

基于 ITS 序列探讨蓝靛果忍冬(*Lonicera caerulea* var. *edulis*) 的系统位置

朱 颖^{1,2}, 董玉芝^{1*}, 咎少平³

(1. 新疆农业大学 林学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 乌鲁木齐市植物园, 新疆 乌鲁木齐 830011;
3. 乌鲁木齐市林业(园林局), 乌鲁木齐 830002)

摘 要:以七子花(*Heptacodium miconioides*)为外类群,使用 MEGA3.1 软件对忍冬属的 20 种植物的 ITS 序列进行分析,用邻接法获得系统树。结果表明:蓝靛果忍冬(*Lonicera caerulea* var. *edulis*)与蓝果亚组(Subsect. *Caerulea* Rehd.)的其他种聚为一支,自展支持率高达 99%,与传统分类相符,故不支持将蓝靛果另立新属。

关键词:蓝靛果忍冬;ITS;系统位置

中图分类号:Q949.781.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2010)03-0028-04

Phylogenetic Relationship of *Lonicera caerulea* var. *edulis* Based on ITS Sequences

ZHU Ying^{1,2}, DONG Yu-zhi¹, ZAN Shao-ping³

(1. College of Forestry, Xinjiang Agriculture University, Urumqi, Xingjiang 830052, China; 2. Urumqi Botanic Garden, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 3. Urumqi Garden Department, Urumqi, Xinjiang 830002, China)

Abstract: Taking *Heptacodium miconioides* as outgroup, ITS sequence of 20 species of *Lonicera*, were analyzed. The results showed that *Lonicera caerulea* var. *edulis* and other species of Subsect. *Caerulea* Rehd gathered together, bootstrap reached at 99%, consistent with the traditional classification, so it will not support *Lonicera caerulea* var. *edulis* as a new genus.

Key words: *Lonicera caerulea* var. *edulis*; ITS; phylogeny

蓝靛果忍冬(*Lonicera caerulea* var. *edulis*), 又名蓝靛果,属忍冬科忍冬属囊管组(Sect. Isika)蓝果亚组(Subsect. *Caerulea* Rehd.)^[1],其果实具有较高的营养成分及药用价值。

蓝靛果忍冬是蓝果忍冬(*L. caerulea*)的变种。蓝果忍冬是忍冬属内分布最广泛的种,形态变异幅度很大,被细分为许多变种和变型,但由于存在着中间过渡类型而使许多种下等级难以区分。中国植物志记载了 1 个种和 2 个变种,即 *L. caerulea* var. *caerulea*(蓝果忍冬,原变种)、*L. caerulea* var. *edulis*(蓝靛果忍冬)、*L. caerulea* var. *altaica*(阿尔泰忍冬)。

由于忍冬属起源较晚,正处在活跃的发展演化之中,所以不同地区的种形态变异复杂、性状相关性不强,且表达不稳定,在彼此的亲缘关系及分类上不

清晰。由于蓝果忍冬存在复杂的多态性,因此大多数国家普遍认为蓝果亚组只有蓝果忍冬一种。

在忍冬属植物的研究中,对于蓝靛果忍冬属的分类地位存在较大争议。俄国学者 Kuklina A. G.^[2]研究发现蓝靛果枝条和叶上密被短柔毛,且叶形变化幅度大,由此建议蓝靛果在分类学上不应为忍冬属。汪矛等^[3]通过对吉林省蓝靛果花芽、花序、子房及果实的解剖学研究,提出将其从忍冬属分出,另立蓝靛果新属(*Metalonicea* M. Wang et A. G. Gu, gen. nov.),随后,汪矛等^[4]研究发现蓝靛果三叶迹、三叶隙、茎中不存在异形髓的特征与忍冬属存在差异,并以此作为建立蓝靛果新属的有力依据。此后,颜承云等^[5]通过研究黑龙江省蓝靛果根、茎、叶片的显微构造,研究结果与汪矛的研究结果不同,并推测产生此差异的原因可能是地域自然条件和物

收稿日期:2009-06-01 修回日期:2009-09-16

作者简介:朱颖,女,在读博士研究生,从事园林植物研究。

*通讯作者:董玉芝,女,博士生导师,教授,从事林木遗传育种研究。

种长期进化的结果,从而提出是否将蓝靛果列入新属需要进一步研究。朱丽等^[6]用扫描电镜观察了包括蓝靛果忍冬在内的 4 种忍冬的花粉形态结构,结果表明,蓝靛果忍冬的花粉在形态、萌发孔、刺状纹饰方面与其他忍冬相似。至此,植物学家各持己见,蓝靛果的系统学位置尚无定论。

目前,对于蓝靛果忍冬的研究多从形态学、解剖学、孢粉学等方面进行,从分子水平上对其进行系统分类的研究国内外鲜有报道。

核糖体 DNA 中的内转录间隔区(ITS)序列由于可以提供较丰富的信息位点,已被广泛用于研究被子植物属内种间、近缘属间的系统发育和分类问

题^[7-8]。笔者通过对 20 种忍冬属植物的 ITS 序列分析,从分子角度探讨蓝靛果忍冬的系统位置,试图为蓝靛果忍冬的分类学研究提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

共收集了分布于新疆的 8 种忍冬属植物,引进的 7 种忍冬属植物,另外 5 种忍冬的 ITS 序列从 GenBank 获得,表 1 为实验材料、来源及序列号,所用材料均来自野外用硅胶(10 倍于鲜叶重)保存的干叶片。

表 1 材料来源
Table 1 Origin of materials

种名	来源	凭证标本/Gen Bank 编号
<i>L. microphylla</i> 小叶忍冬	乌鲁木齐后峡	ZY0503/ EF611046
<i>L. hispida</i> 刚毛忍冬	乌鲁木齐后峡	ZY0510/ EF611047
<i>L. tatarica</i> 新疆忍冬	乌鲁木齐市植物园	ZY0501/ EF611058
<i>L. tatarica</i> var. <i>micrantha</i> 小花忍冬	乌鲁木齐市植物园	ZY0502/ EF611057
<i>L. caerulea</i> var. <i>edulis</i> 蓝靛果*	乌鲁木齐市植物园	ZY0506/ EF611049
<i>L. caerulea</i> var. <i>altaica</i> 阿勒泰忍冬	新疆阿勒泰	ZY0508/ EF611048
<i>L. caerulea</i> 蓝果忍冬	乌鲁木齐后峡	ZY0505/ EF611050
<i>L. altmannii</i> 截萼忍冬	乌鲁木齐市植物园	ZY0504/ EF462216
<i>L. japonica</i> 忍冬	乌鲁木齐市植物园	ZY0513/ EF611052
<i>L. ferdinandii</i> 葱皮忍冬*	乌鲁木齐市植物园	ZY0507/ EF611051
<i>L. prostrata</i> 平卧忍冬*	乌鲁木齐市植物园	ZY0509/ EF611055
<i>L. ruprechtiana</i> 长白忍冬*	乌鲁木齐市植物园	ZY0512/ EF611054
<i>L. rupicola</i> var. <i>syringantha</i> 红花岩生忍冬*	乌鲁木齐市植物园	ZY0511/ EF611053
<i>L. tatarica</i> cv. Fanguo 繁果忍冬*	乌鲁木齐市植物园	ZY0514/ EF611056
<i>L. tellmaina</i> 台尔曼忍冬*	乌鲁木齐市植物园	ZY0515/ EF611059
<i>L. involucrata</i> 总苞忍冬	Gen Bank	AF265278
<i>L. caerulea</i> var. <i>dependens</i>	Gen Bank	AF265279
<i>L. sempervirens</i> 贯月忍冬	Gen Bank	AF265280
<i>L. confusa</i> 山银花	Gen Bank	DQ372934
<i>L. maackii</i> 金银忍冬	Gen Bank	DQ005991
<i>Heptacodium miconioides</i> 七子花	Gen Bank	AY236176

* 表示引进种。

1.2 总 DNA 的提取、PCR 扩增和 DNA 测序

取硅胶干燥的上述植物叶片 0.1 g,采用 CTAB 法^[9]提取叶片总 DNA。nrDNA ITS 区用引物 ITS-1 (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') 和 ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。反应体系为 50 μ L,内含 dNTP(0.2 mmol \cdot L⁻¹)、Mg²⁺ (2 mmol \cdot L⁻¹),引物各为 5 pmol \cdot L⁻¹、0.4 U Taq 聚合酶、10%的二甲基亚枫,叶片总 DNA 25 ng。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 4 min 预变性,94 $^{\circ}$ C 1 min,51 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增得到的 PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒(天为时代公司)纯化后,用 PBS-T(天为时代公司)载体连接,转化至 D5a 感受态细胞(天为时代公司),在 LB 固体培养基上培养,对显蓝斑的菌

体 PCR 检测后,将菌液及时送至上海生物工程技术服务有限公司进行测序,每个种的 ITS 序列均用 ITS-1 和 ITS-4 正反链测定。

1.3 序列分析和系统树构建

将所获得的 ITS 序列数据,利用 BlastN 在 NCBI 数据库中与已发表的 ITS 序列进行同源性比较,运用 Clustal X 程序对不同材料的 ITS 序列进行对位排列,将对位排列后的序列导入系统发育分析软件 MEGA3.1 进行计算和系统发育树构建,选择 Krima 2-Paramenter 核算距离模式计算遗传距离(遗传距离矩阵图略),以七子花属的七子花作为外类群,用邻位相接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统树(图 1)。应用自展法(Bootstrap)对所构建的系统树进行检测,自展重复次数设定为 1 000 次。

2 结果与分析

从 NJ 系统树中可以看出,来自各个亚组的种基本聚在同一分支上,各分支内部具有较高的自展支持率,表明依据 ITS 序列差异对忍冬属亚组的划分可以较好的支持依形态进行的亚组类群的划分,但属内各组的关系与传统的依据形态特征确定的关系存在较大的差异。

图 1 表明,NJ 系统树中有 4 个相对稳定的分支:囊管组的蓝果亚组、空枝组(Sect. *Coeloxyste-*

um)的赭黄花亚组(Subsect. *Ochranthae*)、忍冬组(Sect. *Nintooa*)的缠绕亚组以及囊管组的刚毛忍冬与截萼忍冬聚成的一支,具有高于 50%的自展支持率。除忍冬组的聚在一支外,空枝组、囊管组内的种并没有完全聚在一支。

从 NJ 分子系统树中可看出,囊管组有着错综复杂的关系,也可以说明在进化过程中,囊管组内各亚组的种从不同的途径进化,由此,对于传统分类中囊管组的种的定位需进一步的研究确定。

图 1 基于 ITS 序列分析构建的 NJ 系统树(*Heptacodium miconioides* 为外类群)
Fig. 1 NJ tree for *Lonicera* based on sequences analysis of ITS (*Heptacodium miconioides* as out group)

3 结论与讨论

3.1 蓝果亚组在忍冬属中的位置

NJ 系统树中囊管组中的蓝果亚组(阿勒泰忍冬、蓝果忍冬、蓝靛果)未与本组中的紫花亚组(Subsect. *Purpurascents*)的小叶忍冬、葱皮亚组(Subsect. *Chlamydocarpi*)的葱皮忍冬、大苞亚组(Subsect. *Bracteatae*)的刚毛忍冬、郁香亚组(Subsect. *Fragrantissimae*)的截萼忍冬聚为一支,但在 UPGMA 系统树中蓝果亚组与忍冬属其他亚组间有着较近的亲缘关系,并获得较高的自展支持率(Bootsrap 为 93%)^[10]。盛红梅等^[11]用 RAPD 对忍冬属囊管组的研究结果认为蓝果亚组与蕊帽亚组的

亲缘关系较近。

3.2 蓝靛果忍冬的系统位置

在 NJ 系统树中,蓝靛果忍冬与阿尔泰忍冬、蓝果忍冬、*L. caerulea* var. *dependens* 均以很高的自展支持率(Bootstrap>90%)共同聚在蓝果亚组的分支上,由此说明这 4 个种之间有着很近的亲缘关系,这与依据形态划分的蓝果亚组的分类标准一致。由 ITS 分子证据所得到的系统发育关系与徐柄声用经典分类所划分的组下等级关系有很好的吻合,从一个侧面说明基于经典分类所划分的蓝果亚组是比较自然的,同意徐柄声对蓝果亚组的分类系统。此外,系统树中也表现出蓝果忍冬与阿尔泰忍冬间的亲缘关系较蓝靛果忍冬与阿尔泰忍冬近,根据中

国植物志记载,蓝果忍冬在亚洲西部也有分布,而蓝靛果忍冬分布则没有这么广泛,也说明这 3 个种间的亲缘关系与地理距离相吻合。

由于蓝靛果忍冬与蓝果亚组其他种之间有着紧密的亲缘关系,而蓝果亚组与忍冬属其他亚组间有着较近的亲缘关系^[10-11],霍俊伟等^[12]的研究结果表明,*L. edulis* 和 *L. regeliana* 之间的亲缘关系很近。3 种实验结果均表明蓝靛果位于忍冬属内部,所以不支持将蓝靛果忍冬分离出忍冬属另立新属。

本研究中采自乌鲁木齐后峡的蓝果忍冬在形态上与中国植物志上记载的大致相同,而且分布也符合其描述的范围,但幼枝和叶柄有较多的糙毛,叶两面均有散生的毛,复果蓝黑色稍被白粉,而此种在新疆植物志上没有相关记载。因毛的多少或有无很难作为区分种的根据,所以将分布于乌鲁木齐后峡的蓝果忍冬认为是中国植物志记载的蓝果忍冬(*L. caerulea* var. *caerulea*)的过渡类型。

蓝靛果忍冬的形态变异较大,国内对蓝靛果忍冬的命名也很混乱,无论是中文还是拉丁文均有多种命名,没有统一^[4-12],建议蓝靛果的拉丁名及中文名均统一采用中国植物志上的命名,便于今后的交流及研究。

参考文献:

[1] 徐炳声,胡嘉琪,王汉津. 中国植物志(第七十二卷)[M]. 北京:科学出版社,1988.

[2] KUKLINA A G. Polymorphism of *Lonicera caerulea* vegetative organs [J]. Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada, 1994 (169):69-74.

[3] 汪矛,谷安根,王立军. 兰靛果属研究的新进展[J]. 植物研究,1990,10(1):105-109.

WANG M, GU A G, WANG L J. Advanced studies on *Metalonicera* [J]. Bulletin of Botanical Research, 1990, 10(1): 105-109.

[4] 汪矛,贾伟平,钟岩. 蓝靛果营养器官初生结构的解剖学研究[J]. 吉林农业大学学报, 1990, 12(1): 20-23.

WANG M, JIA W P, ZHONG Y. Anatomy research on primary structures of vegetative organs in *Lonicera edulis*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1990, 12(1): 20-23.

[5] 颜承云,谷继伟. 蓝靛果忍冬性状与显微鉴别的研究[J]. 黑龙

江医药科学, 2003, 26(3): 15-17.

YAN C Y, GU J W. Properties of *Lonicera edulis* Turcz and its microscopical identification [J]. HeiLongJiang Medicine and Pharmacy, 2003, 26(3): 15-17.

[6] 朱丽,谢朋,王桂娟. 4 种忍冬属植物花粉形态结构的扫描电镜观察[J]. 吉林林业科技, 2007, 36(4): 10-12.

ZHU L, XIE P, WANG G J. Observation of micro-morphology of pollen of 4 *Loniceres*[J]. Jilin Forestry Science and Technology, 2007, 36(4): 10-12.

[7] 李学营,彭建营,白瑞霞. 基于核 rDNA 的 ITS 序列在种子植物系统发育研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2005, 25(4): 829-834.

LI X Y, PENG J Y, BAI R X. Use of ITS sequences based on nuclear rDNA for phylogenetic of seed plants[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(4): 829-834.

[8] 王建波,张文驹,陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.

WANG J B, ZHANG W J, CHEN J K. Application of ITS sequence of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1999, 37(4): 407-416.

[9] 邹喻萍,汪小全. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J]. 植物学报, 1994, 36(7): 580-586.

ZOU Y P, WAN G X Q. Isolation and characterization of total DNA from several endangered species and their allies [J]. Acta Botanica Sinica, 1994, 36(7): 580-586.

[10] 朱颖. 基于 nrDNA ITS 序列对忍冬属部分植物系统发育关系的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2007.

ZHU Y. Study on phylogenetic relationships of partial *Lonicera* L. based on nrDNA ITS regions[D]. Urumqi: Xinjiang Agriculture University, 2007.

[11] 盛红梅,安黎哲,陈拓,等. 忍冬属植物的遗传多样性及其种间关系研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(7): 1405-1409.

SHENG H M, AN L Z, CHEN T, et al. Genetic diversity and relationships among species of *Lonicera* in Gansu Province [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(7): 1405-1409.

[12] 霍俊伟,杨国慧,唯薇. 蓝靛果忍冬种质资源的研究进展[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 159-164.

HUO J W, YANG G H, WEI W. Review of study on germplasm resources of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) [J]. Acta Horticultura Sinica, 2005, 32(1): 159-164.