

# 基于 *matK* 基因的几种苔藓植物的亲缘关系分析

张安世, 司清亮, 张为民, 陈娟

(焦作师范高等专科学校, 河南 焦作 454003)

**摘要:** 以钝鳞紫背苔 (*Plagiochasma appendiculatum*) 为外类群 (outgroup), 利用 ClustalX 2.0 和 MEGA 4.1 软件对 8 种苔藓植物的 *matK* 基因序列进行比对和分析, 构建分子系统树。结果表明: 8 种苔藓植物的 *matK* 序列长度为 638 bp~650 bp, 排序后总长度为 664 bp, 其中变异位点 357 个, 信息位点 180 个。遗传距离为 0.058~0.557, 平均遗传距离为 0.287。利用 NJ 法建立的系统树显示, 8 种苔藓植物分为 3 组, 其中 2 种丛藓科的聚为一组, 3 种青藓科的聚为一组, 3 种灰藓科的聚为另一组。序列分析结果与形态学结果一致, 表明 *matK* 基因序列可用于苔藓植物的亲缘关系分析。

**关键词:** 苔藓植物; DNA 条形码; *matK* 基因; 亲缘关系; 系统发育分析

中图分类号: S688.4 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)01-0110-03

## Analysis of the Phylogenetic Relationship among Some Bryophytes Based on *matK* Gene

ZHANG An-shi, SI Qing-liang, ZHANG Wei-min, CHEN Juan

(Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454003, China)

**Abstract:** Using *Plagiochasma appendiculatum* as the outgroup, *matK* genes belonging to 8 bryophyte species were analyzed and compared to construct the phylogenetic trees with ClustalX 2.0 and MEGA 4.1 softwares. The results showed that the length of *matK* gene in 8 bryophytes were between 638 bp and 650 bp and the total length of sequence was 664 bp after alignment, including 357 variable sites and 180 informative sites. The genetic distance were 0.058—0.557 averaging 0.287. The 8 species in the NJ tree (neighbor-joining tree) were clustered into three groups: 2 species of *Pottiaceae*, 3 species of *Brachytheciaceae* and 3 species of *Hypnaceae*. The clustered results were consistent with the morphologic identification, which also showed that *matK* gene can be used for the analysis of bryophytes relationship.

**Key words:** bryophytes; DNA barcoding; *matK* gene; phylogenetic relationship; phylogenetic analysis

苔藓植物是一类以孢子繁殖, 由水生向陆生过渡的植物, 全世界约有 23 000 种<sup>[1-3]</sup>, 具有丰富的生物多样性。近年来, 随着分子生物研究技术和方法的不断改进和完善, 其在苔藓植物研究中的应用越来越广泛。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是利用一个或少数几个 DNA 片段对地球上现有物种进行识别和

鉴定的方法<sup>[4]</sup>。使用 DNA 条形码对物种的分类和鉴定避免了对经验的过分依赖, 且可实现鉴定过程的自动化和标准化, 已经成为国际上生物多样性研究的热点之一。

叶绿体基因组的 *matK* 基因位于 *trnK* 基因的内含子中, 为一个开放阅读框, 长约 1 500 bp, 编码一种成熟酶, 参与 RNA 转录体中 II 型内含子的剪切, 是

收稿日期: 2011-08-05

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2010C180004, 2011C180010)

作者简介: 张安世 (1965-), 男, 河南博爱人, 教授, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: aszhang1212@163.com

叶绿体基因组蛋白编码基因中进化速率最快的基因之一,在科、属级水平,*matK* 序列分析为研究类群内部的系统重建提供了较多的信息和较高的支持率<sup>[5-6]</sup>。同时 *matK* 序列在某些类群的种间、种下的系统进化研究中也成功被应用<sup>[7-9]</sup>,是被国际条形码联盟推荐的候选片段之一<sup>[10]</sup>。*matK* 基因 3'端较保守,5'端较多变,因此,3'端可用于科间水平分析,而 5'端可用于较低等级(科内、属间,甚至种间)的系统发育研究,整个基因均可用来做多水平的系统发育分析。本

研究采用 *matK* 对 8 种苔藓植物进行了序列分析,以评价 *matK* 基因序列在研究苔藓植物遗传多样性分析中的可行性,为苔藓植物的分类、鉴定提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试材料除钝鳞紫背苔(作为外类群,GenBank 序列号为:AF264682.1)外,均采自河南省云台山世界地质公园(表 1)。

表 1 供试苔藓植物种类、名称

编号	科名	种名
1	丛藓科 Pottiaceae	长尖对齿藓 <i>Didymodon constrictus</i>
2	丛藓科 Pottiaceae	扭口藓 <i>Barbula unguiculata</i>
3	青藓科 Brachytheciaceae	弯叶青藓 <i>Brachythecium reflexum</i>
4	青藓科 Brachytheciaceae	多枝青藓 <i>Brachythecium fasciculirameum</i>
5	青藓科 Brachytheciaceae	绒叶青藓 <i>Brachythecium velutinum</i>
6	灰藓科 Hypnaceae	灰藓凹叶变种 <i>Hypnum cupressiforme</i> Hedw. var. <i>cupressiforme</i>
7	灰藓科 Hypnaceae	鳞叶藓 <i>Taxiphyllum taxirameum</i>
8	灰藓科 Hypnaceae	金灰藓 <i>Pylaisiella polyantha</i>
9	瘤冠苔科 Grimaldiaceae	钝鳞紫背苔 <i>Plagiochasma appendiculatum</i>

### 1.2 DNA 的提取、PCR 扩增及序列测定

采用改良 CTAB 法<sup>[9]</sup>提取苔藓植物的基因组 DNA。

PCR 引物为 *matK*2F/*matK*1R(自行设计),*matK* 2F: 5'-TGCCCTAAAGTATCACAAAA-3';*matK*1R: 5'-AATTCTTCGTCGACGCATACAA-3'。PCR 反应体积为 35  $\mu$ L;DNA 8.4  $\mu$ L(质量浓度为 3 ng/ $\mu$ L);引物:正反引物各 1.4  $\mu$ L(引物质量浓度为 10  $\mu$ mol/L); $2\times$  *Taq* MasterMix 含有 *Taq* DNA Polymerase, $2\times$  *Taq* PCR Buffer,3 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 400  $\mu$ mol/L dNTP mix)18.2  $\mu$ L;RNase-Free Water 5.6  $\mu$ L。反应条件:94  $^{\circ}$ C,5 min;94  $^{\circ}$ C 1 min,50  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 7 min,4  $^{\circ}$ C 保存。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测合格的 PCR 产物送金唯智生物科技(北京)有限公司纯化后进行单向测序。

### 1.3 序列分析和系统树的构建

以钝鳞紫背苔为外类群,将获得的 DNA 序列用 ClustalX 2.0 软件进行比对。用系统发育软件 MEGA 4.1 进行数据分析和系统发育树的构建。采用邻接法(NJ 法)建分子系统树,以 1 000 次自举分析(bootstrap)检测各分支的置信度。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列分析

测序结果显示,8 种苔藓植物的 *matK* 序列长

度在 638~650 bp,其中,最长的为多枝青藓,最短的是鳞叶藓。

包括外类群钝鳞紫背苔在内的 9 种苔藓植物的 *matK* 序列利用 ClustalX 2.0 对位排序时,将空位(gap)作缺失(missing)处理,排序后总长度为 740 bp,其中变异位点 497 个,信息位点 235 个。去掉外类群,排序后总长度为 664 bp,其中变异位点 357 个,信息位点 180 个,所能提供的信息较多,反映了 *matK* 序列在苔藓植物中的分辨率很高。A、T、C、G 的平均含量分别为 41%、37.3%、11.8%、9.9%。嘌呤的转换/颠换率  $k_1 = 2.003$ ,嘧啶的转换/颠换率  $k_2 = 2.267$ ,转换/颠换 = 0.449。

### 2.2 系统发育分析

将对位排列后的序列导入 MEGA 4.1,选择 Kimura2-Parameter 核酸距离模式计算得遗传距离矩阵(表 2)。结果表明,8 种苔藓植物的遗传距离在 0.058~0.557,平均遗传距离为 0.287。其中弯叶青藓与多枝青藓的遗传距离最小,为 0.058,扭口藓与多枝青藓的遗传距离最大,为 0.557。

利用 NJ 法构建分子系统树,结果表明(图 1),内类群聚为一支,外类群聚为一支。内类群包含了所要分析的 8 种苔藓植物,其中青藓科的弯叶青藓、多枝青藓、绒叶青藓和灰藓科的灰藓凹叶变种、鳞叶藓、金灰藓分别聚为二组,其自展支持率分别为 99%和 82%,丛藓科长尖对齿藓和扭口藓分别聚为一组,其自展支持率为 78%。聚类结果完全符合形

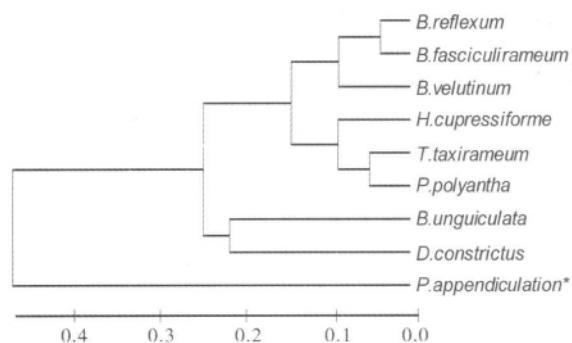
态分类学结果。说明 *matK* 基因序列可用于苔藓植物的遗传多样性分析。

表 2 基于 Kimura2-Parameter 遗传距离

编号	1	2	3	4	5	6	7
2	0.058						
3	0.086	0.123					
4	0.220	0.237	0.192				
5	0.207	0.235	0.176	0.073			
6	0.235	0.257	0.203	0.137	0.131		
7	0.294	0.328	0.299	0.302	0.290	0.309	
8	0.552	0.557	0.552	0.535	0.519	0.504	0.412

注:1. 弯叶青藓; 2. 多枝青藓; 3. 绒叶青藓; 4. 鳞叶藓; 5. 金灰藓; 6. 灰藓凹叶变种; 7. 长尖对齿藓; 8. 扭口藓。

由于所讨论的 8 种苔藓植物分属在 3 个科内, 变异位点和信息位点较多, 因此, 所得到的系统树的分辨率和支持率较高。



数字表示各分支自展数据支持率, \* 为外类群

图 1 NJ 法构建的苔藓植物系统树

### 3 讨论

*matK* 是最早被用于植物系统发育学研究的基因序列之一。迄今为止, 已在多种植物类群的系统发育分析中得以广泛地应用。但有关藓类植物 *matK* 分析的成功例子并不多见, GenBank 中有关苔藓植物的 *matK* 序列数据较少, 特别是藓类植物的 *matK* 序列数据更少。这与 *matK* 引物通用性差、扩增成功率不高有关<sup>[12-13]</sup>。赵丽嘉等<sup>[14]</sup>利用 3 对引物扩增蔓藓科部分属 24 份样品均未成功。至于那些被成功扩增的 *matK* 序列, 还局限在部分科属<sup>[15]</sup>, 仍未解决引物通用性的问题<sup>[16]</sup>。

本研究所使用的引物是从设计的 3 对引物中筛选出来、扩增成功率较高的 1 对引物, 对测序成功的 8 种藓类植物的序列分析结果表明, 聚类结果与形态学结果一致。由于本研究只涉及了藓类植物的 3 科 8 种, 是否能适用于其他的苔藓植物, 还需要扩大取材尺度, 特别是要增加科内、属内的种类对其引物通用性和鉴定效果进行进一步检验。

### 参考文献:

- [1] 汪庆, 贺善安. 苔藓植物的多样性研究[J]. 生物多样性, 1999, 7(4): 332-339.
- [2] 李学业. 苔藓植物在园林上的应用与人工培育技术[J]. 现代农业科技, 2008(23): 81.
- [3] 祁延英. 苔藓植物在园林上的应用[J]. 现代农业科技, 2009(15): 250.
- [4] 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, 2005, 102: 8369-8374.
- [5] Plunkett G M, Soltis D E, Soltis P S. Clarification of the relationship between *Apiaceae* and *Araliaceae* based on *matK* and *rbcL* sequence data[J]. American Journal of Botany, 1997, 84: 565-580.
- [6] Kron K A. Phylogenetic relationships of *Rhododendroideae* (Ericaceae)[J]. American Journal of Botany, 1997, 84: 973-980.
- [7] Zhang Z Y, Li D F. Molecular phylogeny of section *Parrya* of *Pinus* (Pinaceae) based on chloroplast *matK* gene sequence data[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(2): 171-179.
- [8] Gao X, Zhu Y P, Wu B C, et al. Phylogeny of *Dioscorea* sect. *Stenofora* based on chloroplast *matK*, *rbcL* and *trnL-F* sequence[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2008, 46(3): 315-321.
- [9] 刘静, 何涛, 淳泽. 药用石斛的叶绿体 *matK* 基因序列分析及鉴定[J]. 药学学报, 2009, 44(9): 1051-1055.
- [10] 宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展[J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417-425.
- [11] 张安世, 邢智峰, 刘永英, 等. 苔藓植物 DNA 不同提取方法的比较分析[J]. 河南科学, 2009, 27(5): 559-562.
- [12] Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. Taxon, 2007, 56: 295-299.
- [13] Hollingsworth P M. DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: Progress and outstanding questions[J]. Heredity, 2008, 101: 1-2.
- [14] 赵丽嘉, 贾渝, 周世良, 等. 藓类植物 DNA 条形码的初步研究——以蔓藓科部分属为例[J]. 云南植物研究, 2010, 32(3): 239-249.
- [15] 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, 2008, 105: 2923-2928.
- [16] Kress W J, Erickson D L. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105: 2761-2762.