

# 基于 ITS序列的红山茶组植物系统发育关系的研究

田敏<sup>1\*</sup>, 李纪元<sup>1</sup>, 倪穗<sup>1,2</sup>, 范正琪<sup>1</sup>, 李辛雷<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400; <sup>2</sup>宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 测定了红山茶组 30 个物种的 ITS 序列, 利用茶作为外类群, 应用 PAUP 4.0 程序中的最大简约法构建了该组植物的系统发育关系。结果表明, 大部分红山茶组植物构成一个单系群, 这一单系群又分为两个分支。其中一个分支包括了分布在我国中南地区的大花红山茶、多齿红山茶以及分布在华东南地区的浙江红山茶、山茶等, 其自展支持率为 79% (Clade ); 另一个分支主要包括分布在我国西南地区的西南红山茶、金沙江红山茶、滇山茶等, 自展支持率为 92% (Clade )。根据 ITS 系统树并结合物种的形态特征及地理分布探讨了红山茶组植物的种间关系及其系统进化。

**关键词:** 山茶属; 红山茶组; ITS 序列; 系统发育

中图分类号: S 685.14 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 11-1685-04

## Phylogenetic Study on Section *Camellia* Based on ITS Sequences Data

TIAN Min<sup>1\*</sup>, LI Ji-yuan<sup>1</sup>, NI Sui<sup>1,2</sup>, FAN Zheng-qi<sup>1</sup>, and LI Xin-lei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China; <sup>2</sup>College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

**Abstract:** Internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA from 30 taxa of Section *Camellia* were sequenced and analyzed. Taking *C. sinensis* as an outgroup, phylogenetic analysis of ITS sequences was conducted by using PAUP 4.0. The results indicated that the most plant in Section *Camellia* formed a monophyletic group. This group could be divided into two main clades (Clade and Clade ). The Clade included the species distributed in central south and southeast of China, supported by bootstrap value of 79%. The species distributed in southwest China formed another clade with bootstrap value of 92%. The taxonomic and evolutionary relationships in Section *Camellia* were discussed based on the phylogenetic analysis of ITS sequences, morphological characters and geographical distribution.

**Key words:** *Camellia*; Section *Camellia*; ITS sequence; phylogeny

红山茶组 (Sect *Camellia*) 植物隶属山茶科山茶属 (*Camellia*), 是山茶属中种类最多的类群, 集中分布于我国长江以南的亚热带地区。该组植物多数为园艺观赏花木及木本油料树种, 具有重要的观赏价值和经济价值。Sealy (1958) 提出红山茶组包括 8 个物种, 张宏达 (1981)、张宏达和任善湘 (1998) 在中国植物志中列出了红山茶组植物 55 种, 而闵天禄 (1998, 2000) 将该组合并为 12 种 6 变种。因此利用分子标记技术对该组植物的系统学进行研究, 为其科学分类提供进一步的佐证是十分必要的。

核糖体 DNA 的内转录间隔区 (ITS) 序列在研究属内种间和较近的族间、属间关系时都表现出较高的趋异率与信息位点百分率, 已作为重要的分子性状用于种间的系统学研究, 为类群内部的系统

收稿日期: 2008 - 06 - 11; 修回日期: 2008 - 10 - 13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471420)

\* E-mail: min115@163.com

重建提供了较好的支持 (Stanford et al, 2000)。本研究中对红山茶组 30个物种及外类群茶的 ITS进行了序列测定, 重建了红山茶组植物的 ITS系统发育树, 试图为红山茶组植物的分类学和系统学研究提供新的分子水平的依据。

## 1 材料与方 法

试材 (图 1) 均采自金华国际山茶物种园。该物种园中的山茶物种均采用中国植物志中的分类系统, 因此本试验中在采样及聚类分析时也采用这一系统。2006年 4月中旬采集当年新生的幼嫩叶片, DNA提取、聚合酶链式反应 (PCR) 在中国林业科学研究院亚热带林业研究所分子生物学实验室进行。

用改良的 CTAB 法提取新鲜叶片总 DNA。ITS-PCR 反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ , 其中包括 0.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物、2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、0.2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP、1.2 U *Taq* polymerase、50 ng 模板 DNA。引物序列为 P1 (5'-AACAAAGTTTCCGTAAGGTGA-3') 和 P2 (5'-TATGCTTAAA YTCAGCGGGT-3')。PCR 扩增反应在 PTC-100型 PCR 仪上进行。PCR 反应程序为: 94 预变性 5 min; 94 变性 45 s, 53 退火 50 s, 72 延伸 1.5 min, 40个循环; 72 延伸 8 min。PCR 产物经纯化试剂盒 (Promega公司) 纯化后直接作为测序模板。测序反应在上海生工生物工程技术有限公司 AB B77 自动测序仪上进行。测序引物为 P1和 P2, 为保证序列的准确性, 进行了双向测序, 所得序列在 GenBank 中的登录号见图 1。

用 Clustal X 软件对所得的 ITS 序列进行对位排列, 然后手工校正。以茶组植物茶作为外类群, 用 PAUP 4.0 软件进行系统发育分析 (Swofford, 2000)。所有的空位 (gap) 作缺失 (missing) 处理。采用最大简约法进行分析, 用完全启发式 (Heuristic) 搜索获取简约树。为进一步检验简约树中各分支的支持度, 进行 1 000 次自展 (bootstrap) 计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 ITS 序列分析

红山茶组植物的 ITS 区 (含 5.8S) 序列长度变异范围为 634 ~ 669 bp, 存在插入与缺失。ITS1 区的长度为 239 ~ 260 bp, 平均为 251.1 bp, ITS2 的长度在 211 ~ 249 bp 之间, 平均为 238.9 bp。5.8S 序列长度均为 164 bp, 在所有红山茶组植物中不存在缺失。整个 ITS 区的平均 GC 含量为 68.18%, 其中 ITS2 的 GC 含量为 75.76%, 比 ITS1 (70.00%) 的高。

当空位作缺失处理时, ITS 区全序列排序后的长度为 695 位点, 其中有 94 个变异位点, 占总位点数的 13.53%。在变异位点中有 71 个为简约信息位点, 占总位点数的 10.22%。对红山茶组植物的 ITS 各个区域进行独立分析后发现, ITS1 区域有 39 个简约信息位点, ITS2 区域有 29 个, 因此 ITS1 比 ITS2 有更多的信息量。另外有 3 个信息位点存在于 5.8S 区段中。

### 2.2 系统发育分析

从系统图 (图 1) 上看出, 在供试的植物材料中除了短蕊红山茶、息烽红山茶、大果红山茶和莽山红山茶外, 其它大部分物种形成两个类群。

其中一个类群主要包括分布在我国中南及华东南地区的物种, 其自展支持率为 79% (Clade ); 另一个类群包括分布于我国西南地区的金沙江红山茶、滇山茶等, 自展支持率为 92% (Clade )。这表明, 红山茶组植物之间的亲缘关系同其地理分布存在一定的相关性, 同一地理区域内的物种具有较近的亲缘关系。

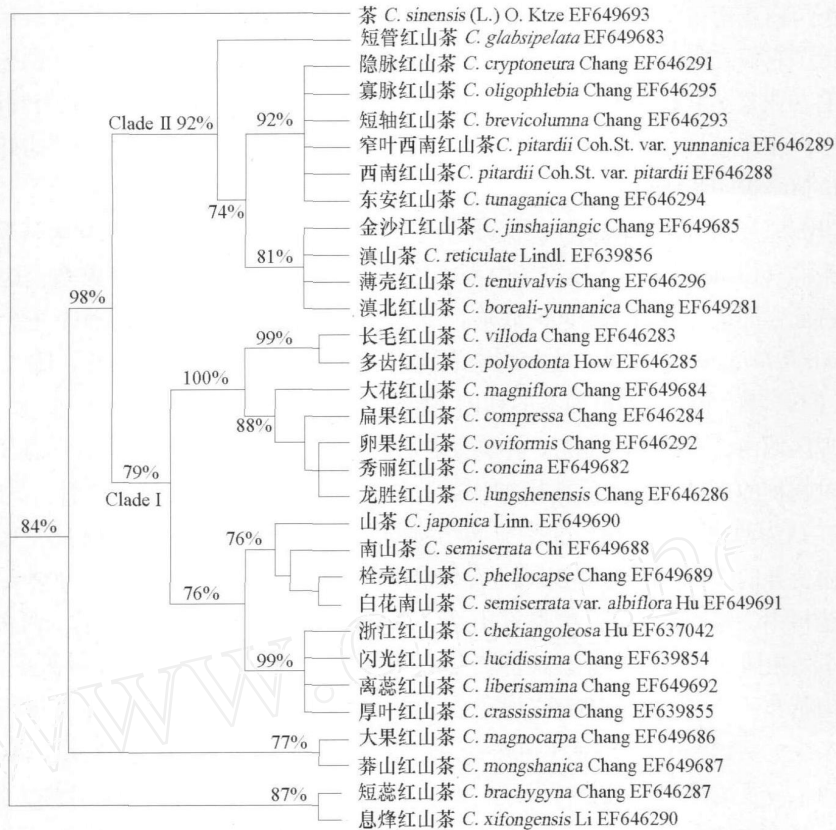


图 1 红山茶组植物基于 ITS 序列的最大简约树

步长为 127, 一致性指数 (CI) 为 0.795, 维持性指数 (RI) 为 0.938。

Fig. 1 The maximum parsimony tree of the Section *Camellia* based on ITS sequences

Length = 127, CI = 0.795, RI = 0.938

### 3 讨论与结论

基于 ITS 序列构建的红山茶组植物的系统发育树表明, 分布于我国中南、华东南地区的浙江红山茶、山茶、南山茶、多齿红山茶、大花红山茶及其它一些物种形成一个单系群 (Clade)。其中, 除了多齿红山茶外, 其它物种都具有共同的形态特征, 即苞、萼花后宿存。苞、萼花后多少宿存或与花瓣同时脱落是山茶组植物种间形态分化的主要表现 (闵天禄, 1998)。它们的子房被毛或无毛。在染色体倍性上, 这些植物大多数是二倍体, 多倍体类型较少 (张文驹和闵天禄, 1998)。

在这一类群中, 浙江红山茶、闪光红山茶、厚叶红山茶、离蕊红山茶构成一单系分支, 其自展支持率高达 99%, ITS 序列测序结果相同。它们的子房均无毛, 只在苞、萼数及花丝合生程度上稍有不同。在张宏达 (1981) 系统中它们均属于光果红山茶亚组 (Subsection *Lucidissima*), 而闵天禄 (2000) 对其进行了归并。浙江红山茶主要分布于浙江、江西、湖南东部、福建北部等地区, 其他 3 种主要分布于江西省内, 四者 ITS 序列证据、地理分布及形态特征基本一致, 显示了密切的亲缘关系。

长毛红山茶与多齿红山茶在系统树上的自展支持率为 99%, 表明二者极具亲缘关系, 这与形态性状的分类一致, 张宏达 (1981) 系统中二者同属毛蕊系, 而闵天禄 (2000) 对二者进行了归并; 这也与 RAPD 分子标记的结果 (邓白罗等, 2006) 一致。另外, 卵果红山茶与多齿红山茶在形态上相近, 但多齿红山茶的花丝管有毛, 蒴果近木质 (张宏达和任善湘, 1998), 二者的 ITS 序列存在 5 个位点的差异。在系统树中, 这 3 个物种与大花红山茶、扁果红山茶、秀丽红山茶及龙胜红山茶构成一个单系分支并获得强的支持率 (100%), 说明它们在遗传上高度同源。

栓壳红山茶与白花南山茶的 ITS 序列存在一个位点的差异, 白花南山茶与南山茶有 5 个位点的差异, 系统树支持了它们之间的亲缘关系。莽山红山茶和大果红山茶的形态相近, 区别在于前者的果实较小, 种子有毛 (张宏达和任善湘, 1998; 高继银, 2005), 测序分析表明二者具有相同的 ITS 序列, 但与南山茶的序列相差较远。在系统树中, 二者与红山茶组的其它大多数物种构成姐妹群关系, 因此它们的分类地位值得进一步研究。

分布于云贵高原及四川西南部金沙江流域的滇山茶、西南红山茶、金沙江红山茶等在系统树中构成了另一个单系群 (Clade), 与分布于中南、华东南的类群形成了姐妹群关系。这一类群在形态上具有共同的特征, 即苞、萼与花瓣同时脱落, 子房均被绒毛。在张宏达系统中, 它们均属于滇山茶亚组 (Subsection *Reticulata*)。同时, 这些物种表现出较复杂的染色体倍性变化, 除了二倍体外, 还有多倍体类型 ( $3x$ ,  $4x$ ,  $6x$ ), 如滇山茶的种内多倍体广泛存在。

在这一地理区域内, 自然环境复杂, 不同的物种在分布上常常交叉、重叠, 形态变异多样。人为因素如杂交等对物种的多样性也有重要影响, 这些物种存在着普遍的种内多倍性 (闵天禄, 1998)。闵天禄 (1998) 认为西南山茶作为广布种分布于贵州及其周边地区, 隐脉红山茶、龙胜红山茶等均是西南山茶种内变异的片段, 并将金沙江流域和云南的红山茶组植物的绝大部分种类归并到滇山茶中。在分子系统树中, 隐脉红山茶、寡脉红山茶、短轴红山茶、窄叶西南红山茶、西南红山茶和东安红山茶的 ITS 序列相同并聚成一小支, 其自展支持率为 92%, 显示了密切的亲缘关系; 金沙江山茶、滇山茶、滇北山茶和薄壳红山茶的 ITS 序列完全相同并聚在一起, 与西南红山茶等形成一个姐妹群关系, 二分支的亲缘关系得到中度支持 (74%), 而且这些种基本上是平行支关系, 不存在种下的分化。通过对这两个分支的序列比对分析发现它们的 ITS 序列具有一定程度的杂合性, 这可能与杂交、基因流等有关。总之, 鉴于我国西南地区自然条件的复杂性及物种形态的多样性, 有必要从居群出发, 采集更多的样品进一步阐明红山茶组植物的种间关系和系统发育。

## References

- Deng Bai-luo, Tan Xiao-feng, Qi Long-lin, He Jing, Hu Fang-ming. 2006. RAPD analysis and taxonomy of Sect *Camellia* species in *Camellia*. *Scientia Silvae Sinicae*, 42 (5): 36 - 41. (in Chinese)
- 邓白罗, 谭晓风, 漆龙霖, 贺晶, 胡芳名. 2006. 山茶属红山茶组植物的 RAPD 分析及分类研究. *林业科学*, 42 (5): 36 - 41.
- Gao Ji-yin. 2005. Collected species of the genus *Camellia* an illustrated outline. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press (in Chinese)
- 高继银. 2005. 山茶属植物主要原种彩色图集. 杭州: 浙江科学技术出版社.
- Min Tian-lu. 1998. The classification, differentiation and distribution of the genus *Camellia* Sect *Camellia*. *Acta Botanica Yunnanica*, 20 (2): 127 - 148. (in Chinese)
- 闵天禄. 1998. 山茶属山茶组植物的分类、分化和分布. *云南植物研究*, 20 (2): 127 - 148.
- Min Tian-lu. 2000. Monograph of the genus *Camellia*. Kunming: Yunnan Science and Technology Press (in Chinese)
- 闵天禄. 2000. 世界山茶属的研究. 昆明: 云南科技出版社.
- Sealy J R. 1958. A revision of the genus *Camellia*. London, UK: Royal Horticultural Society
- Stanford A M, Harden R, Parks C R. 2000. Phylogeny and biogeography of Jugland (Juglandaceae) based on mat K and ITS sequence. *American Journal of Botany*, 87: 872 - 882.
- Swofford D L. 2000. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4. Sunderland: Sinauer Associates
- Zhang Hong-da. 1981. A taxonomy of the genus *Camellia*. Guangzhou: Zhongshan University Press (in Chinese)
- 张宏达. 1981. 山茶属植物的系统研究. 广州: 中山大学出版社.
- Zhang Hong-da, Ren Shan-xiang. 1998. *Flora reipublicae popularis sinicae*. Volume 49 (3). Beijing: Science Press (in Chinese)
- 张宏达, 任善湘. 1998. 中国植物志, 第 49 卷第 3 分册. 北京: 科学出版社.
- Zhang Wen-ju, Min Tian-lu. 1998. Cytogeographical study of *Camellia*, Sect *Camellia*. *Acta Botanica Yunnanica*, 20 (3): 321 - 328. (in Chinese)
- 张文驹, 闵天禄. 1998. 山茶属山茶组的细胞地理学研究. *云南植物研究*, 20 (3): 321 - 328.