



基于 *matK* 基因的几种重要重楼属植物 遗传关系分析

马剑¹, 李迪强², 张于光², 薛达元^{1*}

(1. 中央民族大学 生命与环境科学学院, 北京 100081;

2. 中国林业科学研究院 森林生态环境与保护研究所 国家林业局 森林生态环境重点实验室, 北京 100091)

[摘要] 目的:利用叶绿体 *matK* 基因序列探讨重楼属植物的 10 个样品系统发育及分子鉴定,为重楼的保护和合理利用提供基本理论依据。方法:从分布于湖南省、云南省和吉林省的 10 个重要的重楼类群样品中提取总 DNA,经扩增纯化后,利用 PCR 产物直接测序。结果:测定了 10 个重要的重楼类群样品的 *matK* 基因序列,序列长度为 1 039 bp,比较了该基因的差异,构建了基于 *matK* 基因序列的遗传进化树。结论:这 10 个重楼属植物样品可以划分为 4 个组群,*matK* 基因序列的结果不支持长药隔重楼、滇重楼、短梗重楼、七叶一枝花成为独立的变种,建议作为多叶重楼的变型处理。

[关键词] 重楼属;*matK* 基因;遗传关系

重楼属 *Paris* 植物是延龄草科 Trilliaceae 的一个重要的类群,分布于欧亚大陆的热带及温带地区,全世界约有 24 种,我国为该属植物的分布中心之一,有 19 个种,多分布于西南地区^[1-2]。重楼属植物具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,可以用于痈疮、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌打伤痛、惊风抽搐等症^[3-4],云南白药中的君药即是重楼属植物。随着研究的日益深入,重楼属植物的药用价值逐渐受到重视。由于重楼药用价值高,导致民间滥挖严重,又因药用部位生长周期长,自然繁殖效率低,生长缓慢,所以野生资源可采量面临枯竭,在滇中、滇东等许多地区已濒临灭绝。因此对于重楼的种质资源多样性保护和资源的可持续利用已迫在眉睫。

近年来,迅速发展的分子生物学技术逐渐被引入重楼属植物的研究中,为重楼属植物的分类、重楼资源的保护和利用提供了许多有力的依据^[5-8]。*matK* 基因(tRNA 成熟酶编码基因)位于叶绿体赖氨酸 tRNA 基因(tmK)高度保守的 2 个外显子之间的

内含子中,长约 1 500 bp,为单拷贝编码基因,编码一种成熟酶(maturase),这种成熟酶参与 RNA 转录本中 II 型内含子的剪切^[9]。*matK* 基因是叶绿体基因组中编码蛋白基因中进化较快的基因之一^[10],其中 3'端比较保守,5 端变异较大,因此 *matK* 基因具有重要的系统学价值,适合用于种群遗传多样性和种间或种内的系统发育分析^[11-12]。

这些自然保护区的植物区系成分比较清楚,重楼属植物的种群数量比较稳定。本研究从中采集了 10 个经常入药的重楼属植物样品,通过对 *matK* 基因的序列测定,试图分析这些物种的遗传多样性,探讨其亲缘关系,为重楼的保护和合理利用提供基础数据和科学依据,也将为重楼属植物高产栽培和育种应用提供理论指导。

1 材料

实验材料采自湖南省壶瓶山自然保护区、云南省高黎贡山自然保护区和吉林省长白山自然保护区这 3 个国家级自然保护区的试验区,均为新鲜活体样本。分别由吉首大学张代贵教授和中国林业科学院李建文教授进行鉴定(表 1)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

DNA 提取参照邹喻莘等^[13-14]的 CTAB 法。取 0.5 g 干叶置于预冷研钵内,加入液氮研磨成粉末状,转入 1.5 mL EP 管中,再加 1 mL 已预热的 CTAB,65 °C 温育 1 h,5 000 × g 离心 5 min,取上清液加等体积的氯仿-异戊醇

[收稿日期] 2009-04-14

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD03A1202); 国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21404)

[通信作者] *薛达元,教授,研究方向为生物多样性保护研究, Tel: (010)68931632, E-mail: xuedayuan@hotmail.com

[作者简介] 马剑,硕士研究生,主要从事植物学生态学研究, E-mail: sword1556@163.com

表 1 研究材料基本信息

物种名称	采集地	海拔/m	经纬度
七叶一枝花 <i>Paris polyphylla</i> var. <i>chinenis</i>	壶瓶山自然保护区	1 031	E110°41'3"N30°0'22"
狭叶重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>stenophylla</i>	壶瓶山自然保护区	1 285	E110°38'3"N29°59'1"
短梗重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>appendiculata</i>	壶瓶山自然保护区	1 667	E110°45'1"N30°2'58"
巴山重楼 <i>P. bashanensis</i>	壶瓶山自然保护区	1 826	E110°45'1"N30°2'53"
凌云重楼 <i>P. cronquistii</i>	壶瓶山自然保护区	908	E110°16'2"N30°2'53"
多叶重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>polyphylla</i>	壶瓶山自然保护区	1 722	E110°45'5"N30°2'53"
宽叶重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>Stenophylla</i>	壶瓶山自然保护区	1 588	E110°45'1"N29°56'2"
北重楼 <i>P. verticillata</i>	长白山自然保护区	896	E127°56'4"N42°21'1"
滇重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	高黎贡山自然保护区	1 788	E98°45'42"N24°56'1"
长药隔重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>pseudothibetica</i>	壶瓶山自然保护区	1 355	E110°33'1"N30°17'5"

(24:1) 溶液后充分混匀(8 min); 1 万 × g 离心 15 min; 取上清液加 100 μL 10 mol · L⁻¹ 的 NaCl 溶液和 0.6 倍的异丙醇沉淀 DNA。1 万 × g 离心 10 min 后收集沉淀, 干燥后溶于 100 μL 的 TE 缓冲液中。电泳检测 DNA 的浓度及其相对分子质量大小。用分光光度计测定 DNA 的纯度。

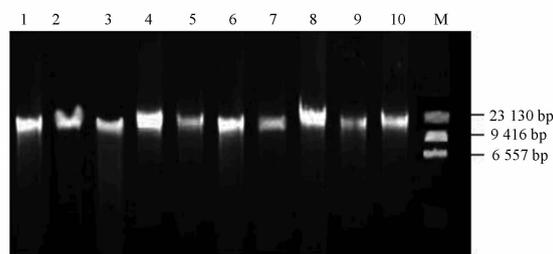
2.2 PCR 扩增和引物筛选 根据 Osaloo 等^[11] 使用的延龄草属植物 *matK* 基因的 11 对引物中筛选出 1 对扩增条带清晰、稳定性和重复性好的引物 *trnK-ff74/matK-TR1* 用于 PCR 扩增, 其序列为 *trnK-ff74*: 5'-ATACCCTGTTCGGACCATATTG-3', *matK-TR1*: 5'-CCGCCGAAGGATTTATTAGTACA-3'。PCR 反应在 Mstercycler 梯度 PCR 仪上进行, 每个反应重复 3 次。反应体系为 (50 μL) 10 × PCR Buffer 5 μL, 0.2 mmol · L⁻¹ dNTPs, 0.5 μmol · L⁻¹ 引物, *Taq* 酶 2.5 U, 模板 DNA 2 μL。反应条件为 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 50 s, 50 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 9 min。产物用 SYBR green 染色, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用 infinity-3026 凝胶成像仪保存图像。以上试剂均购于天根生化科技有限公司。

2.3 序列测定、序列分析和遗传进化树的构建 PCR 产物由上海生工生物工程公司测序。测得的序列经 DNAMAN 5.2.2 软件和 Blast 进行分析。利用 MEGA 3.1 软件进行系统发育分析, 构建遗传进化树, 空位 (gap) 被处理为缺失 (missing)。将测定的基因序列提交到 GenBank 数据库, 在数据库中的登录号为 FJ531535-FJ531544。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取效果 经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, DNA 的提取得到了较好的效果 (图 1)。分光光度计测定 DNA 纯度为, A_{260}/A_{280} 为 1.780 ~ 1.831,

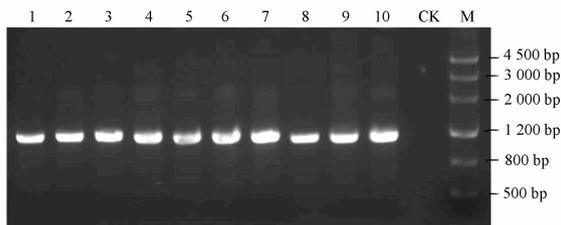
A_{260}/A_{230} 为 1.950 ~ 2.210。



1 ~ 10. 重楼总 DNA; M. λDNA/*Hind* III maker。

图 1 重楼总 DNA 电泳图

3.2 PCR 扩增结果 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到约 1 100 bp 的片段, 电泳条带比较理想 (图 2)。



1 ~ 10. PCR 扩增产物电泳带; CK. 空白对照; M. marker III。

图 2 PCR 产物电泳图

3.3 基于 *matK* 基因序列的重楼遗传关系分析 本实验测得 10 个重楼样品的 *matK* 基因的部分序列, 长度为 1 039 bp, 共发现 22 个碱基变异位点。利用 DNAMAN 软件, 分析了 10 个重楼样品 *matK* 基因序列的差异。结果表明: ①长药隔重楼、滇重楼、短梗重楼、多叶重楼、七叶一枝花的 1 039 个碱基序列完全相同, 碱基差异为 0; ②宽叶重楼与上述 5 种重楼有 2 个碱基的差异, 狭叶重楼与上述 5 种

重楼有 3 个碱基的差异;③上述 5 种重楼与凌云重楼有 5 个碱基的差异;④巴山重楼与上述 8 种重楼有 9 个碱基的差异;⑤北重楼与其他 9 种重楼的碱基差异为 11~18 个,其中包括北重楼比其他 9 种重楼多出来的 6 个碱基的插入序列。

利用 MEGA3.1 分析软件,构建了 10 个重楼样品的遗传进化树(图 3)。从遗传进化树可以看出,它们分成了 4 个组群。长药隔重楼、滇重楼、短梗重楼、多叶重楼、七叶一枝花、宽叶重楼、狭叶重楼归为 1 组;凌云重楼归为 1 组;巴山重楼归为 1 组;北重楼归为 1 组,与其他 3 个组有着显著的遗传距离上的差距。

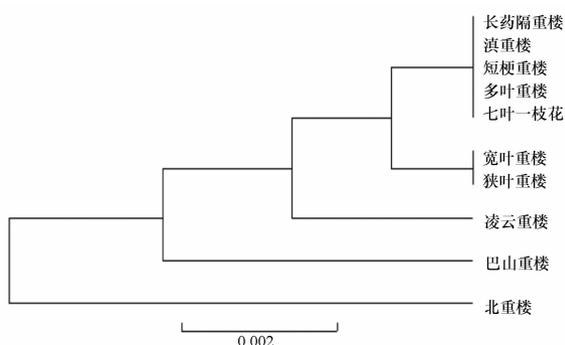


图 3 基于 *matK* 基因 10 个重楼类群的遗传进化树分析

4 讨论

遗传变异在分子水平上的直接表现形式是核酸序列。通过 DNA 序列分析,可获得有关生物遗传变异的直观、确切的信息,可以得到足够量的信息来直接度量 DNA 序列的遗传变异,从而揭示从个体间到物种间不同层次的变异,分析结果可靠,可比性强。与其他研究遗传变异的分子生物学研究手段相比,DNA 序列分析的方法具有独到的优越性。*matK* 基因是叶绿体基因组中编码蛋白基因中进化比较快的基因之一,在种群遗传多样性和种间或种内的系统发育分析方面具有重要的系统学价值^[13-14]。曾被用于含笑亚族及其近缘种、石杉科石杉属植物的分子鉴定或分类^[15-16]。

由于重楼属植物个体水平上几乎所有形态性状的变异范围都很广,如叶片形状从倒卵形到披针形呈连续变化,重楼繁殖器官和营养器官在数量性状形态变异上具有很高的同步性等一些性状特征^[17],使重楼属的分类系统发生过较多的分歧和争议^[9]。

从本研究结果看,长药隔重楼、滇重楼、短梗重

楼、多叶重楼、七叶一枝花它们的 *matK* 基因 1 039 个碱基序列完全相同,碱基差异为 0,聚为一支,支持 Takhtajan 的观点。Takhtajan^[17]把重楼植物划分为 3 个独立的属 *Paris*, *Kinugasa* 和 *Daiswa*,并未对种下进行的细分,认为重楼属植物可以形成多个地理宗。近年对重楼属植物分子水平研究结果大都倾向于 Takhtajan 的观点。在细胞学水平上,长药隔重楼、滇重楼、短梗重楼、多叶重楼、七叶一枝花的核型一致,属于 4t 型,同一核型的种类在亲缘关系上也比较接近^[1]。本研究认为长药隔重楼、滇重楼、短梗重楼、七叶一枝花可能是多叶重楼 *P. polyphylla* 的不同地理宗,也可能仅仅是其营养器官的变异。因此,本研究建议把长药隔重楼、滇重楼、短梗重楼、七叶一枝花这些分类群作为多叶重楼的变型处理较为恰当,而不是作为多叶重楼的不同变种。宽叶重楼、狭叶重楼跟上述 5 个分类群的 *matK* 基因差异很小,只有 2~3 个碱基的区别,还是与上述 5 个分类群聚在一起,说明这 7 个分类群有很近的亲缘关系,支持了李恒分类系统中把宽叶重楼、狭叶重楼作为多叶重楼的变种处理的观点,同时也说明生境对重楼属植物表型有较大环境饰变作用^[18]。

重楼属植物是在上新世或以前起源于亚洲大陆滇、黔、桂地区热带环境,然后向西、向北扩展,因此在细胞学的进化上是由热带核型向温带核型过度。凌云重楼属于热带核型,被认为是重楼属植物中比较原始的种类^[1]。在 *matK* 基因的序列上,凌云重楼与多叶重楼(及其 7 个分类群)关系较近,这与 Ji 等^[9]通过 *psbA-trnH*, *trnL-trnF* + *psbA-trnH* 和 ITS 所获得的结果相似,说明这 2 个种之间确实存在较近的亲缘关系。

巴山重楼在基于 *matK* 基因的遗传进化树中单独聚为一支,这与它在进化上的地位有非常密切的关系。依据细胞地理学的分析,巴山重楼是热带核型向温带核型过度的类型,它的中核对称性最强,在形态学上巴山重楼的叶片数目剧减,只有 4~5 片叶子,植株比较矮小^[1],这些特征都区别与其他重楼属植物而单独成为一支。

北重楼长期生长在寒冷的长白山地区,其生境与南方重楼有着巨大的差异,地理位置上的巨大差别和生境中气候条件的显著差异导致北重楼不可能与南方品种进行基因交流,在长期的进化过程中,逐渐产生了遗传物质上的差异,因而,北重楼与其他重



楼属植物的遗传距离较远,单独分为一支,这与北重楼在形态学上单独被划分为一组的结果一致。

本研究在分子生物学水平上对重楼属植物遗传物质进行探讨,深入了解重楼植物在生态适应和进化过程中的自身遗传与环境共同作用的关系具有重要意义。本研究利用 *matK* 基因部分序列,并结合重楼的生境,比较和分析了 10 个重楼样品遗传关系,这将为重楼属植物的保护、引种驯化、标准化种植和合理利用提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 李恒. 重楼属植物[M]. 北京:科学出版社,1998:3.
- [2] 邓子超,黄玮,张文生,等. 滇重楼研究进展[J]. 中国医药技术经济与管理,2007:57.
- [3] 丁至遵. 甾体激素药源植物[M]. 北京:科学出版社,1984:99.
- [4] 石晓枫,杜德极. 重楼的药理研究及应用概况[J]. 中医药信息,1991,8(4):42.
- [5] 李云飞,唐荣华,顾志建. 18-26SrDNA 在 4 种重楼属植物中的定位[J]. 植物分类学报,2004, 42(5):419.
- [6] 张金渝,虞泓,张时刚,等. 多叶重楼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性,2004, 12(5):517.
- [7] 张瑞,唐铭霞,翁周,等. 重楼属植物 AFLP 实验体系的建立[J]. 四川大学学报:自然科学版,2006, 43(5):1105.
- [8] 唐荣华,王丽,唐小为,等. 十一种重楼属植物的 RAPD 分析[J]. 四川大学学报:自然科学版,2003, 40(4):779.
- [9] Ji Y H, Fritsch P W, Li H, et al. Phylogeny and classification of

Paris (Melanthiaceae) inferred from DNA sequence data[J]. *Ann Bot*, 2006, 98:245.

- [10] Kato H, Kawano S, Terauchi R, et al. Evolutionary biology of *Trillium* and related genera (Trilliaceae). I. Restriction site mapping and variation of chloroplast DNA and its systematic implications[J]. *Plant Sci*, 1995a, 10:17.
- [11] Kazempour Osaloo S, Kawano S. Molecular systematics of Trilliaceae. II. Phylogenetic analyses of *Trillium* and its allies using sequences of *rbcL* and *matK* genes of cpDNA and internal transcribed spacers of 18S-26S nrDNA[J]. *Ann Bot*, 1999, 14:75.
- [12] Kazempour Osaloo S, Utech F H, Ohara M, et al. Molecular systematics of the Trilliaceae. I. Phylogenetic analysis of *Trillium* using *matK* gene sequences[J]. *J Plant Res*, 1999, 112:35.
- [13] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001:67.
- [14] 张金渝,文国松,虞泓,等. 重楼属植物 DNA 提取方法的研究[J]. 生物技术,2005,15(4):39.
- [15] 金虹,施苏华,潘恒昶,等. 含笑亚族及其近缘植物 *matK* 基因序列分析[J]. 中山大学学报:自然科学版,1999,38(1):93.
- [16] 姬生国,潘胜利,王峻,等. 基于叶绿体 *matK* 基因序列探讨 10 种石杉科石杉属植物的系统关系及分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2007,32(19):1971.
- [17] Takhtajan A. A revision of *Daiswa* (Trilliaceae) [J]. *Brittonia*, 1983, 35:255.
- [18] 翁周,王丽,唐锐,等. 多叶重楼形态变异研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2008,45(5):1228.

Phylogenetic analyses of some important *Paris* species based on sequences of *matK* gene

MA Jian¹, LI Diqiang², ZHANG Yuguang², XUE Dayuan^{1*}

(1. College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081;

2. Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, and Key Laboratory of Forest Ecology and Environment of State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

[Abstract] The *matK* genes of 10 samples in *Paris* from Hunan, Yunnan and Jilin provinces were sequenced and compared. The phylogenetic tree was constructed based on the *matK* gene sequences and the ten pairs samples were divided into four groups. The results did not support the reality of four taxa named *P. polyphylla* var. *pseudothibetica*, *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, *P. polyphylla* var. *appendiculata* and *P. polyphylla* var. *chinensis*. They are supposed to be treated as different forms of *P. polyphylla* var. *polyphylla*.

[Key words] *Paris*; *matK* gene; genetic evolution

doi: 10.4268/cjcm20100103

[责任编辑 吕冬梅]