

地黄属分子系统学分析

刘占林, 李建芳

(西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西北大学 生命科学学院, 西安 710069)

摘要: 地黄属是中国准特有属, 属内种间关系仍待澄清。该研究基于多个个体的叶绿体与核基因片段对地黄属进行系统发育重建, 探讨属内物种分化与可能历史。结果表明: (1) 地黄属为单系群, 天目地黄为本属原始类群, 并与湖北地黄互为姐妹群或连续姐妹群, 裂叶地黄-高地黄、地黄-茄叶地黄分别组成姐妹群; (2) 多个个体构建的系统树更能揭示本属物种关系的复杂性; (3) 祖先分布区重建表明本属经历过 3 次扩张与 2 次隔离过程, 物种形成过程与历史气候变化密切相关。最后该研究提出了地黄属物种形成研究亟待解决的几个重要问题。

关键词: 地黄; 分子系统学; 进化历史

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Molecular Phylogenetic Analysis of *Rehmannia*

LIU Zhanlin, LI Jianfang

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Interspecific relationships in *Rehmannia*, a quasi-endemic genus in China, are still unresolved. In this study, we used multiple individuals to reconstruct the phylogenetic tree on the basis of chloroplast and nuclear genes. Our results are shown as follows: (1) Monophyly of *Rehmannia* is strongly supported and *R. chingii*, a sister or consecutive sister species to *R. henryi*, is the basic taxon in the genus. *R. piasezkii*-*R. elata* and *R. glutinosa*-*R. solanifolia* form two highly supported pairs of sister species. (2) Phylogenetic tree constructed by using multiple individual is more informative to uncover the complicate relationships among species. (3) Analysis of ancestral distribution area reconstructed by RASP indicates that there are three times of dispersals and two times of vicariations in the speciation history of *Rehmannia*, which are closely related to climate changes during Late Miocene and early Pliocene. We also proposed some advices to explore the speciation procedure in the genus.

Key words: *Rehmannia*; molecular phylogeny; evolutionary history

地黄属 (*Rehmannia*) 原隶属于玄参科 (Scrophulariaceae s. l.), 研究表明地黄属与中国特有属崖白菜属 (*Triaenophora*) 为姐妹类群, 并和列当科有较为密切的关系^[1-2]。由于分子系统学证明玄参科是并系类群, 因此本属是否独立成科仍有争议。《中国植物志》记载地黄属有 6 个种, 主要分布于中国。天目地黄 (*R. chingii*) 狭域分布于安徽与浙江交界的天目山及其临近地区; 裂叶地黄 (*R. piasez-*

kii)、高地黄 (*R. elata*) 和湖北地黄 (*R. henryi*) 分布在神农架、巫山附近; 中国著名的传统中药——地黄 (*R. glutinosa*) 广泛分布于华北各地并向北延伸到朝鲜; 茄叶地黄 (*R. solanifolia*) 仅分布于大巴山少数几个地点 (图 1)。最近的研究认为高地黄与裂叶地黄表型相似、遗传组成相近, 是同一种植物^[3-4]; 其它 4 种地黄属物种关系及分化次序在不同研究中相互矛盾^[1-2]。鉴于以前的分子系统学都是采用单一

收稿日期: 2013-11-11; 修改稿收到日期: 2013-12-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31170311, 31370353)

作者简介: 刘占林 (1972—), 男, 博士, 副教授, 主要从事进化植物学研究。E-mail: liuzl@nwnu.edu.cn

个体的基因序列进行分析,种内变异可能会对系统关系构成影响。同时上述研究主要采用最大似然法(the maximum likelihood method,ML)和最大简约法(the maximum parsimony method,MP)进行建树,有研究认为二者的准确性不如贝叶斯法(the Bayesian method)^[5]。因此本研究利用3种方法通过多个个体的序列分析对地黄属的系统关系进行重建,探讨该属的可能进化历史。

1 材料和方法

本研究所用地黄属各物种及其近缘属的序列全部来源于 GenBank 数据库(表 1),总共得到 4 个叶绿体基因片段(*rbcL*、*rps2*、*rps16* 和 *trnL-F*)和 1 个核基因片段(ITS)。这些序列主要来自 Xia 等^[1]和 Albach 等^[2]的研究,把源于不同研究的同一物种的材料当作独立个体进行分析,如果该类群仅有 1 条序列则所有个体均选择此序列。将所得基因先用 BioEdit^[6]对位排列,然后用 BEAST^[7]进行贝叶斯系统分析。无论叶绿体、核基因单独分析还是合并分析,均采用 GTR+gamma 进化模型和 log normal unrelated relaxed clock 分子钟模型,物种形成方式按 Yule 模型分析。MCMC 链长设置为一千万次,

每 2 000 次记录 1 次参数,总共得到的 5 001 棵树,摒弃前 2 000 棵,剩余的用于一致树的构建。MP 和 ML 法采用软件 MEGA (V 6.0 beta)计算分析^[8]。虽然玄参科缺乏可靠的化石记录,但依据科以上水平的系统学研究,把系统树的根设定在 40~60 Ma^[9]。同时使用 RASP^[10]中的 Bayesian Binary method 方法重建祖先类群的分布区,以期揭示各物种的形成历史。

2 结果与分析

最大简约法(MP)、最大似然法(ML)和贝叶斯

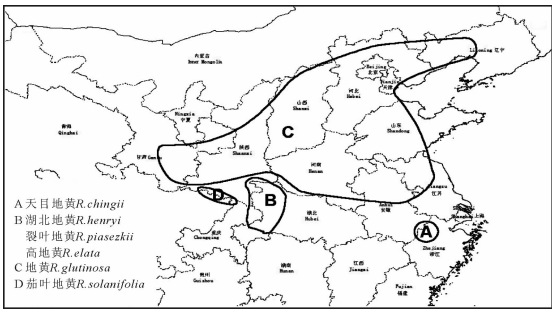


图 1 地黄属植物在中国的地理分布
Fig. 1 Geographic distribution of six *Rehmannia* species

表 1 地黄属及其近缘属植物序列登录号
Table 1 GenBank accession numbers of taxa in this study

物种 Species	编号 Code	序列登录号 GenBank accession number				
		<i>rbcL</i>	<i>rps2</i>	<i>rps16</i>	<i>trnL-F</i>	ITS
天目地黄 <i>R. chingii</i>	Rc1	FJ172724	FJ172710	FJ172696	EF363679	EF363673
	Rc2	EF544598	FJ172710	DQ856488	DQ856494	DQ069313
湖北地黄 <i>R. henryi</i>	Rh1	FJ172722	FJ172708	FJ172694	EF363677	EF363671
	Rh2	FJ172722	FJ172708	DQ856491	DQ856497	DQ272447
裂叶地黄 <i>R. piasezkii</i>	Rp1	FJ172721	FJ172707	FJ172693	EF363676	EF363670
	Rp2	FJ172721	FJ172707	DQ856489	DQ856495	DQ069316
高地地黄 <i>R. elata</i>	Re1	HQ384874	FJ172707	DQ856490	DQ856496	DQ069315
	Re2	HQ384874	FJ172707	DQ856490	DQ856496	DQ069315
地黄 <i>R. glutinosa</i>	Rg1	FJ172725	FJ172711	FJ172697	EF363680	EF363674
	Rg2	AJ247615	FJ172711	DQ856487	DQ856493	DQ069312
	Rg*					<i>EU810386-EU810383</i>
						<i>EU787018-EU787015</i>
						<i>EU266025-EU266022</i>
茄叶地黄 <i>R. solani folia</i>	Rs1	FJ172723	FJ172709	FJ172695	EF363678	EF363672
	Rs2	FJ172723	FJ172709	DQ856486	DQ856492	DQ069314
崖白菜 <i>Trienophora rupestris</i>	Trup	FJ172726	FJ172712	FJ172698	EF363681	EF363675
神农架崖白菜 <i>T. shenongjiaensis</i>	Tsnj	FJ172732	FJ172717	FJ172704	FJ172690	FJ172741
沟酸浆 <i>Mimulus tenellus</i>	Min	FJ172733	FJ172718	FJ172705	FJ172691	FJ172742
毛果通泉草 <i>Mazus spicatus</i>	Maz	FJ172730	FJ172716	FJ172703	FJ172689	FJ172740
肉果草 <i>Lancea tibetica</i>	Lan	FJ172729	FJ172713	FJ172699	FJ172685	FJ172736
常春藤列当 <i>Orobancha hederaceae</i>	Oro	AF078682	DQ310019	AJ431050	AJ431050	AY209273
毛泡桐 <i>Paulownia tomentosa</i>	Pau	L36447	AF055155	HQ385149	AF479005	AF478941

注:Rg*. Rg+GenBank 序列号,斜体的 GenBank 序列号仅用于 ITS 的序列分析。
Note:Rg*. Presents Rg plus GenBank accession number,GenBank numbers in italics are only used for ITS analysis.

法得到的地黄属系统发育树结果基本一致,但支持率稍有差异,以下仅以贝叶斯树(图 2)为例说明不同类群进化关系。叶绿体基因联合分析(图 2)表明,天目地黄、裂叶地黄和高地黄均为单系群,湖北地黄的 2 个个体存在较大差异,分别聚在不同分支上。茄叶地黄与地黄彼此不构成独立的单系群,但二者关系密切。系统发育树显示,天目地黄是地黄属最原始的类群,随后湖北地黄分化出来,分别与裂叶地黄-高地黄、茄叶地黄-地黄的分支构成姐妹群。

核基因 ITS 贝叶斯系统发育分析则揭示出由地黄、茄叶地黄 ITS 序列变异较大,分成两大分支,并且位于本属系统树的基部。随后是裂叶地黄和高地黄分支,天目地黄与湖北地黄组成姐妹群(图 3)。

叶绿体基因与核基因联合分析的系统发育树与叶绿体的相似,不同点在于湖北地黄的 2 个个体位于同一分支,构成单系群。依据贝叶斯分析推测地黄属与崖白菜属的分化时间为 19.72 Ma,而天目地黄在 6.85 Ma 与其它种分化开来,随后是湖北地黄

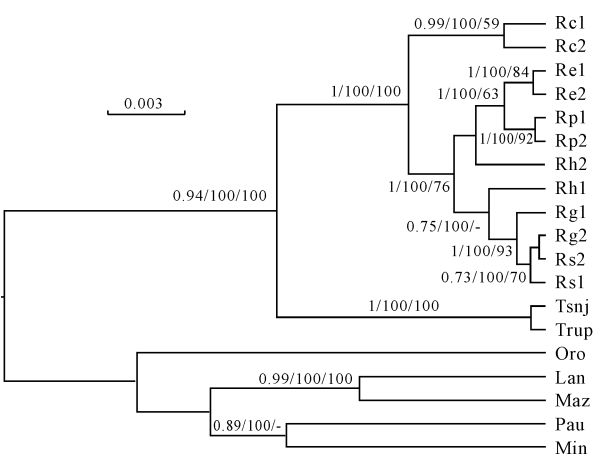


图 2 基于 4 个叶绿体基因的系统发育树

分支上数值依次为贝叶斯后验概率、MP、ML 的 bootstrap 支持率($\geq 50\%$);物种代号同表 1;标尺代表每位点替代速率;下同

Fig. 2 Phylogenetic tree based on four chloroplast genes

Posterior probability of Bayesian analysis,bootstrap support values ($\geq 50\%$) for MP and ML methods are shown on branches;

The scale bar denotes substitutions per site;The code of species is same as Table 1;The same as below

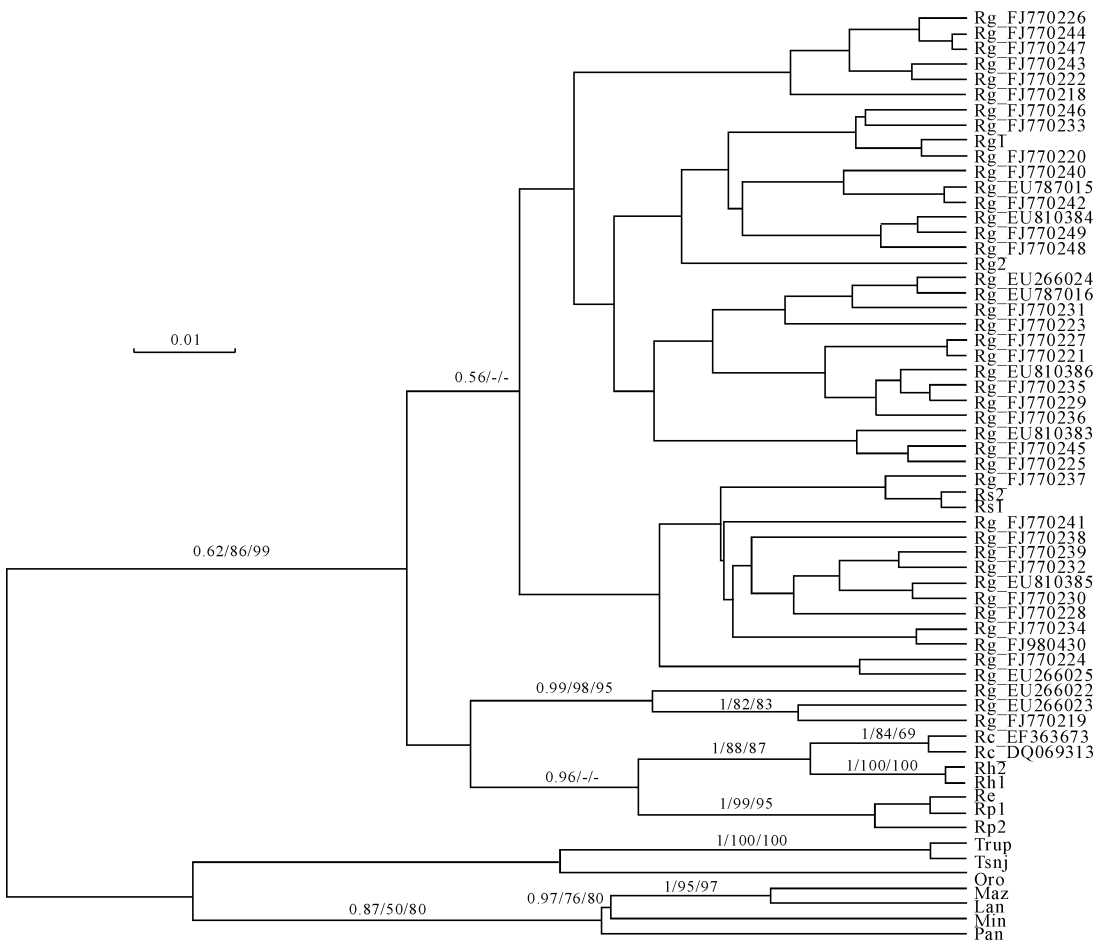


图 3 基于核基因 ITS 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Rehmannia* and relative genera based on ITS gene

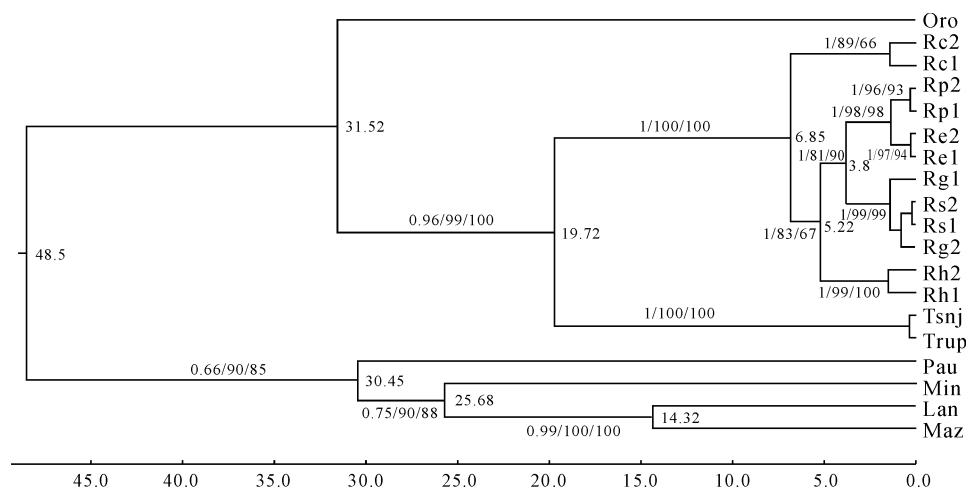


图4 基于叶绿体基因与核基因的系统发育树

结点旁数值为分支分化时间标

Fig. 4 Phylogenetic tree based on chloroplast and ITS genes

Divergence time (million years ago, Ma) are shown beside branches

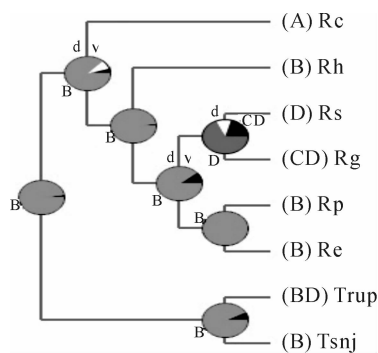


图5 地黄属祖先地理分布分析

d. 扩散; v. 隔离; 括号内大写字母代表各物种现有分布区, 参见图1;

结点上的大写字母与扇形图分别代表祖先分布区及其概率

Fig. 5 Ancestral distribution of *Rehmannia*d, Dispersal; v, Vicariance; Capital letters in parenthesis indicate the current distribution areas of *Rehmannia* (refer to Fig. 1);

The ancestral distribution areas and their probabilities are shown beside the nodes

(5.22 Ma), 裂叶地黄-高地黄与茄叶地黄-地黄两个分支约在 3.80 Ma 分化, 其类群内的分化则更晚 (图4)。

祖先状态重建分析表明, 地黄属的祖先分布区可能就在神农架-巫山一带, 属内种间分化经历过 3 次扩散和 2 次隔离事件。第一次是祖先分布区扩散到浙江一带, 随后隔离形成天目地黄; 第二次发生在裂叶地黄-高地黄、茄叶地黄-地黄类群间, 后者的祖先从本属祖先分布区向西扩散到大巴山西部并隔离; 第三次则是大巴山群体向华北扩张并分化成地黄与茄叶地黄 (图5)。

3 讨论

3.1 地黄属内各物种的关系

通过 ML、MP 和贝叶斯分析构建了地黄属的系统发育关系, 在所得各种系统树中绝大部分类群都拥有较高的支持率。所有的系统树都支持地黄属是单系群, 这与前人研究相一致^[1-2]。在叶绿体基因单独分析和与核基因联合分析的结果中, 天目地黄位于本属系统树的基部, 湖北地黄随后分化出来, 而裂叶地黄与高地黄、茄叶地黄与地黄分别组成姐妹群。李宏庆等^[3]认为裂叶地黄与高地黄是同种异名, 应予以归并, 本研究结果支持此观点。在本研究中, 茄叶地黄始终包含在地黄类群内, 与地黄共同形成一组。在形态学上, 茄叶地黄与地黄的差别主要体现在叶与花的表型上, 前者是卵形叶、花生叶腋, 后者是长椭圆形叶、总状花序。但二者花形态很接近, 分布区重叠, 并且都是四倍体, 类群间的分化时间也很短, 这可能都暗示着 2 个种的分化并不如先前认为的那样显著。二者是否可以归并值得进一步研究。

ITS 分析的结果总体上与 Albach 等^[11]的研究相一致, 而与 Xia 等的结果^[1]稍有不同。在后者的研究中, ITS 与叶绿体数据得到的聚类树是相同的。从本研究分析结果可以看出, 地黄 ITS 的不同拷贝间序列差异极大, 并且分成两类: 一类拷贝是地黄-茄叶地黄特有类型, 另一类则与其它地黄属植物有密切关系, 可能属于祖先类型。这种种内多态性的产生可能与 ITS 在 2 个四倍体物种 (地黄-茄叶地

黄)内致同进化不完全有关^[12]。

3.2 地黄属物种形成的可能历史

通过地黄属祖先状态重建与物种分化时间推断,本属植物种内分化发生在中新世末期,这与当时全球气温快速下降、地球气候剧烈波动的历史背景高度一致^[13]。据此可提出以下假设:本属祖先类群分布于神农架-巫山地区,本区气候较温暖潮湿适合物种生存,同时兼具多样化的生态环境而成为中国物种的重要避难所与分化中心^[14]。受全球降温的影响其中一支地黄属类群向南扩散到更为湿润的浙江地区,并被长江中下游平原所隔离形成天目地黄。而后祖先分布区内的地黄类群因环境的异质性,各自适应并分化出湖北地黄、裂叶地黄(高地黄)、地黄-茄叶地黄。通过标本分析发现湖北地黄与裂叶地黄虽然同域分布,但生境却存在差异:湖北地黄往往分布在海拔 400 m 以下的低山温暖地区,而裂叶地黄则分布在海拔 800~1 500 m 的中山地带,生境适应性差异可能是二者分化的动力。在中新世末期至上新世早期中国北方总体是干旱性气候^[15]。祖先分布区的地黄-茄叶地黄类群形成多倍体向西向北扩散,与祖先分布区相隔离并各自独立成种。前者具有粗大的根茎,具有很强的抗旱性;后者只分布于大巴山高海拔地区(1 300 m 以上),可能具有较强的耐寒能力。RASP 分析表明茄叶地黄-地黄类群的形成是祖先类群向西扩张并隔离的结果,据此推断地黄是从大巴山中西部向北快速扩张而成,原地类群慢慢形成茄叶地黄。Albach 等^[11]认为茄叶地黄位于地黄分布区边缘,可能是地黄边缘群体隔

离形成的新物种。本研究推论与之并不矛盾,随着地黄迅速北扩,地黄-茄叶地黄祖先分布区可能因为气候变化导致种群大小降低并发生隔离促使茄叶地黄成种。当然,这 2 个四倍体的成种历史还需要更多数据来揭示。

3.3 亟待解决的问题

地黄属植物系统学分析基本厘清 6 个物种间的关系,然而又有新的问题需要进一步分析解决。(1)从叶绿体分析可以看出,湖北地黄的不同个体并不聚为一支,而是分别与裂叶地黄-高地黄类群、地黄-茄叶地黄类群聚在一起,这说明少数个体的基因树往往不能代表整个物种树。湖北地黄与其它地黄类群究竟是什么关系,不同物种种内是否都存在高度变异仍然是值得探究的问题。(2)多倍体物种形成的历史:RASP 分析只是从祖先类群分布区重建的角度分析物种形成的可能历史过程,并不代表真实的历史事件。地黄 ITS 基因存在高度变异,加上形态的多样性,由此可以推断地黄-茄叶地黄可能是异源多倍体^[11]。湖北地黄可能是一个亲本来源,裂叶地黄(高地黄)是否参与地黄-茄叶地黄的物种形成仍是疑问。同时茄叶地黄究竟是地黄-茄叶地黄祖先分布区残遗类群还是地黄分布区扩张形成的新类群也是多倍体历史研究的一个重要问题。以上问题的解决都需要从群体角度进行分析,只有通过谱系地理学及物种成种过程的研究,揭示地黄属不同地理单元间的系统关系,才能更确切地了解地黄属现有地理分布格局的成因与进化历史。

参考文献:

- [1] XIA Z, WANG Y Z, SMITH J F. Familial placement and relations of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae s. l.) inferred from five gene regions[J]. *American Journal of Botany*, 2009, 96: 519—530.
- [2] ALBACH D, YAN K, JENSEN S, et al. Phylogenetic placement of *Triaenophora* (formerly Scrophulariaceae) with some implications for the phylogeny of Lamiales[J]. *Taxon*, 2009, 58: 749—756.
- [3] LI H Q(李宏庆), LIU G L(刘国丽). A new synonym of *Rehmannia* (Scrophulariaceae s. l.) [J]. *Guihaia*(广西植物), 2012, 32: 23—26 (in Chinese).
- [4] LI X D, ZAN Y Y, LUO M M, et al. Taxonomic revision of the genus *Rehmannia* [J]. *Plant Science Journal*, 2011, 29: 423—431.
- [5] HALL B G. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22: 792—802.
- [6] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor program for Windows 95/98/NT [J]. *Nuclear Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95—98.
- [7] DRUMMOND A J, SUCHARD M A, XIE D, et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29(8): 1 969—1 973.

- [8] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28: 2 731—2 739.
- [9] NIE Z L, SUN H, BEARDSLEY P M, *et al.* Evolution of biogeographic disjunction between eastern Asia and eastern North America in *Phryma* (Phrymaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2006, 93: 1 343—1 356.
- [10] YU Y, HARRIS A J, HE X J. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies) 2. 1b. 2012, Available at <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP>.
- [11] ALBACH D C, LI H Q, ZHAO N, *et al.* Molecular systematics and phytochemistry of *Rehmannia* (Scrophulariaceae)[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007, 35: 293—300.
- [12] ZHANG W, QU J, GU H, *et al.* Studies on the origin and evolution of tetraploid wheats based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. *Theoretical Applied Genetics*, 2002, 104: 1 099—1 106.
- [13] ZACHOS J, PAGANI M, SLOAN L, *et al.* Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present[J]. *Science*, 2001, 292: 686—693.
- [14] LÓPEZ-PUJOL J, ZHANG F M, SUN H Q, *et al.* Centres of plant endemism in China: places for survival or for speciation?[J]. *Journal of Biogeography*, 2011, 38: 1 267—1 280.
- [15] GUO Z, PENG S, HAO Q, *et al.* Late Miocene-Pliocene development of Asian aridification as recorded in the Red-Earth Formation in northern China[J]. *Global and Planetary Change*, 2004, 41: 135—145.

Introduction of the Plant Front Cover: *Cardamine scaposa* Franch.

Cardamine scaposa Franch. belongs to the family Brassicaceae. Herbs perennial, 4~18 cm tall, scape, glabrous throughout. Rhizomes slender, with slender stolons. Stems leafless, erect, simple. Rhizomal leaves simple; petiole 1~12 cm; leaf blade reniform or suborbicular, 0.3~2.0×0.5~3.0 cm, base cordate, margin repand-crenate or entire. Cauline leaves absent. Racemes terminal, 2~10-flowered. Fruiting pedicels erect or erect-ascending, 1~4 cm, proximal longest. Sepals ovate or oblong, 3~4×1.5~2.2 mm, margin membranous lateral pair subsaccate. Petals white, broadly obovate, 8~13×5~7 mm, cuneate into a clawlike base to 2 mm, apex rounded or subemarginate. Median filament pairs 4.5~8.0 mm, slightly dilated at base; lateral pair 2.5~4.5 mm; anthers narrowly oblong, 1.5~1.8 mm. Ovules 8~14 per ovary. Fruit linear, 2.0~3.5 cm×1.2~1.7 mm; valves glabrous, smooth; style 3.0~7.5 mm. Seeds brown, oblong, 2~3×1.0~1.5 mm, wingless. Fl. Apr-Jun, fr. Jun-Jul.

C. scaposa is used medicinally and endemic to China. They growing on shrubby slopes and moist areas at altitude between 1 400~2 900 m in Hebei, Inner Mongolia, Shaanxi, Shanxi, Sichuan.

(Photographed and introduced by ZHU Renbin)