

刘政泽, 刘 博. 基于 ITS + *matK* 序列探讨部分藤黄属植物的种间亲缘关系[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 39-42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.010

基于 ITS + *matK* 序列探讨部分藤黄属植物的种间亲缘关系

刘政泽, 刘 博

(中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081)

摘要:对 14 个藤黄属物种 26 份样品的 ITS 和 *matK* 进行 PCR 扩增和测序, 应用 Kimura 2-parameter 遗传距离与最大似然法 (ML) 和邻接 (NJ) 系统树分析法进行分析, 旨在研究其种间亲缘关系。结果发现, 所有藤黄属样品分为四大支且能明显分开, 显示出该属植物的亲缘关系。分布于亚洲和美洲的物种能够分开, 表明不同的地理环境造成了不同的进化方向。木竹子和菲岛福木在我国有较高的遗传多样性。ITS + *matK* 序列分析可作为藤黄属植物亲缘关系鉴定的手段。

关键词:藤黄属; DNA 条形码; ITS; *matK*; 亲缘关系

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0039-04

藤黄属 (*Garcinia*) 植物是藤黄科 (Clusiaceae) 乔木或灌木, 全世界约 450 种, 主要分布在热带亚洲、非洲南部及波利尼西亚西部。我国有 21 种, 其中 13 种为特有种, 产于台湾南部, 福建, 广东, 海南, 广西南部, 云南南部、西南部至西部, 西藏东南部, 贵州南部及湖南西南部^[1]。

藤黄属植物有很高的食用价值和药用价值。莽吉柿 (*G. mangotana* Linn.) 是一种著名的热带水果, 被称为“热带水果皇后”^[2]。本属植物富含天然苯甲酮成分, 具有很好的抗菌、抗病毒、抗细胞毒素、抗 HIV 和抗真菌活性特性^[3], 现代药理学证明, 部分藤黄属植物具有潜在的治疗 HIV^[4] 和癌症^[5] 的能力。Burkill 1966 年在《马来半岛经济作物》一书中记载了藤黄属植物可用于产后恢复, 治疗痛经、痢疾和发烧。

在我国, 藤黄属植物也有很广泛的用途, 如傣族、黎族等长期采摘大叶藤黄 (*G. xanthochymus* Hook. f. ex T. Anders.)、岭南山竹子 (*G. oblongifolia* Champ. ex Benth.) 和版纳藤黄 (*G. xipshuanbannaensis* Y. H. Li) 的果实当作水果和食物调料。中药藤黄是我国的传统药材, 中医用其治疗痢症、疔毒、溃疡、湿疮、肿瘤、顽癣、跌打损伤、创伤出血及烫伤等^[6]。金丝李 (*G. paucineris* Chun et How) 是我国二级保护植物和珍贵的用材树种^[7]。木竹子 (*G. multiflora* Champ. ex Benth.) 和岭南山竹子因其种子含油, 可用于制作肥皂和机械润滑油。藤黄属植物也是重要的观赏植物, 如大叶藤黄和木竹子都有很高的观赏价值, 常被用作园林树木^[8-9]。菲岛福木 (*G. subelliptica* Merr.) 是我国沿海地区营造防风林的理想树种。

由于藤黄属植物具有重要的价值, 研究其种间亲缘关系、系统发育, 为今后广泛地栽培利用提供基础资料很有必要。DNA 条形码是用一段短的标准的序列对物种进行鉴定的新方法, 具有快速、准确、可重复的特点, 为物种的鉴定和亲缘关系的研究提供了新思路^[10]。

在真核生物中, 核糖体 DNA 中的 18S、5.8S 和 28S 的基因组序列在大多数生物中趋于保守, 在生物种间变化小, 而内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 作为非编码区, 承受的选择压力较小, 相对变化较大, 并且能够提供详尽的系统学分析所需要的可遗传性状, 因此被广泛用于植物分类学研究中^[11-12]。Yapwattanaphum 等学者在先前的研究中已使用 ITS 序列探求部分东南亚藤黄属物种间的亲缘关系^[2,13]。*matK* 基因位于叶绿体 *trnK* 基因的内含子中, 编码一种参与 RNA 转录体中 II 型内含子剪切的成熟酶 (maturase), 是叶绿体基因组的蛋白编码区进化最快的基因之一, 其核苷酸变化也可为种间系统进化研究提供一定的信息。本研究基于 *matK* 和 ITS 序列^[14-15], 探讨藤黄属的亲缘关系和系统发育问题。

1 材料与与方法

1.1 材料

试验所用材料取自野外和植物园, 共 16 个物种 28 份样品, 其中藤黄属样品 14 种 26 份 (5 种在中国有分布), 选取藤黄科它属植物 *Mammea sessiliflora* 和 *Mesua ferrea* 作为外类群 (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取 使用改良后的 CTAB 法提取经硅胶干燥的叶片总 DNA^[16]。

1.2.2 DNA 序列的扩增和测序 (1) ITS 序列的扩增。参考 White 等的方法^[17] 使用引物 ITS-4 (5' - TCCTCCGCT TATTGATATGC - 3') 和 ITS-5 (5' - GGAAGTAAAAGT CGTAACAAGG - 3') 扩增 ITS1-5.8S-ITS2 完整序列。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 DNA 模板 1.0 μ L (10 ng)、2 \times

收稿日期: 2016-02-24

基金项目: 欧盟第七框架项目 (编号: PIRSES-GA-2009-269204)。

作者简介: 刘政泽 (1991—), 男, 湖北十堰人, 硕士研究生, 从事藤黄属植物亲缘关系和分子鉴定研究。Email: liuzhengze1991@163.com。

通信作者: 刘 博, 博士, 讲师, 从事民族植物学与植物资源学研究。

E-mail: boliu@muc.edu.cn。

表1 试验材料信息

编号	拉丁名	中文名	来源
1	<i>G. cowa</i>	云树	中国科学院西双版纳热带植物园
2	<i>G. cowa</i>	云树	中国科学院西双版纳热带植物园
3	<i>G. cowa</i>	云树	中国科学院西双版纳热带植物园
4	<i>G. hanburyi</i>	汉氏藤黄	中国科学院西双版纳热带植物园
5	<i>G. hanburyi</i>	汉氏藤黄	中国科学院西双版纳热带植物园
6	<i>G. hombroniana</i>	—	马来西亚国民大学种质资源库
7	<i>G. intermedia</i>	柠檬藤黄	中国科学院西双版纳热带植物园
8	<i>G. intermedia</i>	柠檬藤黄	中国科学院西双版纳热带植物园
9	<i>G. madruno</i>	—	圭亚那
10	<i>G. mangostana</i>	莽吉柿	中国科学院西双版纳热带植物园
11	<i>G. mangostana</i>	莽吉柿	海南省五指山
12	<i>G. mangostana</i>	莽吉柿	海南省五指山
13	<i>G. multiflora</i>	木竹子	云南省红河州
14	<i>G. multiflora</i>	木竹子	海南省五指山
15	<i>G. multiflora</i>	木竹子	海南省五指山
16	<i>G. nervosa</i>	—	马来西亚森美兰州 Psaoh 保护区
17	<i>G. oblongifolia</i>	岭南山竹子	中国科学院西双版纳热带植物园
18	<i>G. oblongifolia</i>	岭南山竹子	海南省福报山
19	<i>G. oblongifolia</i>	岭南山竹子	海南省福报山
20	<i>G. penangiana</i>	—	马来西亚森美兰州 Psaoh 保护区
21	<i>G. rostrata</i>	—	马来西亚森美兰州 Psaoh 保护区
22	<i>G. scortechinii</i>	—	马来西亚森美兰州 Psaoh 保护区
23	<i>G. subelliptica</i>	菲岛福木	海南省福报山
24	<i>G. subelliptica</i>	菲岛福木	中国科学院西双版纳热带植物园
25	<i>G. subelliptica</i>	菲岛福木	中国科学院西双版纳热带植物园
26	<i>G. urophylla</i>	—	马来西亚彭亨州弗雷泽山
27	<i>M. sessiliflora</i>	—	—

注：“—”表示无相关信息。

Taq PCR Green Mix (含有 Taq 酶, dNTP, 缓冲液等) 12.5 μ L、正反引物 (5 pmol) 各 1 μ L, 加双蒸灭菌水补足 25 μ L。PCR 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

(2) *matK* 序列的扩增: 通过文献查阅选择 *matK*-F (5' - CGTCTGACCATATTGCACTATG - 3') 和 *matK*-R (5' - CATGACACGACTTTACC - 3') 扩增 *matK* 序列^[18]。PCR 反应体系与 ITS 序列扩增相同。PCR 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增反应在 eppendorf PCR 仪 (Eppendorf, Hamburg, Germany) 上进行。

DNA 纯化和测序工作由北京铂尚生物技术有限公司完成。

1.2.3 DNA 数据的整理 使用 MEGA 6.0 对导入的序列进行对位排列 (alignment), 进一步手动校对和调整; ITS 及 *matK* 序列的头和尾参照 Genbank 上已有的相关系列确定; 各片段的 GC 含量通过 DNASTAR Lasergene 计算; 序列的变异位点、信息位点和保守位点个数由 MEGA 6.0 确定。

1.3 亲缘关系和系统发育分析

用 MEGA 6.0 计算 ITS + *matK* 序列的种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离, 数据采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 和邻接法 (neighbor-joining, NJ) 分析。其中邻接法分析采取 K2P 距离法, 进行 1 000 次自展重复检测支

持率; 最大似然法通过 Modeltest 确定最适模型 (Kimura 2-parameter + Gamma distributed), 自展数据值为 1 000 次, 以提高树中分歧的置信度^[19]。

2 结果与分析

2.1 序列测定结果

测序得到 ITS、*matK* 序列 56 条, 将其在 NCBI 上进行 BLAST 相似性检索, 均有较好的匹配程度, 确认所测序列为目标序列, 检索比对结果表明测序结果准确可靠。

2.2 序列分析

在序列长度方面, ITS (615 ~ 623 bp) 略短于 *matK* (699 ~ 715 bp)。在序列 GC 含量上, *matK* 和 ITS 明显不同, *matK* 只有 30.68%, 而 ITS 高达 51.63%。ITS 有 251 个变异位点, *matK* 相对较少, 变异位点数为 114 个 (表 2)。

2.3 K2P 遗传距离

ITS + *matK* 序列的种间 K2P 遗传距离为 0.004 6 ~ 0.191 8, 平均遗传距离为 0.076 3 (表 3)。其中, 岭南山竹子和云树间的遗传距离最小, 为 0.004 6; 菲岛福木和莽吉柿间的遗传距离最大, 为 0.191 8。

2.4 亲缘关系和系统发育分析

基于 ITS + *matK* 序列以 *M. sessiliflora* 和 *M. ferrea* 作为外类群, 通过最大似然法 (ML) 和邻接法 (NJ) 构建系统发育树 (图 1、图 2)。2 种不同方法所构建的发育树结构基本一致, 且能将本研究涉及的 14 种藤黄属样品区分开。所有样品

表2 ITS和matK片段的序列特征

来源	片段	G + C		变异位点数 (个)	信息位点数 (个)	保收位点数 (个)
		含量范围(%)	平均值(%)			
藤黄属	ITS	49.60 ~ 52.74	51.63	251	150	379
	matK	30.21 ~ 32.24	30.68	114	18	417
	ITS + matK	30.21 ~ 52.74	41.16	365	168	796
藤黄属和外类群	ITS	49.60 ~ 54.31	51.74	301	169	329
	matK	30.21 ~ 32.25	30.79	157	40	426
	ITS + matK	30.21 ~ 54.31	41.27	458	209	755

表3 ITS + matK 序列的种间 K2P 遗传距离

编号	品种	种间 K2P 遗传距离														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	<i>G. cowa</i>															
2	<i>G. hanburyi</i>	0.055 2														
3	<i>G. hombroniana</i>	0.058 9	0.042 7													
4	<i>G. intermedia</i>	0.081 6	0.080 5	0.081 6												
5	<i>G. madruno</i>	0.080 5	0.079 4	0.077 8	0.009 3											
6	<i>G. mangostana</i>	0.132 4	0.115 9	0.103 7	0.160 5	0.156 3										
7	<i>G. multiflora</i>	0.055 1	0.048 9	0.058 9	0.063 8	0.062 6	0.128 1									
8	<i>G. nervosa</i>	0.066 4	0.061 5	0.065 2	0.060 0	0.058 9	0.142 2	0.046 4								
9	<i>G. oblongifolia</i>	0.004 6	0.055 2	0.061 4	0.082 9	0.081 8	0.132 4	0.056 4	0.067 7							
10	<i>G. penangiana</i>	0.059 0	0.044 1	0.030 6	0.079 2	0.075 4	0.090 5	0.052 7	0.058 9	0.059 0						
11	<i>G. rostrata</i>	0.067 5	0.061 2	0.065 0	0.082 9	0.081 7	0.134 8	0.050 0	0.071 5	0.068 8	0.063 8					
12	<i>G. scortechinii</i>	0.058 9	0.015 1	0.053 9	0.085 7	0.083 2	0.125 5	0.053 9	0.064 0	0.061 5	0.052 7	0.066 3				
13	<i>G. subelliptica</i>	0.112 3	0.109 8	0.115 0	0.110 7	0.109 5	0.191 8	0.089 6	0.063 8	0.112 3	0.109 7	0.116 2	0.112 4			
14	<i>G. urophylla</i>	0.056 4	0.005 8	0.048 9	0.080 5	0.079 3	0.119 9	0.048 9	0.061 5	0.059 0	0.047 8	0.062 5	0.017 5	0.109 7		
15	<i>M. sessiliflora</i>	0.215 0	0.211 5	0.216 1	0.217 0	0.217 3	0.285 7	0.199 0	0.204 9	0.213 4	0.208 4	0.210 0	0.219 4	0.234 9	0.211 4	
16	<i>M. ferrea</i>	0.493 3	0.503 7	0.512 4	0.502 8	0.503 7	0.516 2	0.478 2	0.478 8	0.493 3	0.497 2	0.482 2	0.513 7	0.479 8	0.505 9	0.425 5

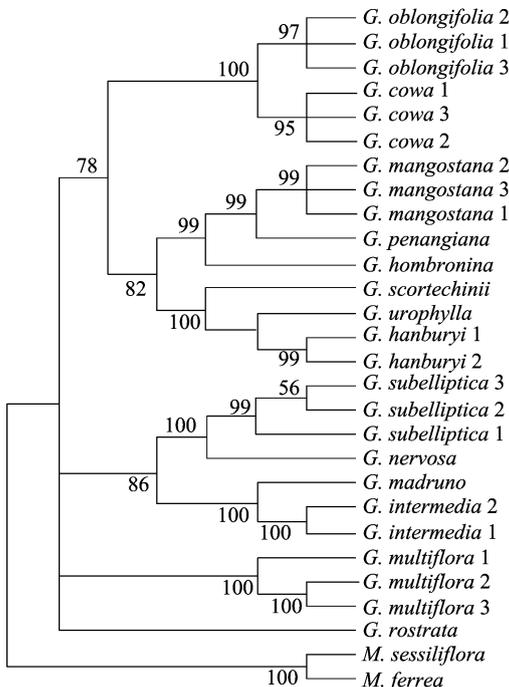


图1 藤黄属植物 ITS+matK 序列组合 NJ 树

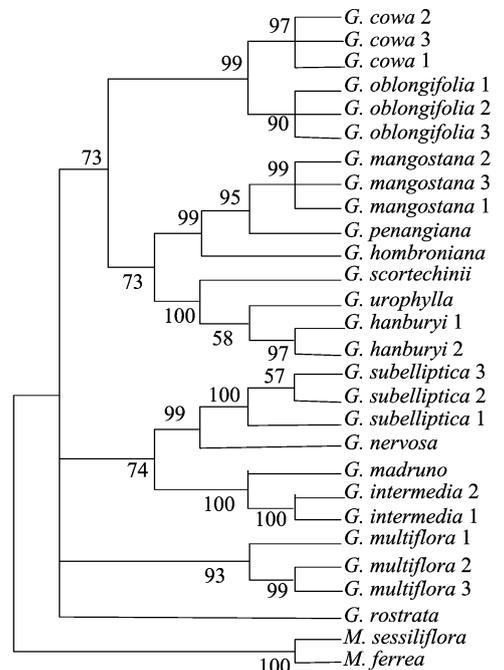


图2 藤黄属植物 ITS+matK 序列组合 ML 树

共聚类为四大支且主要集中于两大支,木竹子和 *G. rostrata* 分别自成一支。2种建树结果支持云树和岭南山竹子归为一支

(自展支持率分别为 99% 和 100%); 莽吉柿和 *G. penangiana*、*G. hombroniana*、*G. scortechinii* 等东南亚种亲缘关

系较近。系统发育树支持 *G. madruno* 和 *G. intermedia* 为一小支(自展支持率均为 100%),这与其均产自热带美洲相吻合。菲岛福木、*G. nervosa* 和 *G. madruna* 此 3 种亚洲物种与 *G. madruno* 和 *G. intermedia* 美洲物种聚为一支。

3 讨论与结论

28 份样品均成功扩增出 ITS 和 *matK* 片段,扩增成功率 100%。基于 ITS + *matK* 序列信息建树,能将所有样品区分开,说明 ITS + *matK* 序列可以为藤黄属物种的系统进化和亲缘关系研究提供足够的变异信息。和前人研究一致,*matK* 序列相对于 ITS 序列较为保守,进化速度较慢。

在系统发育树中,分布于亚洲和美洲的藤黄属物种基本能够分开,说明不同的地理环境使其产生了不同的进化方向。而木竹子和 *G. rostrata* 自成一支,则需要进一步的研究或使用其他 DNA 条形码探究其与其他物种之间的关系。菲岛福木、*G. nervosa* 和 *G. madruna* 此 3 种亚洲物种与美洲物种形成姐妹群,它们在藤黄属系统进化中的地位仍需更多的研究来确定。采自不同省份的木竹子和菲岛福木在其种内表现出遗传差异,说明它们具有较高的遗传多样性,并且进一步证明 ITS + *matK* 序列在藤黄属内有很好的鉴别能力。*G. penangiana* 在嫁接中当作砧木的砧木使用,在系统发育树中它们也是近缘种。

单独抽取系统发育树中分布于中国的物种,将其与基于形态学的经典分类法所得到的系统发育树相比较,展现了高度的相似性(图 3)。例如云树和岭南山竹子在形态学上很难区分,只能根据它们的果实性状和子房数进行分辨,本研究通过 DNA 条形码技术同样支持这一结果,其遗传距离最小只有 0.004 6。这一结果在一定程度上反映了经典分类系统的可靠性。

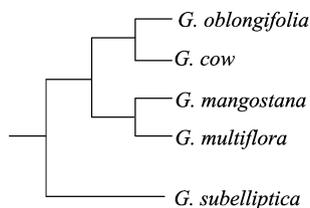


图3 藤黄属植物经典分类系统树

本研究利用 ITS + *matK* 序列通过 DNA 条形码技术初步探究了部分藤黄属植物的亲缘关系,期望为该属植物今后的开发利用提供必要的信息和数据。但是由于条件有限,所涉及物种较少,希望今后可以增加新材料,完善藤黄属植物的亲缘关系和系统发育研究。

参考文献:

[1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1990:1-112.

- [2] Yapwattanaphum C, Subhadrabandhu S, Honsho C, et al. Phylogenetic relationship of mangosteen (*Garcinia mangostana*) and several wild relatives (*Garcinia* spp.) revealed by ITS sequence data [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(3):368-373.
- [3] Wu S B, Long C L, Kennelly E J. Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones [J]. Natural Product Reports, 2014, 31(9):1158-1174.
- [4] Rukachaisirikul V, Pailee P, Hiranrat A, et al. Anti-HIV-1 protostane triterpenes and digeranylbenzophenone from trunk bark and stems of *Garcinia speciosa* [J]. Planta Medica, 2003, 69(12):1141-1146.
- [5] Nabandith V, Suzui M, Morioka T, et al. Inhibitory effects of crude alpha-mangostin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in the rat [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2004, 5(4):433-438.
- [6] 王鸣,冯煦,赵友谊,等. 中药藤黄的研究和应用[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(1):1-4.
- [7] 王才明,黄仕训,王燕. 广西国家级珍稀濒危保护植物种质资源调查研究[J]. 广西植物, 1994, 14(3):277-288.
- [8] 和太平,文祥凤. 优良的乡土园林树种——大叶山竹子[J]. 西南园艺, 2005, 33(3):39-39.
- [9] Zhang B X, Liu B, Zhou Y, et al. Potential ornamental plants in Clusiaceae of China [J]. Acta Horticulturae, 201(1087):233-238.
- [10] 刘宇婧,刘越,黄耀江,等. 植物 DNA 条形码技术的发展及应用[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(1):74-82, 93.
- [11] 卢松茂,陈振东,林秀香,等. 基于 rDNA-ITS 序列的天门冬拟茎点霉与相似种的系统发育关系[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1):62-67.
- [12] 魏莎莎,傅怡宁,薛华杰,等. 基于 ITS 序列的曼陀罗属植物的分类学研究[J]. 植物检疫, 2011, 25(5):12-16.
- [13] Nazre M, Latif A, Clyde M M. Phylogenetic relationships of locally cultivated *Garcinia* species with some wild relatives [J]. Malaysian Applied Biology, 2007, 36(1):31-40.
- [14] 冯媛媛,夏珊,曾其国,等. 基于 ITS 序列对紫薇的分子鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4):67-69.
- [15] 蒋向辉,刘良科,余朝文. 葛属 11 份种质基于核 rDNAITS 序列的亲缘关系分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7):46-49.
- [16] Doyle J. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990(12):13-15.
- [17] White J T, Bruns T, Lee S B, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. PCR protocols: a guide to methods and applications. Florida: Academic Press, 1990, 335.
- [18] 王亚玲,李勇,张寿洲,等. 用 *matK* 序列分析探讨木兰属植物的系统发育关系[J]. 植物分类学报, 2006, 44(2):135-147.
- [19] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4):783-791.