbcL*、*trnC-ycf6*、*trnL-F*、*rpl36-rps8*、*trnK-rps16*、*ycf6-psbM*、*trnV-atpE*、*psbM-trnD* 等)和植物系统发育重建研究中常用的 *rbcL*，以及核糖体 DNA 片段 ITS 是目前使用较多的 DNA 条形码候选序列及其组合^[17-21]，但对每一植物科或属合适的序列都需进行针对性的探索和研究。

本文对 *ycf6-psbM*、*trnV-atpE*、*rbcL*、*trnL-F*、*psbM-trnD*、*atpB-rbcL*、*trnC-ycf6*、*trnH-psbA*、*rpl36-infA-rps8*、ITS 序列是否可作为豆腐柴的理想

条形码序列进行了针对性的探索和研究，结果 ITS 不能得到明显的扩增条带，这可能是生物本身这些引物位点发生了突变，我们将通过在该区段外设计引物进行扩增和测序，进一步研究其具体原因。*ycf6-psbM* 不能成功测序，而测序成功的 8 条序列中，*trnV-atpE*、*psbM-trnD*、*atpB-rbcL*、*trnC-ycf6*、*rpl36-infA-rps8* 等 5 条序列存在有部分双峰或噪值高等问题，这可能是由于豆腐柴本身果胶等多糖物质含量过高，DNA 纯化不彻底造成的，也可能是

这些引物对豆腐柴的特异性太低,造成存在非特异性扩增的问题。对 *rbcL*、*trnH-psbA* 和常用的 *matK* 序列进行分析, *trnH-psbA* 序列因变异太大,在不同种属间存在较多的插入/缺失和小的 DNA 条形码序列而不适用于本研究。

本文以马鞭草科和唇形科的部分种属的序列构建的 3 个最大简约树,与大青属所处的最晚分支相聚合的种属序列均来自唇形科,这与之前基因鉴定的结果大青属从马鞭草科划入唇形科的结果一致^[22]。同样的,豆腐柴属在较多情况下也最先与水苏属和宝盖草属聚合形成的分支聚合,因此也应该被划入唇形科。马鞭草属属于马鞭草科马鞭草亚科,是马鞭草科的代表,马鞭草属 3 种马鞭草序列均处于最靠近根目录的位置,可能这与其在形态分类学中为马鞭草科代表植物的地位相一致。牡荆属是牡荆亚科的代表植物,在 3 个系统树中聚合分类方式均不太相同,对于其系统学地位可能需要更多的证据。

植物长期生活在野外,自然环境下很容易发生杂交,进化过程呈网状,系统位置及进化关系比较复杂。本文选取的核基因序列 ITS 在豆腐柴中没有获得成功,用于分析的基因序列全部来自马鞭草科和唇形科的叶绿体基因组,可能会有一定的片面性。因此,后面将通过更多的方式获取其核基因证据,为其系统学位置及进化关系的确定提供更多参考。

参考文献

- [1] Li D Z, Wang Y H. Scientific database of China Plant Species [DB/OL]. Kunming: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science [2012-8-20]. <http://db.kib.ac>.
- [2] 李德铎, 王雨华. 中国植物物种信息数据库 [DB/OL]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所 [2012-8-20]. <http://db.kib.ac>.
- [2] Cantino P D. Evidence for a polyphyletic origin of the Labiatae [J]. *Ann Missouri Bot Garden*, 1992, 79(2): 361-379.
- [3] Takhtajian A. Diversity and Classification of Flowering Plants [M]. New York: Columbia University Press, 1997: 462-469.
- [4] Marx H E, O'Leary N, Yuan Y W, et al. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae [J]. *Amer J Bot*, 2010, 97(10): 1647-1663.
- [5] Wang Y, Xu F, Zhang F X, et al. The advance on research of *Premna microphylla* [J]. *Chin Wild Plant Resour*, 2007, 26(4): 12-14.
- [6] 王燕, 许锋, 张风霞, 等. 豆腐柴研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2007, 26(4): 12-14.
- [6] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLOS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [7] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, et al. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project [J]. *Science*, 1991, 252(5013): 1651-1656.
- [8] Clare E L, Lim B K, Engstrom M D, et al. DNA barcoding of Neotropical bats: Species identification and discovery within Guyana [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(2): 184-190.
- [9] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemplak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLOS Biol*, 2004, 2(10): 1657-1663.
- [10] Kerr K C R, Stoeckle M Y, Dove C J, et al. Comprehensive DNA barcode coverage of north American birds [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(4): 535-543.
- [11] Ward R D, Zemplak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [12] Yancy H F, Zemplak T S, Mason J A, et al. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: Applications of the regulatory fish encyclopedia [J]. *J Food Prot*, 2008, 71(1): 210-217.
- [13] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 968-971.
- [14] Cywinska A, Hunter F F, Hebert P D N. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes [J]. *Med Vet Ent*, 2006, 20(4): 413-424.
- [15] Burns J M, Janzen D H, Hajibabaei M, et al. DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides [J]. *J Lep Soc*, 2007, 61(3): 138-153.
- [16] Chase M W, Salamln N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: Short-term and long-term goals [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1462): 1889-1895.
- [17] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(23): 8369-8374.
- [18] Newmaster S G, Fazekas A J, Ragupathy S. DNA barcoding in land plants: Evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach [J]. *Can J Bot*, 2006, 84(3): 335-341.
- [19] Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, 2007, 56(2): 295-299.
- [20] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLOS One*, 2007, 2(6): e508.
- [21] Pennisi E. Wanted: A barcode for plants [J]. *Science*, 2007, 318(5848): 190-191.
- [22] Steane D A, de Kok R P J, Olmstead R G. Phylogenetic relationships between *Clerodendrum* (Lamiaceae) and other Ajugoid genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 32(1): 39-45.