

文章编号: 1674-7054(2013)04-0393-07

冬青属植物系统学及遗传多样性研究进展

田建平^{1 2 3} 李娟玲⁴ 胡远艳⁵ 刘国民^{1 2}

(1. 海南大学 苦丁茶研究所 海南 海口 570228; 2. 海南大学 农学院 海南 海口 570228; 3. 海南医学院 药学院 海南 海口 571101; 4. 海南大学 园林园艺学院 海南 海口 570228; 5. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室 海南 海口 570228)

摘要: 本文概述了近10年来冬青属植物系统学与遗传多样性研究的新进展,包括植物形态、化学分类学、分子系统发生、遗传多样性及分子生物学具体应用等领域。

关键词: 冬青属; 冬青科; 系统学; 遗传多样性; 新进展

中图分类号: Q 346.5 文献标志码: A

冬青属 *Ilex* L. 是冬青科最大的一属植物,现已知的约有600种,主要分布于热带美洲和东亚地区^[1]。中国的冬青属植物约有200种,主要分布在长江以南各省^[2-3]。该属植物中很多物种都具有药用价值,还有数种用于制备代茶饮料[其中以苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha*)和巴拉圭冬青(*I. paraguariensis*)最典型],有些物种还具有园艺观赏和制作家具等用途,因而具有较高的经济和药用价值。近年来,冬青属植物的化学成分和药理作用等方面的研究取得了较大进展^[4],但该属植物系统学方面的研究尚不够深入。原因是由于冬青属植物在分类上比较困难,其花的形态在种间水平上非常一致,而叶片形态在种内水平上则表现出很大的变异性。另外,该属植物还存在大量的杂交种,而且在遗传和地理分布上也表现出了高度复杂性,因此,对冬青属植物的系统学研究存在较大困难^[5-6]。近年来,随着分子系统发育生物学和化学分类学技术的不断发展,冬青属植物的系统学和遗传多样性研究取得了长足进步。笔者综述该领域近年来的研究进展,旨在为冬青属植物系统学及遗传多样性研究提供参考。

1 系统学

1.1 传统分类学特征在冬青属植物系统学中的应用

1.1.1 植物形态宏观结构特征 由于基因多样性的存在,冬青属植物在植物形态方面具有较大的多型性,COELHO 等人^[7](2002)对产自巴西南部的代茶饮料植物巴拉圭冬青(*I. paraguariensis*)的叶片性状特征进行比较,结果发现3个居群之间在叶片面积、叶片长度、最大宽度、矩形面积指数和叶质量/面积值等特征上存在显著差异,其矩形面积指数和基角存在正相关。刘国民等人^[8-9]系统观测了苦丁茶冬青 *I. kudingcha* 不同种质材料的茎叶形态学特征。茎的特征包括茎主干形态,分枝与主茎的夹角,一年生茎或小枝的形态以及幼茎(嫩芽中)的形态;叶的特征包括叶序、叶形、叶尖、叶基、叶缘、叶柄、脉序、百叶重、叶长、宽度以及叶长/宽比值等。结果表明,在野生状态下,或在基本不施加强制性整型措施的人工栽培条件下,我国苦丁茶冬青种质资源材料的株型可以归纳为直立型、宝塔形、纺锤形、垂柳形、半椭圆形、球形、匍匐型和半匍匐型等几种类型。另外发现,毛被特征与苦丁茶冬青的不同基因型有关,而与其来源或

收稿日期: 2013-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860048, 30060040)

作者简介: 田建平(1972-),男,湖南澧县人,海南医学院药学院副教授,海南大学农学院2009级博士研究生。

通信作者: 刘国民. E-mail: 13005082258@163.com

原产地所处居群无关,其幼嫩叶片和幼嫩花果常被毛,而成熟叶和成熟果实则很少被毛或无毛。因此,不宜将被毛有无特征作为新种划分或种下类群划分的唯一或至关重要的分类学依据。因此,苦丁茶冬青(*I. kudingcha*)是否应归并为扣树(*I. kaushue*)就有了争议。为了解决冬青属植物是否存在腺体状粘液毛的疑问,GONZALEZ 等人^[10](2009)对9种冬青属植物叶柄的解剖、维管和分泌结构进行了研究,首次发现了3种腺体状粘液毛结构,即存在于叶齿边的标准毛和泪滴形腺体状粘液毛,以及存在于花苞边缘的无柄腺体状粘液毛。根据腺体状粘液毛分泌的蛋白质类型差异,可以将9种冬青属植物分为2大类。VÂNIA 等人^[11](2009)对源于巴西南部 and 阿根廷的巴拉圭冬青(*I. paraguariensis*)30个样品的叶片特征(形态和脉序)进行了形态计量学研究。结果显示,叶片长度、宽度、叶片基部到叶片最大宽度间的长度等结果差异很大,而叶片面积和叶柄长度,及整个叶片长度与最大宽度之值、叶片基部到最大宽度长度与整个叶片长度之值、脉序等数据差异较小。

1.1.2 植物形态微观结构特征 现有冬青属植物微观结构特征研究主要集中于利用扫描电镜和光学显微镜对叶表皮和果实特征研究方面。在国内,王玉国等人^[12-13]利用扫描电镜对扣树(*I. kaushue*)、苦丁茶冬青(*I. kudingcha*)、大叶冬青(*I. latifolia*)、龙里冬青(*I. dunniana*)、五棱苦丁茶(*I. pentagona*)5种植物的叶表皮和果实微形态特征进行了研究,结果表明,扣树和苦丁茶冬青两者在叶表皮特征和果实是否具有指状毛附属物方面都具有很大差异,因此,不支持扣树和苦丁茶的合并。苦丁茶和五棱苦丁茶在叶表皮和果实微形态特征方面也具有很大的差异,因而支持五棱苦丁茶新种的成立结论。李相传等人^[14](2010)利用光学显微镜对102种冬青属植物的叶表皮特征进行了观察,结果表明,共同点是均有正常气孔器和大气孔器,不同点是叶表皮细胞的大小、形状、垂周壁形态和表面纹饰以及表皮毛的有无和长度有较大差异。这说明冬青属的叶表皮特征具有一定分类学意义,可为该属植物的系统分类和系统演化研究提供可靠证据。国外 SPEGAZZINI 等人^[15](2002)从药材角度对6种冬青属植物(*I. paraguariensis* var. *paraguariensis*, *I. dumosa* var. *dumosa*, *I. dumosa* var. *guaranina*, *I. brevicuspis*, *I. theezans*, *I. argentina*)的叶解剖结构和表皮参数(比例大小、气孔指数和栅栏比)进行了比较研究,据此提出了原材料质量控制的标准。

1.1.3 花粉形态研究 MARIA 等人^[16](2006)利用扫描电镜对4种冬青属植物(*I. dumosa*, *I. integerrima*, *I. theezans* var. *acrodonta*, *I. theezans* var. *grandifolia*)的花粉形态进行了研究,结果表明这些花粉均为3沟型,花粉外壁有刺,且赤道面有空隙存在。

1.1.4 染色体数目 冬青属植物的染色体数目研究较少,到目前为止,只有大约5%的冬青属物种的染色体数目被研究过。GREIZERSTEIN 等^[17](2004)报道了8种产自阿根廷和巴西的冬青属植物染色体数目,其中7种植物(*I. taubertiana*, *I. integerrima*, *I. pseudobuxus*, *I. paraguariensis*, *I. brevicuspis*, *I. dumosa* 和 *I. theezans*)的染色体 $2n = 40$,另一种植物 *I. argentina* 的染色体 $2n = 80$ 。

1.2 植物化学分类学在冬青属系统学研究中的应用

1.2.1 基于高效液相色谱法基础上的化学分类法 随着化学分析技术的快速进步,利用植物化学分类学方法进行冬青属系统学研究取得了很大的进展。罗集鹏和毕培曦^[18](1997)利用高效液相色谱法对岗梅(*I. arprella*)、鼠李叶冬青(*I. aculeolata*)、毛冬青(*I. pubescens*)、亮叶冬青(*I. viridis*)、铁冬青(*I. rotunda*)、冬青(*I. chinensis*)和枸骨(*I. cornuta*)进行分类。结果表明,上述7种冬青属中草药经用正己烷和氯仿脱脂后的甲醇提取液的高效液相色谱图存在着明显的种间差异,主要表现在主成分的保留时间、相对峰面积和主要色谱峰的紫外光谱特征;主要色谱峰的紫外光谱峰/谷比值存在种间差异。说明该法可有效用于冬青属植物分类。EDWARDS 和 BENNETT^[19](2005)通过利用 HPLC 方法对2种冬青属植物 *I. vomitoria* 与 *I. cassine* 所含的甲基黄嘌呤类生物碱成分进行比较,结果发现 *I. vomitoria* 所含的甲基黄嘌呤类生物碱含量要显著高于 *I. cassine*,其中,前者所含的生物碱主要成分为咖啡因,因此 *I. vomitoria* 是一种质量较好的茶饮品来源,同时也说明甲基黄嘌呤类生物碱在不同冬青属植物中其含量存在较大差异。

1.2.2 基于核磁共振的代谢组学化学分类法 CHOI 等人^[20](2005)利用代谢组学研究了11种冬青属植物(*I. argentina*, *I. brasiliensis*, *I. brevicuspis*, *I. dumosa* var. *dumosa*, *I. dumosa* var. *guaranina*, *I. integerrima*, *I. microdonta*, *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*, *I. pseudobuxus*, *I. taubertiana* 和 *I. theezans*)的水提物和有机溶剂提取物的 NMR 光谱和多变量数据。通过主成分分析和(1)HNMR 光谱进行分类,可对上述样品

进行有效鉴别。其中,有效鉴别成分主要是熊果苷、咖啡因、可可碱和苯丙素。KIM 等人^[21](2010) 以上述同样的 11 种冬青属植物为材料,在代谢物组学基础上,利用所获得的一维和二维(1) HNMR 光谱并进行适当变换,并用主成分分析方法进行了深入研究,结果表明,可将上述 11 种植物分为 4 组: A 组即巴拉圭冬青(*I. paraguariensis*) 特征是具有较高含量的黄嘌呤和酚类物质,后者含苯丙素和黄酮类化合物; B 组两种植物(*I. dumosa* var. *dumosa* 和 *I. dumosa* var. *guaranina*) 特征是含有齐墩果烷型皂甙; C 组 4 种植物(*I. brasiliensis* *I. integerrima* *I. pseudobuxus* 和 *I. theezans*) 特征是含有较高含量的熊果苷和二咖啡酰奎尼酸; D 组 4 种植物(*I. argentina* *I. brevicuspis* *I. microdonta* 和 *I. taubertiana*) 特征是含有较高含量的乌苏酸型皂苷。这说明,利用代谢组方法对冬青属植物进行化学分类是可行的。

1.2.3 基于人工智能方法基础的化学分类法 苏薇薇等人^[22](1998) 通过利用模式识别中的非线性映照法,以苦丁茶药材的 20 种大量及微量元素含量为分类特征进行鉴别分类,所得结果与生药学鉴定一致。此外,苏薇薇等人^[23](1998) 还利用反向传播人工神经网络模式识别技术,对 78 个苦丁茶样品的高效液相色谱数据进行处理,结果表明,应用该技术可对苦丁茶样品进行快速鉴别和分类。

1.2.4 基于光谱法基础上的化学分类法 除上述方法外,光谱法也可简便快速地应用于冬青属植物分类,COZZOLINO 等^[24](2010) 利用近红外(NIR) 光谱结合多元数据分析方法,成功地区分了不同地理来源的巴拉圭冬青。在 PCA 的基础上,他们分别用最小二乘法判别分析(PLS-DA) 和线性判别分析(LDA) 对频谱进行分析,结果发现,线性判别分析(LDA) 可完全将上述不同来源植物分开,而最小二乘法判别分析(PLS-DA) 分类也达到了 76% 的成功率。庞涛涛等人^[25](2010) 利用共有峰率和变异峰率 2 个指标,以不同苦丁茶样品的红外指纹图谱为标准,计算出所测样品相对于标准品的共有峰率和变异峰率。按照共有峰率的大小,建立了不同的共有峰率和变异峰率双指标序列分析方法。该方法可以准确地地区分不同产地和不同级别的苦丁茶,可以对多个样品进行方便可靠鉴别。

1.3 分子生物学在冬青属植物系统发育研究中的应用 MANEN 等人^[26](2002) 以化石记录、地理和时间数据为对照,通过对基于 3 个不同位点质体(*atpB-rbcL* 基因间隔区, *trnL-trnF* 基因和 *rbcL* 序列) 与基于 2 个不同的位点核(核糖体和 5S RNA 间隔) 基础上的冬青属系统发育研究结果进行比较,结果发现,质体系统发育与现有物种的地理分布密切相关,但核系统发育与质体系统发育之间高度不一致,说明这可能是频繁谱系间杂交的结果所致。

PHILIPPE^[27](2000) 利用叶绿体 *atpB-rbcL* 基因间隔区对属于冬青科的 115 种冬青属植物和山地冬青进行了测序。此外,还获得了 47 个选定物种的 *rbcL* 序列。结合化石记录的文献及分子数据进行分析,结果表明,早在白垩纪晚期之前冬青属植物已经是世界性分布。核苷酸替换率的相关实验表明,由于基本分支的灭绝,现存的冬青属物种并不能代表该属的整体谱系(entire lineage); 现存物种的共同祖先可能出现在上第三纪; 非洲产冬青属植物与亚洲产冬青属物种有密切亲缘关系。夏威夷和塔希提产 *I. anomala* 与美洲产物种有亲缘关系。而 *I. perado* 与 *I. canariensis* (均产自非洲马卡罗尼西亚地区) 其亲缘关系显著不同,前者与欧亚种有关,而后者亲缘关系还不清楚。根据实验结果,冬青科可分为 4 组,每 1 组各具其地理或生态特点。

考虑到同源序列的存在和可能的定位参数影响,ALEXANDRA 等人^[28](2005) 单独利用核糖体内部转录间隔区(ITS) 序列数据或结合 AFLP 数据对南美州南部之间的冬青属代表性植物间的亲缘关系进行了研究。为探讨系统发育假说的稳定性,他们采用 15 个替代模型进行灵敏度分析。分析结果表明,*I. argentina* *I. brasiliensis* *I. brevicuspis* *I. integerrima* 和 *I. theezans* 聚成一类,而 *I. dumosa* 和 *I. paraguariensis* 聚成另一类,且与第一类亲缘关系距离较远。该实验结果表明,分子标记所得的系统发育的研究结果与传统分类的研究结果不一致。

MANEN 等人^[29](2010) 通过 2 种核分子标记(ITS 和 *nepGS*) 和 3 种质体分子标记(*rbcL*, *trnL-F* 和 *atpB-rbcL*) 的分析,探讨了 108 种冬青属植物的历史和多样性特征。结果发现,核和质体系统发育树间也呈高度不一致的特征,与质体系统发育树相比较,核系统发育树的结果更加符合传统的分类学结果。另外,距离较远的谱系间有杂交和基因渗入现象的存在,说明冬青属植物间几无生殖性障碍。

根据 47 种冬青属植物叶绿体和核 DNA 序列,并结合其形态特征,LOIZEAU^[1](2005) 重建了冬青属

植物的系统发育树。结果表明,质体系统发育与现存物种的地理分布密切相关。然而,质体系统发育树和核系统发育树两者表现并不一致,这可能是由于频繁的谱系间杂交引起。

鉴于冬青属植物存在质体和细胞核系统发育不一致的规律,而且细胞核分子标记在种间和种内个体间常有多态性现象的发生,MANEN^[30](2004)以2种亲缘关系较远的植物 *I. perado*(13株)和 *I. canariensis*(27株)为材料,利用1个质体分子标记(atpB-rbcL间隔区)和2种核分子标记(核糖体ITS和核编码的质体谷氨酰胺合成酶nepGS)对其系统进化关系进行了分析。质体分子标记结果表明,其在种内稳定,可用于鉴定物种。但核分子标记在 *I. perado*中保守而在 *I. canariensis*中具有高度的多态性。引起多态性的原因很多,如 *I. canariensis*中ITS序列中存在的假基因和重组现象也说明了这种多态性。但最可能是以往和最近的相异基因型渐渗现象所引起。

ALESSANDRA等人^[31](2009)利用叶绿体psbA-trnH基因间隔、简约法和贝叶斯分析方法对产自南美洲的冬青属植物的系统发育位置进行了研究。结果显示,虽然冬青属内psbA-trnH基因间区进化缓慢。通过结合atpB-rbcL基因间区数据发现,psbA-trnH区现存的间隔区可用于构建冬青属植物的系统发育树。系统发育树的拓扑结构表明,系统分支与其地理分布密切相关。

在国内,冬青属植物分子系统学方面的研究也取得了一定进展。张凤琴等^[32](2004)利用RAPD分子标记方法对22份冬青属苦丁茶植物不同物种的遗传变异进行了研究。利用27个多态性良好的引物扩增出占总体绝大多数比例的多态性带432条。聚类树状图分析结果表明,22份供试材料分成4类,第1类为 *Ilex pentagona*,第2类为 *I. kudingcha*,第3类为 *I. latifolia*,第4类为 *I. cornuta*;实验结果说明,RAPD分子标记的结果可作为判断冬青属苦丁茶种质资源材料的起源地域、遗传差异、亲缘关系以及种级水平和种下分类鉴定的重要参考依据。付乾堂^[33](2004)同样采用RAPD分子标记技术,对共包含72份材料的苦丁茶冬青遗传多样性及其与近缘种五棱苦丁茶(*I. pentagona*)遗传关系进行了研究,其结果与张凤琴的结果相同。

钱永生等人^[34](2008)采用RAPD和AFLP技术,对10种冬青属植物的种间遗传多样性进行了研究。结果表明,在RAPD分析中其条带多态率为98.63%。在AFLP分析中,3对选择性引物组合均扩增出了丰富的多态性片段。UPGMA类平均法聚类结果显示,冬青(*I. chinensis*)和代茶冬青(*I. vomitoria*),木姜冬青(*I. litseifolia*)和浙江冬青(*I. zhejiangensis*)以及光枝刺缘冬青(*I. hylonoma* var. *glabra*)与毛枝三花冬青(*I. triflora* var. *kanehirai*)之间的亲缘关系最近。

王小精^[35](2008)利用ISSR技术对冬青属苦丁茶6个物种以及形态居间类型材料共51份种质材料进行了研究。根据筛选的18条有效引物进行检测,发现多态位点318个,其PPB为90.6%。基于ISSR分子标记和UPGMA法聚类结果表明:6种冬青属苦丁茶植物和一类“中间类型”材料的遗传差异较大,遗传距离在0.077 1~0.763 1之间,平均遗传距离为0.415 2。其中苦丁茶冬青和五棱苦丁茶分别单独聚类,该结果与利用RAPD分子标记的结果相似,说明ISSR分子标记的在冬青属苦丁茶种质资源材料的遗传差异、亲缘关系以及种级水平和种下分类鉴定方面的可行性。周喜军等^[36](2009)利用ISSR分子标记对36种冬青属植物的种间关系进行了研究,筛选出12条有效引物,多态性片段占98.7%;UPMGA类平均聚类法进行遗传相似系数分析并构建了系统树。结果表明,36种冬青属植物在遗传相似系数0.64处明显聚为落叶类和常绿类。这证明用ISSR分子标记对冬青属植物进行系统进化和亲缘关系分析是可行的。

2 分子生物学在冬青属植物遗传多样性及其他相关领域中的应用

2.1 分子生物学在冬青属植物遗传多样性研究中的应用 章建红等^[37](2011)以26种冬青属植物种质资源为研究材料,利用RAPD和AFLP技术研究了物种间遗传多样性以及亲缘关系。结果表明,2种方法均能得到大量的具有较高多态率的有效多态性条带,两者聚类结果较一致。虽然其结果与冬青属植物传统的分类结果有些出入,但总体上两者结果比较吻合。其中AFLP分子标记因具有更高灵敏度和多态性而更适应于冬青属植物遗传多样性分析。

冷欣等^[38](2005)利用ISSR分子标记对属于舟山群岛特有珍稀濒危植物的6个全缘冬青(*I. integra*)种群(含5个自然种群和1个栽培种群)共57个个体进行了遗传多样性分析。结果发现,多态性条带多

态位点百分比(PPL)为57.7%。 $Nei's$ 基因多样性(HE)为0.153,说明其遗传多样性偏低。5个自然种群遗传分化系数 $GST=0.316$,其遗传分化程度较高。全缘冬青种群间地理距离与遗传距离具有正相关性($R=0.649, P<0.05$),岛屿间地理隔离对种群间遗传分化产生了较显著的影响。

TORIMARU等^[39](2003)利用RAPD标记方法对1公顷地域中*I. leucoclada*各个小块内的克隆多样性和遗传变异进行了研究,结果发现,在小块中的居群呈现出高度的克隆多样性(平均Simpson's $D=0.89$),其原因可能是幼苗补充更新和体细胞突变等导致;而小块间的RAPD表型变异也高度显著($\Phi_{ST}=0.316$),但小块间的配对遗传距离与其地理距离没有关联。基于遗传距离基础上的聚类分析结果则显示小块间无明显的分支存在,说明小块间不存在空间遗传结构。

LUCIANE等^[40](2000)利用RAPD分子标记方法对产自南美巴拉圭冬青(*I. paraguariensis*)4个居群的遗传多样性进行了研究。结果显示,15个引物产生了341个不同的条带,平均每个居群的遗传多样性为0.163。居群内的变异较大,个体到居群的平均距离为0.392,而居群间的距离为0.433,表明居群间分化程度较低,遗传变异主要发生在居群内,而居群间的变异只占15%。

2.2 基因组学研究和其他分子标记方法在冬青属植物性别检测中的实践

2.2.1 基因组学研究在冬青属植物性别检测中的实践 为寻求育种,ALEXANDRA^[41](2010)开发了一种早期性别检测的分子方法,他通过对雄性和雌性巴拉圭茶(*I. paraguariensis*)全基因组筛查,探讨了性别相关基因差异的发生机理。ALEXANDRA利用SSCP分析检测和序列分析,并结合倒数差异分析(RDA),发现分离的片段可分为3个区域,第1类区域所在片段对可用的沉积序列显示出虚假的亲合力,可以认为其专属于巴拉圭茶。第2类为细胞器DNA和核糖体序列。第3类涉及克隆类似以反转录转座子保守结构域(RNaseH,整合酶和/或从至少两个不同克罗莫结构域血统的Ty3/gypsy反转录转座子和一个TY1/copia反转录因子,此区域与性别有关,此外,此区域在茄科、番木瓜科、杨柳科同样也被发现。通过对被称为巴拉圭茶反转录元件的整合酶结构域系统发育分析,说明其属于克罗莫结构域的删除谱系。

2.2.2 RAPD-SCAR分子标记方法在冬青属植物性别检测中的实践 罗轶奇等^[42](2012)利用RAPD-SCAR双重分子标记技术,对苦丁茶冬青的性别进行了早期鉴定,即先利用RAPD分子标记方法鉴别与性别性状密切有关联的RAPD标记(特异的RAPD条带),再通过回收特异条带,克隆和测序,以此设计出一对较长的SCAR引物,进行PCR扩增和分析,结果筛选出2个雄性特异标记为S164-900和S191-800,分别为928 bp、824 bp的核苷酸特定序列,其中S164-900标记成功转化为SCAR标记,再次扩增后所有雄性种质材料中均能扩增出SK-928条带,而96.7%雌性种质材料中无SK-928条带,可见SCAR标记技术具有以下特点:操作简便、快速,实验成本低廉,适合对大批量性别不明确的苦丁茶冬青样品进行性别早期鉴定,在生产上有推广应用前景。

2.3 分子标记在叶绿体基因组研究上的应用 RENDELL等人^[43](2003)利用RFLPs和微卫星分子标记方法对*I. aquifolium*叶绿体基因组的变异进行了研究,结果发现不同居群间的差异很高($GST=0.595$),植物亲缘地理结构NST为0.697,显著大于前者。其2个叶绿体谱系被认为是来自欧洲南部(西班牙、意大利和巴尔干半岛)这一公认的冰河期避难场所。并认为在种子流有限的条件下雌雄异株特征是促进避难和重建居群的有效因素。

2.4 分子标记在冬青属植物鉴定中的应用

2.4.1 分子标记在鉴定冬青属植物杂交种中的作用 为了确认韩国产冬青属植物杂交种*I. × wandoensis*是否由*I. comute*和*I. integra*两者杂交而来,同时也为解决因外在形态特征连续而引起的分类学问题,SON等人^[44](2009)对核糖体DNA的ITS数据进行了分析,个体显示了ITS区域内的基因组内的多形型。实验结果表明*I. comute*和*I. integra*两者均有不连续序列的存在,从而证实了*I. × wandoensis*是由*I. comute*和*I. integra*两者杂交而来,而根据ITS区数据分析结果,冬青亚属没有出现严格一致的单谱系树特征。

YOUNG等人^[45](2011)也对杂种*I. × wandoensis*的起源进行了分析,他利用特异性引物对ITS2区域进行了RFLP标记,并对ITS序列进行了分析。结果表明,根据使用Hha I和Hae III限制性酶基础上的RFLP分析和测序,确定了杂种*I. × wandoensis*的起源。因此,使用特异引物,对核糖体ITS2区域RFLP分析,可有效用于天然杂交种和基因渗入现象的分析。

NAM 等人^[46] (2006) 利用 RAPD 分子标记,发现了产自韩国两个不同地区的 *I. × wandoensis* 杂交居群,这些假定父本物种的标记条带也同时在上述居群中发现,并证实其是杂种。另外通过使用多位点基因型数据和基于模型基础上的聚类方法也肯定了该植物的形态多样性。

2.4.2 基于 ITS 序列对冬青属不同物种间的鉴别 TONG^[47] (2012) 在 ITS2 序列的基础上建立了岗梅变种和相关的冬青属药用植物的分子鉴定方法,通过使用软件 MEGA 构建系统发育树,根据扩增的 ITS2 序列的多序列比对。结果得到 254 bp 的 ITS2 片段,并发现了不同物种间有 85 个不同的碱基位点,说明 ITS2 区域可被用于鉴别冬青属不同物种。

3 结 语

作为饮料和药用植物的重要来源,冬青属是一类具有丰富多样性的群体。虽然其物种数目繁多,但由于其分类难度较大,现在系统学研究比较深入的物种数目很少。作为分子系统学研究的重要手段,筛选合适的分子标记是今后的重要内容。另外,在实践中还存在如扣树 (*I. kaushue*) 与苦丁茶冬青 (*I. kud-lingcha*)、华中枸骨 (*I. centrochinensis*) 与霍山冬青 (*I. houshanensis*) 是否归并等争议性问题,这对苦丁茶植物的资源利用造成了巨大的麻烦,同时,在冬青属苦丁茶中也可能存在杂交种。因此,应借助系统学方法从不同角度加以综合深入研究,以进一步为经济建设服务。

参考文献:

- [1] LOIZEAU P A, BARRIERA G, MANEN J F, et al. Towards an understanding of the distribution of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) on a world-wide scale [J]. Biol. Skr. 2005 55: 501 - 520.
- [2] 陈书坤, 俸宇星. 中国植物志·第 45 卷(第 2 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] 陈书坤, 马海英, 俸宇星, 等. 中国植物志·第 11 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [4] HAO D CH, GU X J, XIAO P G, et al. Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2013 3(1): 8 - 19.
- [5] 徐炳声. 中国植物分类学中的物种问题 [J]. 植物分类学报, 1998 36(5): 470 - 480.
- [6] 俸宇星, 陈书坤, 赵瑞峰, 等. 中国冬青属苦丁茶名实辨证 [J]. 植物分类学报, 1998 36(4): 353 - 358.
- [7] COELHO G C, MARIATH J E A, SCHENKEL E P. Populational diversity on leaf morphology of mat (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology 2002 45(1): 47 - 51.
- [8] 刘国民, 李娟玲, 陈榆, 等. 我国苦丁茶冬青种质资源的形态学研究 I - 茎叶的形态学研究 [J]. 贵州科学, 2004 22(3): 9 - 24
- [9] 俸宇星, 陈书坤, 赵瑞峰, 等. 中国冬青属苦丁茶名实辨证 [J]. 植物分类学报, 1998, 36(4): 353 - 358.
- [10] GONZALEZ A M, TARRAGÓ J R. Anatomical structure and secretion compounds of colleters in nine *Ilex* species (Aquifoliaceae) from southern South America [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2009, 160: 197 - 210.
- [11] VÂNIA H T, ALEXANDRO C, PAULO A F, et al. Morphometry and foliar venation origins of maté (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) (Aquifoliaceae) [J]. Acta Scientiarum Biological Sciences 2009, 31(4): 433 - 437.
- [12] 王玉国, 韦发南. 药用植物苦丁茶与近缘种的微形态研究——叶表皮特征的扫描电镜观察 [J]. 广西植物, 2000, 20(3): 229 - 232.
- [13] 王玉国, 韦发南. 苦丁茶与近缘种的果皮微形态特征及其分类学意义 [J]. 植物研究, 2001 21(1): 47 - 50.
- [14] 李相传, 孙柏年, 林志成, 等. 冬青属植物的叶表皮特征及其分类学意义 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2010 46(4): 13 - 21, 29.
- [15] SPEGAZZINI E D, CASTRO M T, CARPANO S M, et al. Taxonomic determination of therapeutic Argentine species of *Ilex* [J]. Pharmaceutical Biology, 2002, 40(1): 2 - 15.
- [16] MARIA A V, ANGELA M S C, HIROKO M W. Estudo polínico das espécies de Aquifoliaceae, Euphorbiaceae, Lecythidaceae, Malvaceae, Phytolaccaceae Portulacaceae ocorrentes na restinga da Ilha do Cardoso (Cananéia, SP, Brasil) [J]. Revista Brasil. Bot., 2006 29(1): 145 - 162.
- [17] GREIZERSTEIN E J, GIBERTI G C, POGGIO L. Cytogenetic studies of Southern South-American *Ilex* [J]. Caryologia, 2004, 57(1): 19 - 23.
- [18] 罗集鹏, 毕培曦. 七种冬青属中草药的高效液相色谱法鉴别 [J]. 广东药学院学报, 1997, 13(4): 211 - 214.

- [19] EDWARDS A L , BENNETT B C. Diversity of methylxanthine content in *Ilex cassine* L. and *Ilex vomitoria* Ait.: assessing sources of the north american stimulantcassina [J]. Economic Botany 2005 , 59(3) : 275 – 285.
- [20] CHOI YH , SERTIC S , KIM HK , et al. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis [J]. J. Agric. Food Chem. , 2005 53(4) : 1237 – 45.
- [21] KIM HK , SAIFULLAH KS , WILSON EG. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. [J]. Phytochemistry , 2010 , 71(7) : 773 – 784.
- [22] 苏薇薇 , 陈继慈. 中药苦丁茶的化学模式识别研究(I) [J]. 中药材 , 1998 (3) : 115 – 119.
- [23] 苏薇薇 , 吴忠 , 何新新. 中药苦丁茶的化学模式识别研究(II) [J]. 中药材 , 1998 (4) : 170 – 173.
- [24] COZZOLINO D , RESTAINO E , FASSIO A. Discrimination of yerba mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil.) samples according to their geographical origin by means of near infrared spectroscopy and multivariate analysis [J]. Sens. & Instrumen. Food Qual. 2010(4) : 67 – 72.
- [25] 庞涛涛 , 杜黎明. 苦丁茶红外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析法 [J]. 光谱学与光谱分析 2007 27(3) : 486 – 489.
- [26] MANENJ F , BOULTER M C , GRAVEN Y N. The complex history of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae) : evidence from the comparison of plastid and nuclear DNA sequences and from fossil data [J]. Plant Syst. Evol. 2002 , 235: 79 – 98.
- [27] PHILIPPE C D , MARIA P M , LOIZEAU P A , et al. Molecular phylogeny and biogeography of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae) [J]. Annals of Botany 2000 , 85: 111 – 122.
- [28] ALEXANDRA M G , GUSTAVO C G , LIDIA P. Molecular analyses of the genus *Ilex*(Aquifoliaceae) in Southern South–America , evidence from AFLP and its sequence data [J]. American Journal of Botany 2005 92(2) : 352 – 369.
- [29] MANEN J F , BARRIERA G , LOIZEAU P A , et al. The history of extant *Ilex* species (Aquifoliaceae) : evidence of hybridization within a Miocene radiation [J]. Mol Phylogenet Evol. 2010 , 57(3) : 961 – 977.
- [30] MANEN J F. Are both sympatric species *Ilex perado* and *Ilex canariensis* secretly hybridizing? Indication from nuclear markers collected in Tenerife [J]. BMC Evolutionary Biology 2004(4) : 46 – 57.
- [31] ALESSANDRA S S , SUZANA S C , MANEN J F , et al. New information for *Ilex* phylogenetics based on the plastid psbA-trnH intergenic spacer (Aquifoliaceae) [J]. Botanical Journal of the Linnean Society 2009 , 159(1) : 182 – 193.
- [32] 张凤琴 , 刘国民 , 周鹏 , 等. 用 RAPD 技术探讨冬青属苦丁茶的遗传差异、亲缘关系与分类地位 [J]. 云南植物研究 , 2004 26(6) : 637 – 644.
- [33] 付乾堂. 苦丁茶冬青的遗传多样性及与近缘种的遗传关系研究 [D]. 海口: 海南大学 2004.
- [34] 钱永生 , 王慧中 , 施农农 , 等. 10 种冬青属植物遗传多样性 RAPD 和 AFLPs 分析 [J]. 分子细胞生物学报 2008 41(1) : 35 – 43.
- [35] 王小精. 应用 ISSR 技术探讨冬青属苦丁茶种质资源的遗传多样性和分类地位 [D]. 海口: 海南大学 2008.
- [36] 周喜军 , 张冬梅 , 罗玉兰 , 等. 冬青属植物的 I SSR 标记分析及其应用 [J]. 河南农业大学学报 2009 43(2) : 196 – 200.
- [37] 章建红 , 高云振 , 张斌 , 等. 26 种冬青属植物遗传多样性分析 [J]. 西北植物学报 2011 31(3) : 504 – 510.
- [38] 冷欣 , 王中生 , 安树青 , 等. 岛屿特有种全缘冬青遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生物多样性 2005 , 13(6) : 546 – 554.
- [39] TORIMARU T , TOMARU N , NISHIMURA N , et al. Clonal diversity and genetic differentiation in *Ilex leuococlada* M. patches in an old-growth beech forest [J]. Molecular Ecology , 2003 , 12(4) : 809 – 818.
- [40] LUCIANE G , SUZANA C M. Genetic variation in natural populations of mate \hat{A} (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. , Aquifoliaceae) using RAPD Markers [J]. Heredity 2000 , 84 : 647 – 656.
- [41] GOTTLIEB A M , POGGIO L. Genomic screening in dioecious “yerba mate” tree (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill. , Aquifoliaceae) through representational difference analysis [J]. Genetica 2010 , 138: 567 – 578.
- [42] 罗轶奇. 与苦丁茶冬青性别相关的 RAPD-SCAR 标记的研究 [D]. 海口: 海南大学 2012.
- [43] RENDELL S , ENNOS R A. Chloroplast DNA diversity of the dioecious European tree *Ilex aquifolium* L. (English holly) [J]. Mol. Ecol. 2003 , 12(10) : 2681 – 2688.
- [44] SON S W , KIM I H , KIM K J. Molecular evidence for the hybridity of *Ilex* \times *wandoensis* and the phylogenetic study of Korean *Ilex* based on ITS sequence data [J]. Genes & Genomics 2009 31(1) : 53 – 63.
- [45] YOUNG H J , PICTON D , PARK J O , et al. Molecular evidence for the interspecific hybrid origin of *Ilex* \times *wandoensis* [J]. Hort. Environ. Biotechnol. 2011 , 52(5) : 516 – 523.
- [46] TEE N S , XEAU S H , PARK J O , et al. Molecular evidence for hybridization of *Ilex* \times *wandoensis*(Aquifoliaceae) by RAPD analysis [J]. Journal of Plant Biology , 2006 , 49(6) : 491 – 497.

[47] TONG J Y , HUANG Q L , MA X Y et al. Molecular identification of *Ilex asprella* var. *asprella* with other 7 species in the genus *Ilex* based on ITS2 sequence [J]. *Medicinal Plant* 2012 3(3) : 45 – 48.

Advances in Research of Systematics and Genetic Diversity of *Ilex* L.

TIAN Jianping^{1 2 3} , LI Juanling⁴ , HU Yuanyan⁵ , LIU Guomin^{1 2}

(1. The Kudingcha Research Institutes of Hainan University , Haikou 570228 , China; 2. College of Agronomy , Hainan University , Haikou 570228 , China; 3. Department of Pharmacy , Hainan Medical College , Haikou 571101 , China; 4. College of Horticulture and Landscaping , Hainan University , Haikou 570228 , China; 5. Ministry of Education Key Laboratory for Tropical Bioresources , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: The research and development in systematics and genetic diversity of *Ilex* L. in the last 10 years were reviewed in this paper , including plant morphology , taxonomy , molecular phylogenetics , genetic diversity , etc.

Key words: *Ilex* L. ; aquifoliaceae; systematics; genetic diversity; new developments

(上接第 361 页)

Floristic Character and Geographical Distribution of *Ardisia* (Primulaceae) in Hainan Island

WANG Jun¹ , ZHENG Xilong² , CHEN Yizhang³ , DAI Haofu¹

(Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops , Ministry of Agriculture , Haikou 571101 , China; Institute of Medical Plants , Chinese Academy of Medical Sciences , Xinglong , Wanning 571533 , China; South China Botanical Garden , Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510650 , China)

Abstract: The average cluster method (UPGMA) was used to analyze the horizontal distribution of *Ardisia* plants in the cities or counties of Hainan Island. As a result , the central region of Hainan Island is the most abundant area for *Ardisia* , especially in Baoting County. The vertical distribution of *Ardisia* was concentrated in the altitudes ranging from 400 to 1 000 m , and 7 species were distributed narrowly. *Ardisia* was distributed in two types and two subtypes , but mainly in the subtype from Vietnam (or Indo-Chinese Peninsula) to S. China (or SW. China) , followed by the type of Endemic to China. The *Ardisia* plants in Hainan Island had close relationships with those in the neighboring provinces Guangdong and Guangxi , the most similar to those in Guangdong and the most common with those in Guangxi. The *Ardisia* plants in Hainan Island had significant relation with those in the neighboring area of Indo-Chinese peninsula , but not obvious relation with those in Malaysia.

Key words: *Ardisia*; geographical distribution; floristic analysis; Hainan Island