

基于 *psbA-trnH* 序列变异分析川明参属 亲缘关系及分类地位

宋春风, 吴宝成, 周 伟, 刘启新^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

摘要: 采用 PCR 直接测序法对伞形科 (Apiaceae) 前胡族 (Trib. Peucedaneae) 种类川明参 (*Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan)、泰山前胡 [*Peucedanum wawrae* (H. Wolff) Su] 和华中前胡 (*P. medicum* Dunn) 以及美味芹族 (Trib. Smyrnieae) 种类明党参 (*Changium smyrnioides* H. Wolff)、宝兴棱子芹 (*Pleurospermum davidii* Franch.)、丽江棱子芹 (*P. foetens* Franch.) 和鸡冠棱子芹 (*P. cristatum* de Boiss.) 的叶绿体基因组 *psbA-trnH* 片段进行了扩增测序, 获得的序列已提交至 GenBank, 登录号为 KF557756—KF557762。结合引自 GenBank 的前胡族阿魏属 (*Ferula* Linn.) 1 种、大瓣芹属 (*Semenovia* Regel et Herder) 1 种、当归属 (*Angelica* Linn.) 2 种和美味芹族的舟瓣芹属 (*Sinolimprichtia* H. Wolff) 1 种、羌活属 (*Notopterygium* de Boiss.) 1 种、瘤果芹属 (*Trachydium* Lindl.) 1 种以及针果芹族 (Trib. Scandiceneae) 刺果芹 [*Turgenia latifolia* (Linn.) Hoffm.] 的 *psbA-trnH* 片段序列, 对各种类的 *psbA-trnH* 片段信息进行分析; 并以刺果芹为外类群构建了 MP、ML 和 BI 系统发育树。结果表明: 川明参和明党参的 *psbA-trnH* 片段长度均为 258 bp、GC 含量均为 23%, 而其他种类的 *psbA-trnH* 片段长度为 228 ~ 405 bp、GC 含量为 26% ~ 35%; 排序后 *psbA-trnH* 序列总长度为 553 bp (包括空位), 其中变异位点 237 个、信息位点 178 个。川明参与明党参间的相对遗传距离最小 (仅为 0.02), 而川明参与其他种类间的相对遗传距离为 0.10 ~ 1.34, 且总体上川明参与美味芹族种类的相对遗传距离较小, 表明川明参与明党参及美味芹族种类的亲缘关系较近。在 3 类系统树上, 川明参与明党参均聚在一起, 并与美味芹族的属种聚为一大支, 而远离由前胡族属种构成的另一大支。结合外部形态和果实解剖结构特征, 建议将川明参属 (*Chuanminshen* Sheh et Shan) 从前胡族中分出并置于美味芹族中, 与明党参属 (*Changium* H. Wolff) 为姐妹类群。

关键词: 川明参属; *psbA-trnH* 片段; 美味芹族; 前胡族; GC 含量; 分类地位

中图分类号: Q949.763.304; Q944 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2014)02-0019-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2014.02.03

Analyses on relationship and taxonomic position of *Chuanminshen* Sheh et Shan (Apiaceae) based on variation of *psbA-trnH* sequence SONG Chunfeng, WU Baocheng, ZHOU Wei, LIU Qixin^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2014, 23(2): 19-26

Abstract: By means of PCR amplification and sequencing methods, cpDNA *psbA-trnH* fragment from *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan, *Peucedanum wawrae* (H. Wolff) Su and *P. medicum* Dunn of Trib. Peucedaneae, *Changium smyrnioides* H. Wolff, *Pleurospermum davidii* Franch., *P. foetens* Franch. and *P. cristatum* de Boiss. of Trib. Smyrnieae in Apiaceae were amplified and sequenced, sequences obtained were submitted to GenBank and their accession numbers were KF557756-KF557762. In combination of *psbA-trnH* fragment sequences, induced from GenBank, of one species in *Ferula* Linn., one species in *Semenovia* Regel et Herder and two species in *Angelica* Linn. of Trib. Peucedaneae, one species in *Sinolimprichtia* H. Wolff, one species in *Notopterygium* de Boiss. and one species in *Trachydium* Lindl. of Trib. Smyrnieae, and *Turgenia latifolia* (Linn.) Hoffm. of Trib. Scandiceneae,

收稿日期: 2013-08-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31100168)

作者简介: 宋春风(1979—), 女, 山东成武人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学及植物系统演化研究。

^①通信作者 E-mail: naslqx@aliyun.com

psbA-trnH fragment information of all species was analyzed, and MP, ML and BI phylogenetic trees were constructed taking *T. latifolia* as an outgroup. The results show that length of *psbA-trnH* fragment of both *Chuanminshen violaceum* and *Changium smyrnioides* is 258 bp and GC content of both is 23%, while length of *psbA-trnH* fragment of other species is 228–405 bp and their GC content is 26%–35%. And total length of *psbA-trnH* fragment after alignment is 553 bp (including gaps), in which, there are 237 variable sites and 178 information sites. The relative genetic distance between *Chuanminshen violaceum* and *Changium smyrnioides* is the smallest (only 0.02), while that among *Chuanminshen violaceum* and other species is 0.10–1.34, and generally, that among *Chuanminshen violaceum* and species in Trib. Smyrnieae is smaller, meaning that relationship of *Chuanminshen violaceum* with *Changium smyrnioides* and some species in Trib. Smyrnieae is nearer. In MP, ML and BI phylogenetic trees, both *Chuanminshen violaceum* and *Changium smyrnioides* are clustered together and are grouped as one clade with other species of Trib. Smyrnieae, and are away from another clade composed of species in Trib. Peucedaneae. Combined with characteristics of morphology and fruit anatomical structures, it is suggested that *Chuanminshen* Sheh et Shan should be separated from Trib. Peucedaneae and placed in Trib. Smyrnieae, and it is the sister taxa with *Changium* H. Wolff.

Key words: *Chuanminshen* Sheh et Shan; *psbA-trnH* fragment; Trib. Smyrnieae; Trib. Peucedaneae; GC content; taxonomic position

在国产伞形科 (Apiaceae) 植物中有 2 个中国特有单种属: 一是川明参属 (*Chuanminshen* Sheh et Shan), 隶属于前胡族 (Trib. Peucedaneae), 仅有川明参 (*C. violaceum* Sheh et Shan) 1 种, 分布于四川; 二是明党参属 (*Changium* H. Wolff), 隶属于美味芹族 (Trib. Smyrnieae), 属下种类为明党参 (*C. smyrnioides* H. Wolff), 分布区域从与四川接壤的湖北一直向东分布至江西、安徽、江苏和浙江等省。这 2 个种不仅分布区域上有交接, 而且根、茎和叶等外部形态特征非常相似, 生长习性、花期以及药材功效等也十分相近, 在民间曾被混作为药材“明党参”入药^[1-3]。

川明参与明党参分属于不同族, 主要因为二者的果实特征差异明显, 前者分生果背腹面明显扁压, 被置于前胡族中; 而后者分生果横切面近圆形, 被置于美味芹族中^[4]。邱英雄等^[5]和陶晓瑜等^[6]基于 ISSR 标记以及核基因 ITS 序列的研究, 认为川明参属应置于美味芹族并靠近明党参属。这一建议与川明参属在经典分类中原有的系统位置分歧较大。但要最终确定川明参属的系统分类地位, 还需要多学科的研究证据以及补充更多的基因片段资料。

在众多的适宜于研究物种进化的基因中, 叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段是进化速率最快的叶绿体 DNA 间隔区之一^[7-12], 被广泛应用于被子植物分子系统树构建及物种鉴别^[8-11]。

作者对川明参属的 *psbA-trnH* 片段进行克隆测序, 并选取前胡族和美味芹族的代表类群 (包括明党参)、以针果芹族 (Trib. Scandicineae) 种类为外类群,

基于 *psbA-trnH* 片段序列构建系统发育树; 结合外部形态和内部解剖结构, 探讨川明参与明党参间及其与前胡族和美味芹族种类间的亲缘关系, 为川明参属分类地位的确定提供分子系统学研究证据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试川明参、明党参、华中前胡 (*Peucedanum medicum* Dunn) 和泰山前胡 [*P. wawrae* (H. Wolff) Su] 以及宝兴棱子芹 (*Pleurospermum davidii* Franch.)、丽江棱子芹 (*P. foetens* Franch.) 和鸡冠棱子芹 (*P. cristatum* de Boiss.) 的幼嫩叶片于 2009 年至 2010 年采自野外, 采集地点及凭证标本信息见表 1; 每份样品 3~5 枚叶片, 用硅胶迅速干燥后供试。研究涉及 15 个种类, 包括美味芹族的 5 属 7 种、前胡族 5 属 7 种以及针果芹族 1 种, 除前述 7 种外, 另 8 个种类的 *psbA-trnH* 序列均引自 GenBank。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取 采用改良的 2×CTAB 法^[13] 提取基因组总 DNA, 并用质量体积分数 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下通过 Tanon 2500 型凝胶成像系统测定 DNA 浓度。将获得的总 DNA 稀释 20 倍后作为模板用于 PCR 扩增。

1.2.2 扩增与纯化 采用 Sang 等^[14] 和 Tate 等^[15] 设计的通用引物 trnH (CGCGCATGCTGGATTCAATC) 和 psbA (GTTATGCATGAACGTAATGCTC) 进行 PCR

表 1 川明参和供试伞形科相关种类的凭证标本信息

Table 1 Information of voucher specimen of *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan and related species tested in Apiaceae

种类 Species	采集地点 Locality of collection	采集人 Collector	凭证标本号 No. of voucher
川明参 <i>Chuanminshen violaceum</i>	四川金堂 Jintang of Sichuan	褚晓芳, 等 CHU Xiaofang, et al	CS003 (NAS)
明党参 <i>Changium smyrnioides</i>	江苏南京 Nanjing of Jiangsu	宋春风, 等 SONG Chunfeng, et al	NJ001 (NAS)
华中前胡 <i>Peucedanum medicum</i>	广西全州 Quanzhou of Guangxi	宋春风 SONG Chunfeng	GX049 (NAS)
泰山前胡 <i>Peucedanum waurae</i>	江苏南京 Nanjing of Jiangsu	刘启新 LIU Qixin	LS034 (NAS)
宝兴棱子芹 <i>Pleurospermum davidii</i>	四川阿坝 Aba of Sichuan	宋春风, 等 SONG Chunfeng, et al	NASLQX162 (NAS)
丽江棱子芹 <i>Pleurospermum foetens</i>	云南香格里拉 Shangri-La of Yunnan	宋春风, 等 SONG Chunfeng, et al	NASLQX281 (NAS)
鸡冠棱子芹 <i>Pleurospermum cristatum</i>	陕西眉县 Meixian of Shaanxi	宋春风, 等 SONG Chunfeng, et al	NASLQX023 (NAS)

扩增。

首先采用 20 μL 反应体系进行预扩增, 检测之后再扩增体系总体积增加到 80 μL 。20 μL 反应体系包括: 10 \times Taq Buffer 2 μL , 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 2 μL , 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 2 μL , 2 mmol \cdot L⁻¹ 上、下游引物各 2 μL , 重蒸水 9.2 μL , 模板 DNA 0.8 μL 和 Taq DNA 聚合酶 0.15 μL 。

用 MG96G 型 PCR 仪 (Long Gene 公司) 进行 PCR 扩增反应。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 然后于 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 重复循环 30 次; 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物经质量体积分数 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 Tanon 2500 图像分析仪观察。反应产物采用 Axygen 凝胶纯化试剂盒进行纯化。

1.2.3 测序 PCR 产物纯化后直接用 ABI 3730 型基因分析仪测序, 由华大基因科技有限公司完成。

1.3 数据分析

采用 Sequencher 4.5 软件对获得的序列进行校正, 然后用 BioEdit 7.0.4.1 软件进行比对和对位排列^[16]并手工校正。用 MEGA 5.05 软件将排序后的序列组成数据矩阵, 统计各种类的 GC 含量及变异位点和信息位点; 根据 Kimura 2-parameter 法计算各种类间的相对遗传距离^[17]。将序列格式转换为 Nexus 格式, 碱基处理作 Fitch 性状 (无序)、空位 (gap) 作缺失 (missing) 状态分析, 利用 PAUP4.0 beta 10 win 软件进行统计和分支分析^[18], 构建最大似然法 (ML) 与最大简约法 (MP) 系统发育树, 并用自展法 (bootstrap) 对系统发育树进行检测, 自展重复次数 1 000 次。最后用 MrBayes V3.1.2 中的贝叶斯方法构建 BI 系统发育树。构建 ML 和 BI 系统树前, 先用 Modeltest 3.7 软件选择碱基替换模型并估计相关参数; 经运算, 获得最适的碱基替换模型为 K81uf+G, 相关参数为: $-\ln L =$

2 037.089 6, K=6; 碱基 A、C、G 和 T 的频率分别为 0.348 0、0.132 9、0.167 5 和 0.351 7。

2 结果和分析

2.1 供试种类的 *psbA-trnH* 长度与 GC 含量比较

从川明参以及明党参、华中前胡、泰山前胡、宝兴棱子芹、丽江棱子芹和鸡冠棱子芹 7 个种类的 cpDNA 中克隆获得 *psbA-trnH* 片段并测序, 各种类的 *psbA-trnH* 片段序列已提交至 GenBank; 各种类 *psbA-trnH* 片段的 GenBank 登录号依次为 KF557756、KF557757、KF557758、KF557759、KF557760、KF557761 和 KF557762 (表 2)。

校正后川明参和明党参的 *psbA-trnH* 片段长度均为 258 bp (表 2), 其余种类的 *psbA-trnH* 片段长度为 228 ~ 405 bp, 各种类 *psbA-trnH* 片段长度均存在差异。人工排序后 *psbA-trnH* 片段序列总长度为 553 bp (包括空位); 其中, 变异位点 237 个, 占位点总数的 42.9%; 信息位点 178 个, 占位点总数的 32.2%。

由表 2 可见: 川明参和明党参 *psbA-trnH* 片段的 GC 含量均为 23%, 其他种类的为 26% ~ 35%。川明参和明党参 *psbA-trnH* 片段的 GC 含量最低, 主要原因是它们的 *psbA-trnH* 片段序列包含多个 A 和 T 的重复序列。由于每个种类 DNA 的 GC 含量恒定, 不会因环境条件和培养条件等因子的变化而改变, 且在同属不同种间 DNA 的 GC 含量差异不大, 因此可利用 GC 含量研究种间或属间的亲缘关系及其远近程度。

根据 *psbA-trnH* 片段长度和 GC 含量可以得出 2 个明确结果: 一是在选取的植物种类中 *psbA-trnH* 片段可提供的变异位点和信息位点较多, 说明在伞形科的族间和属间的系统发育重建研究中 *psbA-trnH* 片段可以提供较丰富的变异信息; 二是川明参的 *psbA-*

表 2 川明参和供试伞形科相关种类的 *psbA-trnH* 片段序列长度、GC 含量和 GenBank 登录号Table 2 Sequence length, GC content and GenBank accession numbers of *psbA-trnH* fragment of *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan and related species tested in Apiaceae

种类 Species	序列长度/bp Sequence length	GC 含量/% GC content	排序后的序列长度/bp Sequence length after alignment	登录号 Accession No.
川明参 <i>Chuanminshen violaceum</i>	258	23	553	KF557756
明党参 <i>Changium smyrnioides</i>	258	23	553	KF557757
舟瓣芹 <i>Sinolimprichtia alpine</i> ¹⁾	392	26	553	FJ475175
华中前胡 <i>Peucedanum medicum</i>	286	31	553	KF557758
泰山前胡 <i>Peucedanum wawrae</i>	282	33	553	KF557759
宝兴棱子芹 <i>Pleurospermum davidii</i>	400	29	553	KF557760
丽江棱子芹 <i>Pleurospermum foetens</i>	404	33	553	KF557761
鸡冠棱子芹 <i>Pleurospermum cristatum</i>	405	35	553	KF557762
瘤果芹 <i>Trachydium roylei</i> ¹⁾	357	27	553	FJ475176
宽叶羌活 <i>Notopterygium franchetii</i> ¹⁾	348	26	553	HQ269399
草地阿魏 <i>Ferula kingdon-wardii</i> ¹⁾	233	32	553	JQ937319
密毛大瓣芹 <i>Semenovia pimpinelloides</i> ¹⁾	228	32	553	JQ937316
白芷 <i>Angelica dahurica</i> ¹⁾	285	33	553	GQ248247
狭叶当归 <i>Angelica anomala</i> ¹⁾	311	34	553	JN033546
刺果芹 <i>Turgenia latifolia</i> ¹⁾	296	35	553	JF807624

¹⁾ *psbA-trnH* 片段序列信息引自 GenBank Sequence information of *psbA-trnH* fragment induced from GenBank.

trnH 片段长度及 GC 含量均与明党参相同,说明二者可能具有较近的亲缘关系。

2.2 供试种类相对遗传距离分析

基于 *psbA-trnH* 片段序列计算 15 个供试种类间

的相对遗传距离,结果见表 3。川明参与属于前胡族的前胡属 (*Peucedanum* Linn.) 种类华中前胡和泰山前胡,阿魏属 (*Ferula* Linn.) 种类草地阿魏 (*F. kingdon-wardii* H. Wolff), 大瓣芹属 (*Semenovia* Regel et

表 3 基于 *psbA-trnH* 片段序列的川明参和明党参与供试伞形科相关种类间的相对遗传距离Table 3 Relative genetic distance among *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan, *Changium smyrnioides* H. Wolff and related species tested in Apiaceae based on sequence of *psbA-trnH* fragment

种类 ¹⁾ Species ¹⁾	各种类间的相对遗传距离 Relative genetic distance among different species													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0.02													
3	0.10	0.12												
4	1.20	1.20	1.34											
5	1.20	1.20	1.34	0.00										
6	0.10	0.08	0.17	1.29	1.29									
7	0.12	0.10	0.20	1.34	1.34	0.02								
8	0.12	0.10	0.20	1.25	1.25	0.02	0.03							
9	0.10	0.08	0.17	1.08	1.08	0.06	0.05	0.08						
10	0.05	0.06	0.12	1.05	1.05	0.11	0.13	0.13	0.11					
11	1.34	1.34	1.29	0.08	0.08	1.45	1.51	1.39	1.19	1.16				
12	1.20	1.20	1.34	0.05	0.05	1.29	1.34	1.25	1.08	1.05	0.03			
13	1.12	1.12	1.25	0.03	0.03	1.20	1.24	1.17	1.01	0.98	0.05	0.02		
14	1.12	1.12	1.25	0.03	0.03	1.20	1.24	1.17	1.01	0.98	0.05	0.02	0.00	
15	1.08	1.08	1.05	0.10	0.10	1.16	1.19	1.12	0.97	1.08	0.05	0.08	0.06	0.06

¹⁾ 1. 川明参 *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan; 2. 明党参 *Changium smyrnioides* H. Wolff; 3. 舟瓣芹 *Sinolimprichtia alpine* H. Wolff; 4. 华中前胡 *Peucedanum medicum* Dunn; 5. 泰山前胡 *Peucedanum wawrae* (H. Wolff) Su; 6. 宝兴棱子芹 *Pleurospermum davidii* Franch.; 7. 丽江棱子芹 *Pleurospermum foetens* Franch.; 8. 鸡冠棱子芹 *Pleurospermum cristatum* de Boiss.; 9. 瘤果芹 *Trachydium roylei* Lindl.; 10. 宽叶羌活 *Notopterygium franchetii* C. T. Ting ex H. T. Chang; 11. 草地阿魏 *Ferula kingdon-wardii* H. Wolff; 12. 密毛大瓣芹 *Semenovia pimpinelloides* (Nevski) Manden.; 13. 白芷 *Angelica dahurica* Benth. et Hook.; 14. 狭叶当归 *Angelica anomala* Ave-Lall.; 15. 刺果芹 *Turgenia latifolia* (Linn.) Hoffm.

Herder) 种类密毛大瓣芹 [*S. pimpinelloides* (Nevski) Manden.] 及当归属 (*Angelica* Linn.) 种类白芷 (*A. dahurica* Benth. et Hook.) 和狭叶当归 (*A. anomala* Ave-Lall.) 间的相对遗传距离均超过 1, 而与属于美味芹族的明党参、棱子芹属 (*Pleurospermum* Hoffm.) 种类宝兴棱子芹和丽江棱子芹及鸡冠棱子芹、舟瓣芹属 (*Sinolimprichtia* H. Wolff) 种类舟瓣芹 (*S. alpine* H. Wolff)、羌活属 (*Notopterygium* de Boiss.) 种类宽叶羌活 (*N. franchetii* C. T. Ting ex H. T. Chang) 和瘤果芹属 (*Trachydium* Lindl.) 种类瘤果芹 (*T. roylei* Lindl.) 间的相对遗传距离均小于 0.12。说明川明参与供试前胡族各种类间的亲缘关系较远, 而与美味芹族各种类间的亲缘关系则较近。

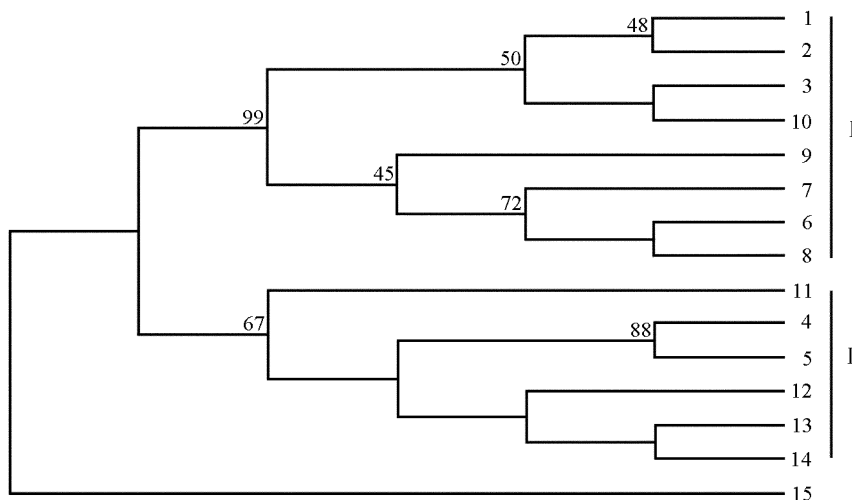
此外, 川明参与明党参的相对遗传距离仅为 0.02, 甚至与某些同属种类间的相对遗传距离相同, 如棱子芹属宝兴棱子芹、丽江棱子芹和鸡冠棱子芹 3 种之间的相对遗传距离也为 0.02, 说明川明参与明党参间具有极近的亲缘关系。但要判断川明参与明党参能否归为同属则仍需多学科的研究证据加以验证。

2.3 供试种类分子系统发育树的比较和分析

以刺果芹 [*Turgenia latifolia* (Linn.) Hoffm.] 作为

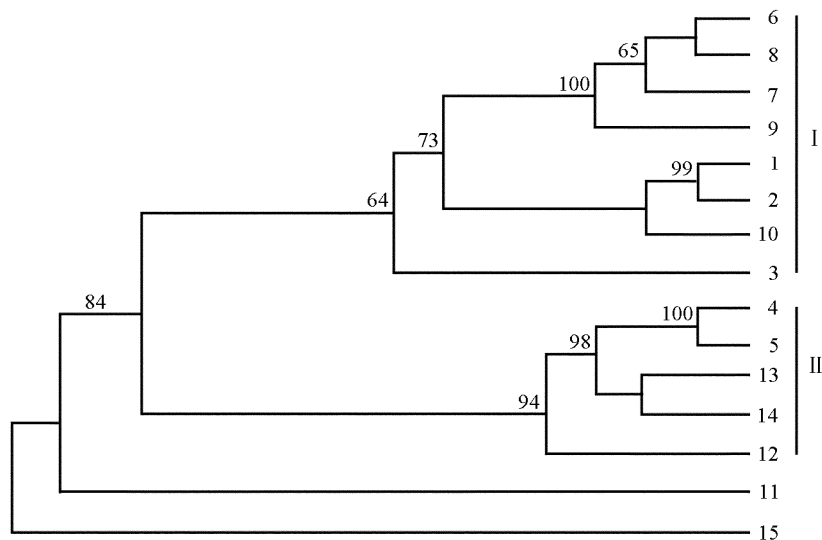
外类群, 根据测序所得的 *psbA-trnH* 片段序列, 分别构建 MP、ML 以及 BI 系统树, 结果见图 1、图 2 和图 3。结果显示: 3 类系统树在拓扑结构上稍有区别。除去外类群, MP 系统树分为 2 大支: 一大支 (I) 由川明参、明党参以及美味芹族的舟瓣芹、宽叶羌活、3 个棱子芹属种类和瘤果芹构成 (美味芹族分支); 另一大支 (II) 由前胡族的草地阿魏、2 个前胡属种类、密毛大瓣芹和 2 个当归属种类构成 (前胡族分支) (图 1)。但在 ML 和 BI 系统树中, 草地阿魏独立出来并位于系统树基部, 与前胡族和美味芹族分支成为姐妹类群; 除去个别小分支的拓扑结构不同之外, ML 和 BI 系统树的大分支结构与 MP 系统树基本相同, 来自美味芹族的种类聚为一支 (I), 而前胡族种类聚为另一支 (II) (图 2 和图 3)。ML 和 BI 系统树的拓扑结构比较相似, 大的分支结构基本相同, 仅美味芹族分支中舟瓣芹和宽叶羌活的位置有所变化, 前胡族分支中密毛大瓣芹的位置也稍有不同。

美味芹族分支又可分成多个小支。川明参与明党参聚为 1 个小支; 棱子芹属的 3 个种类与瘤果芹组成 1 个小支; 舟瓣芹的位置变化较大, 在 MP 和 BI 系统树中均与川明参聚在同一个分支, 但在 ML 系统树



1. 川明参 *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan; 2. 明党参 *Changium smyrnioides* H. Wolff; 3. 舟瓣芹 *Sinolimprichtia alpine* H. Wolff; 4. 华中前胡 *Peucedanum medicum* Dunn; 5. 泰山前胡 *Peucedanum wawrae* (H. Wolff) Su; 6. 宝兴棱子芹 *Pleurospermum davidii* Franch.; 7. 丽江棱子芹 *Pleurospermum foetens* Franch.; 8. 鸡冠棱子芹 *Pleurospermum cristatum* de Boiss.; 9. 瘤果芹 *Trachydium roylei* Lindl.; 10. 宽叶羌活 *Notopterygium franchetii* C. T. Ting ex H. T. Chang; 11. 草地阿魏 *Ferula kingdon-wardii* H. Wolff; 12. 密毛大瓣芹 *Semenovia pimpinelloides* (Nevski) Manden.; 13. 白芷 *Angelica dahurica* Benth. et Hook.; 14. 狭叶当归 *Angelica anomala* Ave-Lall.; 15. 刺果芹 *Turgenia latifolia* (Linn.) Hoffm. I. 美味芹族分支 Clade of Trib. Smyrnieae; II. 前胡族分支 Clade of Trib. Peucedaneae. 分支上的数字为自展支持率 Numbers on the branches are the bootstrap values.

图 1 基于 *psbA-trnH* 片段序列分析的川明参和供试伞形科相关种类间的 MP (最大简约法) 系统树
Fig. 1 MP (the maximum parsimony method) phylogenetic tree of *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan and related species tested in Apiaceae based on sequence analysis of *psbA-trnH* fragment



1. 川明参 *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan; 2. 明党参 *Changium smyrnioides* H. Wolff; 3. 舟瓣芹 *Sinolimprichtia alpine* H. Wolff; 4. 华中前胡 *Peucedanum medicum* Dunn; 5. 泰山前胡 *Peucedanum wawrae* (H. Wolff) Su; 6. 宝兴棱子芹 *Pleurospermum davidii* Franch.; 7. 丽江棱子芹 *Pleurospermum foetens* Franch.; 8. 鸡冠棱子芹 *Pleurospermum cristatum* de Boiss.; 9. 瘤果芹 *Trachydium roylei* Lindl.; 10. 宽叶羌活 *Notopterygium franchetii* C. T. Ting ex H. T. Chang; 11. 草地阿魏 *Ferula kingdon-wardii* H. Wolff; 12. 密毛大瓣芹 *Semenovia pimpinelloides* (Nevski) Manden.; 13. 白芷 *Angelica dahurica* Benth. et Hook.; 14. 狭叶当归 *Angelica anomala* Ave-Lall.; 15. 刺果芹 *Turgenia latifolia* (Linn.) Hoffm. I. 美味芹族分支 Clade of Trib. Smyrnieae; II. 前胡族分支 Clade of Trib. Peucedaneae. 分支上的数字为自展支持率 Numbers on the branches are the bootstrap values.

图2 基于 *psbA-trnH* 片段序列分析的川明参和供试伞形科相关种类间的 ML (最大似然法) 系统树
Fig. 2 ML (the maximum likelihood method) phylogenetic tree of *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan and related species tested in Apiaceae based on sequence analysis of *psbA-trnH* fragment

中却位于美味芹族分支的最外部;而宽叶羌活的位置也稍有变化,在 MP 和 ML 系统树上均与川明参聚为同一个分支,但在 BI 系统树上却与棱子芹属种类聚为同一分支。

前胡族分支也可分为数个小支。泰山前胡和华中前胡始终聚为 1 个小支,当归属的狭叶当归和白芷也始终聚为 1 个小支;但密毛大瓣芹的位置变化较大,在 ML 系统树中位于前胡属和当归属 2 个小支的外部,而在 MP 和 BI 系统树中均与当归属的 2 个种类聚为 1 个小支;草地阿魏位置比较特殊,在 MP 系统树中聚在前胡族分支中,而在 ML 和 BI 系统树中则从前胡族分支中划出并独立于系统树基部,因而,阿魏属的系统关系也有待进一步探讨。

3 讨论和结论

3.1 *psbA-trnH* 片段在伞形科属间分类中的应用

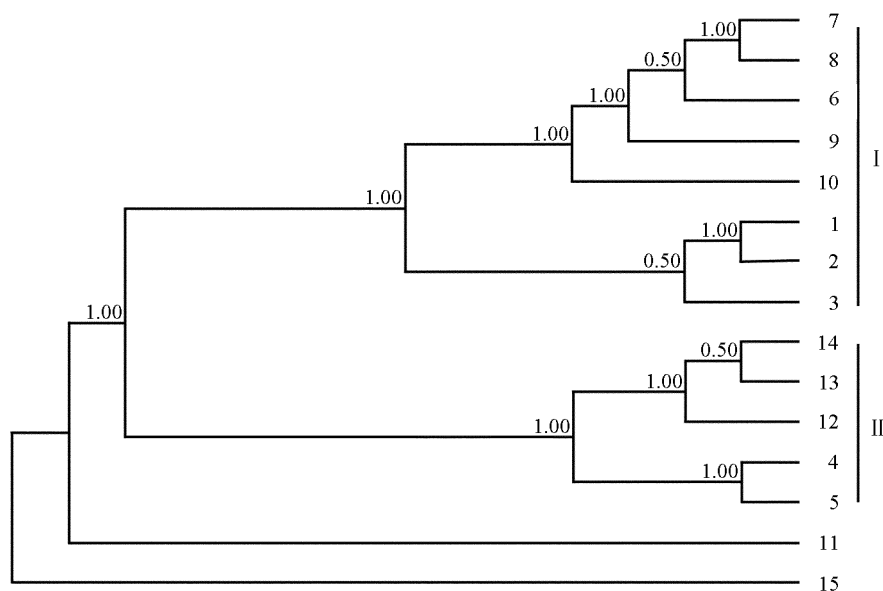
从 MP、ML 及 BI 系统树可见:基于 *psbA-trnH* 片段序列分析建立族内属间的系统树,3 种方法都具有比较理想的效果,说明 *psbA-trnH* 片段适用于川明参属与前胡族和美味芹族种类的亲缘关系分析。*psbA-*

trnH 片段已被广泛用作被子植物物种鉴别的条形码,但目前该片段应用面临的困难是非同属物种间的序列比对,主要是插入/缺失位点过多所致^[19]。本研究中,不同属种类的 *psbA-trnH* 片段序列的插入和缺失位点也较多,因此序列比对和人工校正相对比较繁琐;但该片段序列提供的变异位点也较多,可为族内属间的系统发育重建研究提供较丰富的信息。本项目组对供试种类也进行了基于 ITS 序列分析的分子系统学研究(另文发表),得到的结果与其他研究者^[5-6]的研究结果基本相同。因此,在伞形科属间系统关系研究中也使用 *psbA-trnH* 片段;而在实际研究过程中也可 1 个或多个条形码片段组合使用。

3.2 川明参属分类地位的探讨

川明参在独立成属之前曾作为药材“明党参”使用。由于其分生果具有果体背腹压扁和侧棱稍宽等特征,1980 年余孟兰和单人骅将其从美味芹族明党参属中分出,独立为新属并归入前胡族^[4]。从经典分类上看,这种分类处理有其合理性,因为果实强烈背腹压扁和侧棱发达是前胡族种类的特征之一。

从基于 *psbA-trnH* 片段构建的 3 类系统发育树可以看出:川明参总是与供试的美味芹族种类聚为一大



1. 川明参 *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan; 2. 明党参 *Changium smyrnioides* H. Wolff; 3. 舟瓣芹 *Sinolimprichtia alpina* H. Wolff; 4. 华中前胡 *Peucedanum medicum* Dunn; 5. 泰山前胡 *Peucedanum wawrae* (H. Wolff) Su; 6. 宝兴棱子芹 *Pleurospermum davidii* Franch.; 7. 丽江棱子芹 *Pleurospermum foetens* Franch.; 8. 鸡冠棱子芹 *Pleurospermum cristatum* de Boiss.; 9. 瘤果芹 *Trachydium roylei* Lindl.; 10. 宽叶羌活 *Notopterygium franchetii* C. T. Ting ex H. T. Chang; 11. 草地阿魏 *Ferula kingdon-wardii* H. Wolff; 12. 密毛大瓣芹 *Semenovia pimpinelloides* (Nevski) Manden.; 13. 白芷 *Angelica dahurica* Benth. et Hook.; 14. 狭叶当归 *Angelica anomala* Ave-Lall.; 15. 刺果芹 *Turgenia latifolia* (Linn.) Hoffm. I. 美味芹族分支 Clade of Trib. Smyrnieae; II. 前胡族分支 Clade of Trib. Peucedaneae. 分支上的数字为后验概率值 Numbers on the branches are the posterior probability values.

图3 基于 *psbA-trnH* 片段序列分析的川明参和供试伞形科相关种类间的 BI (贝叶斯法) 系统树
Fig. 3 BI (MrBayes software) phylogenetic tree of *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan and related species tested in Apiaceae based on sequence analysis of *psbA-trnH* fragment

支,而供试的前胡族种类则聚为另一大支。并且川明参与供试前胡族种类间的相对遗传距离较大(基本均大于1),而与供试的美味芹族种类的相对遗传距离较小(小于0.2)。说明川明参与前胡族关系较远,与美味芹族的关系较近。以上结果均支持将川明参从前胡族调整到美味芹族的分类处理。

此外,近年来的相关研究结果也与传统的经典分类观点不同。惠红等^[20]通过伞形科前胡族的血清系统学研究,认为川明参属与前胡族其他属的亲缘关系较远;邱英雄等^[5]和陶晓瑜等^[6]基于 ISSR 标记分析及 ITS 片段分析结果,提出将川明参置于美味芹族的分类观点;Zhou 等^[21]对包括明党参和川明参在内的10个中国伞形科特有种进行了分子系统进化研究,确定明党参属和川明参属共同位于同一分支中。由此可见,目前将川明参属置于前胡族中的分类处理不甚合理,建议将川明参属重新归入美味芹族。

3.3 川明参与明党参亲缘关系的分析

上述的 MP、ML 和 BI 系统树均显示川明参与明党参聚在一起,说明二者的亲缘关系非常近。从相对

遗传距离来看,川明参与明党参间的相对遗传距离较小,仅为0.02,等同于伞形科某些属内种间的相对遗传距离,如供试棱子芹属的3个种类间的相对遗传距离也为0.02;但有些属间种类的相对遗传距离也较小,如密毛大瓣芹和2个当归属种类间的相对遗传距离也仅为0.02。说明川明参与明党参的亲缘关系极近,二者互为姐妹类群,但要判断川明参与明党参分属于不同属还是同一个属则需依据其他学科证据的验证。

川明参和明党参的外部形态特征和果实解剖特征有许多相似之处^[22-24]:从外部形态看,二者的植株和果实发育季节和过程均比较相近;成熟果实表面皱缩,可看到突起的油管。从果实发育过程的解剖结构看,二者在幼果期都存在一段有角的五边形时期,可称之为果实发育的“五边态”,并且二者的胚乳发育趋势以及油管和维管束的分布方式和演化趋势相同。这也佐证了川明参和明党参具有较近的亲缘关系。

果实形态特征是伞形科植物的重要分类依据,而川明参和明党参的果实形态和解剖结构也存在一些

差别。从横切面形状上看,川明参的成熟分生果横切面为背腹极度压扁的梭形,而明党参的则为肾状圆形;从油管数目上看,川明参果实棱槽处仅有1~2个油管,而明党参果实棱槽处有3~4个油管;从胚乳形状上看,明党参成熟果实的胚乳形状为“C”形,而川明参的则为新月形^[22-24]。所以,依据果实压扁类型和果棱突起程度划分,川明参和明党参应分别位于果实背腹压扁且侧棱发达和果实不甚压扁且无果棱的2个类群中,也就是说应处理为2个独立属。

综合分子系统学与形态学的研究证据,作者认为川明参属应重新置于美味芹族中;而川明参属与明党参属应处理为2个独立属,但因二者亲缘关系较近,可并列为姐妹类群。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第五十五卷第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 122-124.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 195-196.
- [3] 蒲高忠, 刘启新. 易混中药材明党参和川明参的研究进展[J]. 大众科技, 2007(9): 152-153.
- [4] 余孟兰, 单人骅. *Cyclorhiza* and *Chuanminshen*—two newly proposed genera in Umbelliferae (Apiaceae) [J]. 植物分类学报, 1980, 18(1): 45-49.
- [5] 邱英雄, 傅承新, 吴斐捷. 明党参与川明参群体遗传结构及分子鉴定的 ISSR 分析[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 598-603.
- [6] 陶晓瑜, 桂先群, 傅承新, 等. 明党参和川明参种间遗传分化和系统关系的分子标记和 ITS 序列分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2008, 34(5): 473-481.
- [7] SHAW J, LICKY E B, BECK J T, et al. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis [J]. American Journal of Botany, 2005, 92(1): 142-166.
- [8] LAHAYE R, Van Der BANK M, BOGARIN D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [9] LOGACHEVA M D, VALIEJO-ROMAN C M, PIMENOV M G. ITS phylogeny of West Asian *Heracleum* species and related taxa of Umbelliferae-Tordylieae W. D. J. Koch, with notes on evolution of their *psbA-trnH* sequences [J]. Plant Systematics and Evolution, 2008, 270(3/4): 139-157.
- [10] NEWMASER S G, FAZEKAS A J, STEEVES R A, et al. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae [J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(3): 480-490.
- [11] WHIPPLE I G, BARKWORTH M E, BUSHMAN B S. Molecular insights into the taxonomy of *Glyceria* (Poaceae: Meliceae) in North America [J]. American Journal of Botany, 2007, 94(4): 551-557.
- [12] FRÉZAL L, LEBLOIS R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2008, 8(5): 727-736.
- [13] ROGERS S O, BENDICH A J. Extraction of DNA from plant tissues [M] // GELVIN S B, SCHILPEROOT R A, VERMA D P S, et al. Plant Molecular Biology Manual. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989: 73-83.
- [14] SANG T, CRAWFORD D J, STUESSY T F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paonia* (Paeoniaceae) [J]. American Journal of Botany, 1997, 84(8): 1120-1136.
- [15] TATE J A, SIMPSON B B. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species [J]. Systematic Botany, 2003, 28(4): 723-737.
- [16] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [18] SWOFFORD D L. PAUP *: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta [CP]. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2002.
- [19] KRESS W J, WURDACK K J, ZIMMER E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8369-8374.
- [20] 惠红, 刘启新, 刘梦华. 中国伞形科前胡族阿魏亚族血清分类及亲缘关系的研究 [J]. 植物分类学报, 2003, 41(4): 369-380.
- [21] ZHOU J, GONG X, DOWNIE S R, et al. Towards a more robust molecular phylogeny of Chinese Apiaceae subfamily Apioideae: additional evidence from nrDNA ITS and cpDNA intron (*rp16* and *rps16*) sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 53(1): 56-68.
- [22] 刘玉龙, 刘启新, 宋春风, 等. 明党参花后果实发育的外部形态特征变化 [J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(2): 1-7.
- [23] 宋春风, 刘玉龙, 刘启新, 等. 伞形科植物明党参花后果实发育的解剖结构变化 [J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(4): 1-7.
- [24] 宋春风, 刘玉龙, 刘启新. 川明参果实发育过程中解剖结构的变化 [J]. 植物研究, 2013, 33(6): 659-665.

(责任编辑: 惠红)