

## 利用 ITS(nrDNA) 和 *matK*(cpDNA) 探讨姜族植物的系统发育

郑曼莉<sup>1,2</sup>, 夏永梅<sup>3</sup>

(1. 中国科学院 西双版纳热带植物园 植物进化生态学实验室, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049;

3. 中国科学院 西双版纳热带植物园 植物系统与保护生物学实验室, 云南 昆明 650223)

**摘要:** 姜族是姜科中最大的族, 包括 25 个属, 与舞花姜族共同组成姜亚科. 本研究应用 ITS *matK* 片段, 通过最大简约法(Maximum Parsimony)、Bayesian 推断(Bayesian Inference)、最大似然法(Maximum Likelihood)对获得的序列进行联合矩阵分析, 构建基因树, 对姜族与舞花姜族之间的关系及族内类群间的亲缘关系进行探讨. 系统树的拓扑结构显示: ① 姜亚科为单系类群. ② *Distichochlamys* 与 *Scaphochlamys*、象牙参属与距药姜属、直唇姜属与喙花姜属是姐妹类群. ③ 姜花属、象牙参属、山奈属、姜属是单系类群. ④ 姜黄属与 *Paracaulleya*、*Smitha-tris*、*Hitchenia* 形成并系类群. ⑤ 凹唇姜属与拟姜黄属成并系类群. ITS 和 *matK* 片段对姜族内部深分支系统关系的解决力尚有不足, 建议今后寻找新的分子标记进行更为深入的研究.

**关键词:** 姜族; 姜科; ITS; *matK*; 系统发育

中图分类号: Q 949; Q 75 文献标识码: A 文章编号: 0258-7971(2010) S1-0426-07

姜科是热带、亚热带分布的植物类群, 主要分布于南亚、东南亚和太平洋岛屿. 全世界目前有 53 属, 约 1 500 种. 我国有 22 属, 200 余种, 主要分布于东南和西南各省区<sup>[1-2]</sup>.

在经典分类学研究中, 姜科的分类系统主要有 3 个, 分别是 Schumann 系统<sup>[3-4]</sup>、Holtum 系统<sup>[5]</sup>和 Burt 系统<sup>[6]</sup>. 姜科植物由于花期短暂<sup>[7]</sup>, 花部形态特征变异幅度小<sup>[1]</sup>, 不同类群间易存在性状交叉<sup>[8]</sup>, 分类研究存在困难. Burt<sup>[6]</sup>的检索表自建立后的几年中也被证明是不完善的.

姜族(Zingibereae)是姜科的一个重要类群, 其分类系统在历史上变动较大. 退化雄蕊(staminode)是姜科植物的一个常用分类性状, 通常具 2 或 4 枚, 其中内轮的 2 枚联合成唇瓣(labellum), 外轮的 2 枚称侧生退化雄蕊(lateral staminode). 姜科模式属姜属(*Zingiber*) 在 Schumann 系统中位于姜族,

Holtum<sup>[5]</sup>认为姜属的侧生退化雄蕊呈裂片状(lobe), 与姜族中其它侧生退化雄蕊通常较小或不存在的属有区别, 姜属在此性状上更接近姜花族(Hedychieae), 于是将其从姜族中提出放入姜花族, 而将原来的姜族更名为山姜族(Alpinieae). 后来 Burt 和 Olatunji<sup>[6]</sup>认为姜属药隔附属体突出在花药之上、包裹花柱、叶柄肿胀、维管束具厚角组织, 这些特点与姜花族不同, 于是将姜属独立成为姜族.

近年来, 随着分子系统学的发展, Kress 等<sup>[8]</sup>运用 nrDNA ITS 和 cpDNA *matK* 序列对姜科 4 族 41 属 104 种的植物进行系统发育研究, 构建了新的姜科分类系统. 姜族被重新划分, 包括了 Burt 系统中的姜族、姜花族以及直唇姜属(*Pommereschea*)、喙花姜属(*Rhynchanthus*)、*Nanochilus* 和 *Stadiochilus*, 共计 25 个属. 并界定了新姜族植物的共同特征: 植

\* 收稿日期: 2010-05-07

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2007C111M).

作者简介: 郑曼莉(1984-), 女, 云南人, 硕士, 主要从事植物系统发育方面的研究.

通讯作者: 夏永梅, 女, 研究员, 主要从事植物系统发育、生物地理方面的研究, E-mail: xiaym@xtbg.ac.cn.

株二列叶平面与根状茎方向平行、绝大部分属具有大且呈花瓣状的侧生退化雄蕊、子房三室、中轴胎座。在 Kress 等<sup>[8]</sup> 研究的基础上, Ngamriabsakul 等<sup>[9]</sup> 利用 nrDNA ITS 和 cpDNA *trnL*-F 对姜族做了系统发育研究, 由于 *trnL*-F 相对难以扩增<sup>[9]</sup>, 约有 40% 的样品未能测序得到 *trnL*-F 序列。因此在构建期待提高分支支持率的 ITS 和 *trnL*-F 基因联合树时, 仅包括姜族 16 个属 23 个种。

在 Kress 等<sup>[8]</sup> 重建的姜科分类系统中, 姜族与舞花姜族( *Globbeae*) 组成姜亚科( *Zingiberoideae*), 舞花姜族的形态特征是植株个体较小( < 1 m)、具有单室子房、侧膜胎座。大苞姜属( *Caulokaempferia*) 系统位置不能确定暂时被置于姜亚科。目前, 在 Kress 等<sup>[8]</sup> 和 Williams 等<sup>[10]</sup> 的研究中姜亚科显示为单系类群, 但亚科内的姜族与舞花姜族的关系还难下定论。舞花姜族仅在 Kress 等<sup>[8]</sup> 研究中的 ITS 序列最大简约树、Williams 等<sup>[10]</sup> 研究中的 ITS&*matK* 联合序列严格一致性简约树中构成单系分支, 且支持率微弱。

本研究采用 Kress 划定的姜科系统, 在借鉴以往姜科系统发育研究经验的基础上<sup>[11-15]</sup>, 选取姜科分子系统发育研究比较常用的 rDNA ITS( 核糖体内转录间隔区) 和 cpDNA *matK*( 赖氨酸 tRNA 内含子内的成熟酶编码基因) 片段作为基因标记, 对姜族尽可能获得丰富的取样, 构建基因联合树, 探讨姜族的系统发育。本研究包括的种类除姜族 20 个属 57 个种外, 还有舞花姜族 3 个属 10 个种, 大苞姜属 2 个种, 再次探讨姜族、舞花姜族、大苞姜属 3 者关系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 本研究的实验材料采集自中国科学院西双版纳热带植物园姜园, 以及中国的云南、四川、广东 3 个省份, 部分材料来自美国史密森研究院自然历史博物馆。内类群包括姜族 20 个属 57 个种、3 个不定种, 1 变种, 1 疑似杂交种; 大苞姜属 2 个种; 舞花姜族 3 个属 10 个种。根据 Kress 等( 2002) 的研究, 选择与姜亚科近缘的山姜亚科 3 个属各 1 个种作为系统发育研究的外类群。研究中部分种类的序列来源于 GenBank, 实验材料详细信息见表 1。

**1.2 植物总 DNA 的提取** 将野外采集的新鲜叶片用硅胶快速干燥, 采用改良的 3 × CTAB 法<sup>[16]</sup> 提取总 DNA, 用 1% 的琼脂糖电泳检测总 DNA 的质

量和浓度。

**1.3 ITS 和 *matK* 片段的扩增与产物纯化** ITS 和 *matK* 片段扩增均使用 *rTaq* 酶( Takara)。ITS 全序列( 包括 ITS1, 5.8S, ITS2) 扩增引物为 ITS4 和 ITS5<sup>[17]</sup>, *matK* 为 mIF<sup>[8]</sup> 和 *trnK2R*<sup>[18]</sup>。反应体系均为 50 μL, 内含: 5 μL 10 × Buffer, 4 μL MgCl<sub>2</sub> ( 50 mmol/L), 2 μL dNTPs ( 2.5 mmol/L), 正反引物各 2 μL ( 5 μmol/L), 约 25 ng DNA 模板, 3U *rTaq* 酶。PCR 扩增反应在 Veriti 96 孔热循环仪上进行, ITS 扩增反应程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 40 s, 72 °C 45 s, 29 次循环; 72 °C 延伸 10 min。*matK* 扩增反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 2 min, 55 °C 2 min 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 35 次循环; 72 °C 延伸 7 min。产物用 E. Z. N. A<sup>®</sup> Gel - extraction Kit D2500 - 01( OMEGA) 割胶纯化。

**1.4 序列测定** 所有测序工作由上海生工工程技术有限公司和北京天根生化科技有限公司完成。ITS 用 ITS5 直接正向测序。直接测序失败的个体, 对 PCR 产物割胶回收目的片段, 与 pUCm - 18T 载体连接, 转化导入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 采用蓝白斑筛选初步确定阳性克隆, 再次 PCR 后电泳确定为阳性克隆即可测序; *matK* 序列用 mIF、*trnK2R* 及另一自行设计的引物 mR ( 5' - AAC - TAGTCGGATGGAGTAG - 3' ) 测通。

**1.5 数据处理** 利用 SeqMan<sup>[19]</sup> 对序列进行编辑和拼接。对 ITS 和 *matK* 序列数据进行单独及联合序列矩阵构建。采用 BioEdit<sup>[20]</sup> 中的 ClustalW 程序对矩阵进行自动排序, 并进行人工校对。简约法( Maximum parsimony, MP) 分析用 PAUP4.0b10 软件<sup>[21]</sup> 完成, 采用启发式搜索( Heuristic search) 1 000 次抽样, TBR 枝长交换, 每步保留 10 棵树, 获取 50% 一致性系统进化树( 50% majority rule consensus tree); 进行靴带法( Bootstrap analysis) 检测<sup>[22]</sup>, 1 000 次抽样, 根据靴带支持率( bootstrap, BS) 评估各分支可靠性。Bayesian 推断( Bayesian inference, BI) 利用 MrBayes3.1.2 软件<sup>[23-24]</sup> 完成, 用 Modeltest 3.06 软件<sup>[25]</sup> 进行模型选择, ITS 序列矩阵的最适合模型为: TrN + I + G, *matK* 序列矩阵的最适合模型为: K81uf + G; Bayesian 推断起始于一棵随机树, MCMC 链( Markov Chain Monte Carlo chains) 运行 100 万代, 每 100 代取样 1 次, 摒弃前 1 000 次老化样本( burn - in samples), 用剩余样本构建 50% 一致性树并计算各分支的后验概率( pos-

terior probability ,PP) <sup>[23]</sup>. 似然法( Maximum likelihood ,ML) 分析在 <http://www.atgc-montpellier.fr/> 网上进行 ,该网采用 PhyML3.0 软件分析 ,采用靴带法检测 ,1000 次抽样.

## 2 结 果

本研究共获得包括外类群在内共 80 个样品的 ITS 序列 ,72 个样品的 *matK* 序列 ,72 个样品的 ITS & *matK* 联合序列 ,并对这些序列的单独及联合矩阵进行了相关的数据信息统计 ,统计分析的结果见表 2.

运用最大简约法、Bayesian 推断和最大似然法进行系统树的构建 ,其中最大似然法构建的系统树拓扑结构和分支支持率与最大似然法分析结果大致相同. 图 1 2 为最大简约法分析和 Bayesian 推断的 50% 一致性树 ,最大简约法分析中大于 50 的靴带支持率标注在各分支上 ,Bayesian 推断中大于 0.5 的后验支持率标注在各分支上. 较之最大简约法 ,Bayesian 推断的后验支持率值较高 ,树构型( 拓扑结构) 也有所差别. 对系统树的拓扑结构进行分析 ,结果表明:

(1) 整个姜亚科构成一个单系 ,在 MP 树中靴带支持率和 BI 树中后验支持率分别为 100 和 1.00. 姜族在 MP 分析中构成一个分支 ,支持率小于 50. 舞花姜族在 MP 和 BI 树中均未构成一个单系分支 ,族下的 3 个属中 *Gagnepaini* 与 *Hemiorchis* 构成姐妹群分支( BS = 100 ,PP = 1.00) ,舞花姜属( *Globba*) 构成单系分支( BS = 100 ,PP = 1.00) . 舞花姜族的这 2 个分支在 MP 树中依次位于姜亚科基部 ,姜族外部 ,在 BI 树中与姜族的 4 个分支成平行关系.

(2) 姜族构成 2 个分别包括姜花属( *Hedychium*) 和姜黄属( *Curcuma*) 在内的分支 I 和分支 II ( 见图 1 2) ,在 MP 树中靴带支持率都小于 50%. 在 BI 树中分支 I、分支 II 分别具有 0.68 和 1.00 的后验支持率.

分支 I: 姜属( *Zingiber*) ( BS = 55 ,PP = 1.00) 、山奈属( *Kaempferia*) ( BS = 81 ,PP = 1.00) 、姜花属( BS = 100 ,PP = 1.00) 、象牙参属( *Roscoea*) ( BS = 100 ,PP = 1.00) 在 MP 树和 BI 树中各自构成单系分支. *Distichochlamys* 与 *Scaphochlamys*( BS = 92 ,PP = 1.00) ,喙花姜属( *Rhynchanthus*) 与直唇姜属( *Pommereschea*) ( BS = 82 ,PP = 1.00) 、象牙参属与

距药姜属( *Cautleya*) ( BS = 98 ,PP = 1.00) 在 MP 树和 BI 树中均构成姐妹类群. *Haniffia* 与大苞姜属( *Caulokaempferia*) 聚为 1 个分支 ,靴带支持率小于 50 ,后验支持率为 0.54. 凹唇姜属( *Boesenbergia*) 物种呈并系类群. 其中 *Boe i* 白斑凹唇姜( *Boesenbergia albomaculata*) 与拟姜黄属( *Curcumopha*) 聚为一支( BS = 88 ,PP = 1.00) . 分支 I 中除 *Haniffia*/大苞姜属分支外的其余类群构成 1 个分支 ,MP 树中靴带支持率小于 50 ,BI 树中具有 0.74 的后验支持率. 姜属、山奈属、*Cornukaempferia*、*Distichochlamys*、*Scaphochlamys*、白斑凹唇姜/拟姜黄属几个分支构成 Clade A 在 MP 树中支持率小于 50 ,BI 树中支持率为 1.00.

分支 II: *Paracautleya*、*Hitchenia* 位于姜黄属分支内 ,使姜黄属成为并系类群( BS = 99 ,PP = 1.00) . 联合矩阵分析中缺乏 *Smithatris* ,对 ITS 单基因矩阵分析的结果表明 ,该并系类群包括 *Smithatris*. 姜黄属并系类群与土田七属( *Stahlianthus*) 成姐妹类群( BS = 100 ,PP = 1.00) . *Camptandra*、苞叶姜属( *Pyrgophyllum*) 在 MP 树中分别位于分支 II 的基部 ,相应分支支持率小于 50 ,在 BI 树中这 2 个属与姜族和舞花姜族各分支成平行关系.

## 3 讨 论

3.1 姜族与舞花姜族的关系 分析结果显示 ,姜亚科为单系类群. 姜亚科的部分深分支在最大简约法中靴带支持率低于 50 ,但在 Bayesian 推断中获得较高后验率 ,但鉴于后验率一般大于 0.90 才有意义 ,所以对于这些分支的讨论需十分谨慎 ,各分析中姜族浅分支支持率相对较高.

舞花姜族在各分析中均未构成单系 ,姜族在最大简约法分析中虽然构成 1 个分支 ,但是支持率小于 50. 目前 ITS 和 *matK* 片段提供的分子系统发育学证据无法确定舞花姜族和姜族二者的关系. 在形态上 ,舞花姜族具有单室子房、侧膜胎座 ,唇瓣基部与花丝联合的特征将其与姜族区分开 ,但这些区别并不是严格的 ,在姜族的大苞姜属、*Scaphochlamys*、*Paracautleya*、*Siphonochilus* 中有部分种为单室子房 ,直唇姜属也具有唇瓣基部与花丝联合的特征. 姜族单系地位在简约法分析中获得弱的支持 ,但是并没有在姜族中发现易观察到的共有衍征( synapomorphy) . 不过姜族与舞花姜族的近缘关系是可以确定的 ,二者构成姜亚科 ,是一个确定的单系 ,该

亚科的共有特征为二列叶平面与根状茎方向平行, 这一性状将其与其他亚科区分开。

**3.2 姜族系统的演化关系** 在姜族内部, 尽管 ITS 和 *matK* 提供的信息有限, 对内部分支间的系统关系分辨力不高, 不过对系统树的分析我们仍然可以得到一些较有价值的结论。山奈属、*Distichochlamys*/*Scaphochlamys*、象牙参属/距药姜属、姜花属、直唇姜属/喙花姜属、姜黄属并系类群几个分支在 ITS&*matK* 的简约法分析和 Bayesian 推断中获得一致的支持。对于这几个分支, 下面依次做讨论:

(1) 山奈属 约有 50 个种, 主要分布在印度, 中国南部和马来西亚地区<sup>[26]</sup>。山奈属植物植株低矮, 具块状根茎, 须根常膨大, 无明显的地上茎。分析支持山奈属为单系类群。在单基因矩阵分析中发现( 结果未列出), 山奈属在 ITS 单基因系统树里的支持率低于 *matK*, 这与该属 ITS 序列变异度大有关, 其他属属内种间 ITS 序列差异( sequence divergence) 范围 0 ~ 13. 94% ( *matK* 为 0 ~ 1. 31% ), 山奈属为 2. 89% ~ 20. 31% ( *matK* 为 0 ~ 0. 99% )。由于 ITS 是一个多拷贝基因, 且存在明显的趋同进化<sup>[27]</sup>, 山奈属 ITS 序列变异度大可能是因为趋同效应在该属中作用不明显, 还保存着多态性的 ITS 拷贝。

(2) *Distichochlamys* 和 *Scaphochlamys* *Distichochlamys* 为越南特有属, *Scaphochlamys* 分布在马来西亚和泰国。在基于形态学的研究中, 二者的亲缘关系得到不同学者的一致认可<sup>[28-29]</sup>。它们形态特征非常相似, 主要差别仅在于 *Distichochlamys* 苞片为二列覆瓦状排列, 小苞片管状, 而 *Scaphochlamys* 苞片螺旋状排列, 小苞片非管状。分析结果强烈支持 *Distichochlamys* 和 *Scaphochlamys* 成为姐妹类群。

(3) 象牙参属和距药姜属 象牙参属分布在喜马拉雅地区( 中国、印度、尼泊尔、锡金、克什米尔), 海拔 1 200 ~ 4 880 m 之间<sup>[30]</sup>, 包括 18 个种。分析结果显示象牙参属为单系类群, 这一结果支持 Cowley<sup>[11]</sup> 的研究结论。象牙参属和距药姜属是姐妹类群, 二者的亲缘关系具有地理分布和形态学方面的证据, 它们同为姜族中分布海拔较高的属, 分布区部分重叠且形态相似, 苞片内都为单花, 侧生退化雄蕊椭圆形花瓣状, 唇瓣两裂, 药隔于基部延伸成距状<sup>[11, 30]</sup>。

(4) 姜花属 姜花属全球约有 80 个种<sup>[31]</sup>, 是姜科中唯一一个从热带到高海拔地区分布的大属, 为热带亚洲和马达加斯加间断分布的类群, 主要分布在亚洲热带、亚热带区域, 其现代分布中心为喜马拉雅地区。该属的形态特征是: 侧生退化雄蕊长, 线形或披针形; 苞片革质, 宿存; 花丝通常较长, 花药背着; 唇瓣显著, 微凹或二裂。姜花属在 Wood 等<sup>[14]</sup> 和 Kress 等<sup>[8]</sup> 的研究中呈现为单系类群, 本研究中姜花属构成单系( 分支且获得较高支持率, 支持姜花属为单系类群)。

(5) 直唇姜属和喙花姜属 直唇姜属和喙花姜属侧生退化雄蕊缺失, 因此在形态学分类上一直以来被归入侧生退化雄蕊小或不存在的山姜族<sup>[32-33]</sup>。分析结果中这 2 个属为姐妹类群并位于姜族内, 在 Bayesian 推断中这一姐妹群分支位于分支 I, 分支 I 具有 0. 78 的后验支持率。由于二者均具有三室子房, 中轴胎座, 与舞花姜族差异较大, 结合分子系统学的证据, 本研究支持 Kress<sup>[8]</sup> 和 Wood<sup>[14]</sup> 的研究中将二者置于姜族的分类处理。

(6) 姜黄属并系类群 在系统树中, 姜黄属与 *Paracautleya* *Hitchenia* 成并系类群, 由于实验没有获得 *Smithatris* 的 *matK* 序列, 故联合矩阵中不包括 *Smithatris*。对 ITS 矩阵进行分析( 系统树未列出), 结果表明 *Smithatris* 也位于这一并系类群内部, 在本研究中此并系类群与土田七属成姐妹类群。由于对姜黄属物种的取样存在差异, 在 Kress 等<sup>[8]</sup> 与 Ngamriabsakul 等<sup>[9]</sup> 的研究中均显示, 土田七属也位于姜黄属并系类群内部。这 5 个属形态较为相似, 其中土田七属具钟状总苞, 与苞片多枚且紧密排列的其余 4 个属相区别。姜黄属与 *Paracautleya* 的主要区别在于前者苞片连生, 每苞片内有数朵小花, 具有小苞片, 唇瓣微凹鲜少开裂, 后者苞片离生, 每苞片内仅有一朵小花, 小苞片缺失, 唇瓣开裂。Skornickova 等<sup>[34]</sup> 通过观察活体植物和标本发现 *Paracautleya* 与姜黄属的区分性状并不是绝对的, 于是将 *Paracautleya* 归入姜黄属。*Smithatris* 和 *Hitchenia* 在形态上最为接近, 二者具有相似的植株特点和花序特征, 叶有柄, 花序梗都较长, 有紧密排列的囊状苞片, 并且二者开花后花冠管都会螺旋状后缩, 使花藏于苞片内。本研究的 ITS 分析结果中没有发现 *Smithatris* 和 *Hitchenia* 有特别的亲缘关系。在 Kress 等<sup>[8]</sup> 的研究中认为姜黄属并系类群内部较高的支持率更倾向于将姜黄属分割为几个属,

而不是接受包括另外 4 个属的广义姜黄属。Ngamriabsakul 等<sup>[9]</sup>总结了这 5 个属的形态性状差异,认为这些差异性状为自体衍症(autapomorphic) 5 个属应该归并为一属。在本研究中,由于对姜黄属物种取样有限,尚不明确姜黄属与 *Smithatris*、*Hitchenia*、土田七属的关系。目前对于姜黄属与 *Paracautleya*、*Smithatris*、*Hitchenia*、土田七属的分类处理问题已成为姜科分类研究的一个热点。在以后的系统发育研究中扩大采样范围,观察更多活体材料及标本对解决这一问题是非常必要的。

(7) 其它 姜族内不具有明显假茎的几个属: 山奈属、*Cornukaempferia*、*Distichochlamys*、*Scaphochlamys*、凹唇姜属、拟姜黄属在系统树的拓扑结构中显示出一定的近缘关系,几个属构成一个分支,姜属具有明显的假茎,也位于这一分支内部。该分支中除 *Distichochlamys* 和 *Scaphochlamys* 构成姐妹类群外,其余各属间的系统演化关系并不清楚。

凹唇姜属是一个包括约 60 个种的大属,主要分布在热带亚洲<sup>[35]</sup>。系统树拓扑结构显示,凹唇姜属为并系类群,在 Kress 等<sup>[8]</sup>和 Ngamriabsakul 等<sup>[9]</sup>的研究中凹唇姜属也呈现为并系类群。在前者的研究中拟姜黄属和凹唇姜属的部分物种成姐妹类群,后者的研究中大苞姜属和凹唇姜属的部分物种成姐妹类群。本研究中白斑凹唇姜与拟姜黄属成姐妹类群。拟姜黄属是 Rao 和 Verma<sup>[36]</sup>提出的一个单种属(monotypic),与凹唇姜属的差别在于花序由根茎发出,苞片螺旋状排列,退化雄蕊杯状。Larsen<sup>[37]</sup>认为这些性状不足以将其与凹唇姜属区分,建议将该属归入凹唇姜属。大苞姜属在本研究中未表现出与凹唇姜属有近缘关系,系统位置不确定。可能的原因是本次实验未取样到与大苞姜属近缘的凹唇姜属种,例如 Ngamriabsakul 等<sup>[9]</sup>研究中的 *Boesenbergia aurantiaca* 和 *Boesenbergia cordata*。结合前人的研究,我们认为凹唇姜属本身是一个并系类群,有一部分种与拟姜黄属和大苞姜属关系较近。Ngamriabsakul 和 Techaprasan<sup>[38]</sup>结合染色体计数与分子系统发育分析,认为凹唇姜属的进化以染色体基数为 10 和 12 的 2 条路径进行。基于这一结论,有否可能凹唇姜属具有不同染色体基数的 2 个进化分支各自与拟姜黄属和大苞姜属有某些联系,对于这一问题的回答,需要在对凹唇姜属采样较完全的基础上进行。

*Cornukaempferia* 具有和姜属非常相似的向前延伸成长喙状的药隔附属体<sup>[14, 39]</sup>,但 Mood 和 Larsen<sup>[40]</sup>认为它与山奈属植株形态相似,二者均无明显地上茎,植株矮小更近缘。在我们的实验结果中,*Cornukaempferia* 未显示出与任何一方有更近的亲缘关系,它在整个姜族分支中系统关系不能确定。姜属是姜科的模式属,分布于亚洲的热带、亚热带地区,约有 80 个种,分析中姜属单系地位获得支持。姜属侧生退化雄蕊与唇瓣基部合生,这一特征将其与姜族的其他类群区分开,对其单系属性的进一步确定,还需扩大采样范围。

*Camptandra* 曾被置于山奈属,后被 Schumann<sup>[3]</sup>恢复。Larsen 和 Smith<sup>[41]</sup>认为其中的 *Camptandra yunnanensis* 从地理分布上看较近于大苞姜属,从形态上看该种苞片顶部延伸成叶状,花药全发育,非丁字型着生,顶端有明显的药隔附属体,基部无距,子房具上位腺体,与该属其余种有差别而将其归入大苞姜属。后来吴德邻<sup>[42]</sup>将其独立出来,成为 1 个单种属——苞叶姜属(*Pyrgophyllum*),这个属仅分布于中国的云南和四川。*Haniffia* 包括 2 个种,从形态上看,与 *Scaphochlamys* 较为相似<sup>[43]</sup>。目前 *Camptandra*、苞叶姜属、*Haniffia* 的系统分类地位还不能确定。

姜族共有 25 个属,本研究包括了其中 20 个属的种类,还有 5 个属(*Haplochorema*, *Laosanthus*, *Nanochilus*, *Parakaempferia*, *Stadiochilus*) 未能获得材料。结果显示,我们选用的 ITS 和 *matK* 片段在解决姜族族内属间系统演化关系上显得能力不足。因此,今后的研究一方面应着眼于开发新的基因,如来自核 DNA 的单拷贝或低拷贝基因,为确定姜族与舞花姜族二者关系及族内属间的系统演化提供更有效的位点。另一方面扩大试验材料的采集范围,进一步确定呈并系类群的姜黄属、凹唇姜属与相关属的属间关系,以及姜属、山奈属的单系类群属性。

致谢: W. Jhon Kress 博士提供部分实验材料,在此表示感谢。

## 参考文献:

- [1] 高江云,夏永梅,黄加元,等. 中国姜科花卉[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] 吴德邻. 姜科植物地理[J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2: 1-14.

- [3] SCHUMANN K. Zingiberaceae [C]//Engler A . Das Pflanzenreich IV. Leipzig: W. Engelmann ,1904 ,1-458.
- [4] LOESENER T. Zingiberaceae [C]//Engler A ,Prantl K. Natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig: W. Engelmann , 1930 ,541-640.
- [5] HOLTUM RE. The Zingiberaceae of Malay Peninsula [J]. Gardens' Bulletin Singapore ,1950 ,13: 1-249.
- [6] BURTT BL ,OLANTUNJI OA. The limits of the tribe Zingibereae [J]. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh ,1972 ,167-169.
- [7] KRESS WJ. The phylogeny and classification of the Zingiberales [J]. Missouri Botanical Garden ,1990 ,7: 698-721.
- [8] KRESS WJ ,PRINCE L ,WILLIAMS K. The phylogeny and a new classification of the gingers ( Zingiberaceae ): evidence from molecular data [J]. Botanical Soc America 2002 ,9: 1 682-1 696.
- [9] NGAMRIABSAKUL C ,NEWMAN MF ,CRONK QCB. The phylogeny of tribe Zingibereae ( Zingiberaceae) based on ITS ( nrDNA) and *trnL* - F ( cpDNA) sequences [J]. Edinburgh Journal of Botany ,2004 ,60: 483-507.
- [10] WILLIAMS K J ,KRESS W J ,MANOS P L. The phylogeny , evolution , and classification of the genus *Globba* and tribe Globbeae ( Zingiberaceae ): appendages do matter [J]. American Journal of Botany ,2004 ,91: 100-114.
- [11] NGAMRIABSAKUL C ,NEWMAN MF ,CRONK QCB. Phylogeny and disjunction in *Roscoea* ( Zingiberaceae) [J]. Edinburgh Journal of Botany 2000 ,57: 39-61.
- [12] RANGSIRUJI A ,NEWMAN MF ,CRONK QCB. A study of the infrageneric classification of *Alpina* ( Zingiberaceae) based on the ITS region of nuclear rDNA and the *trnL* - F spacer of chloroplast DNA [C]//Wilson KL ,Morrison DA. Monocots-systematics and evolution. Australia: CSIRO 2000 ,695-709.
- [13] SEARLE RJ ,HEDDERSON TAJ. A preliminary phylogeny of the Hedychieae tribe ( Zingiberaceae) based on ITS sequences of the nuclear rRNA cistron [C]//Wilson KL ,Morrison DA. Monocots-systematics and evolution. Australia: CSIRO 2000 ,710-718.
- [14] WOOD TH ,WHITTEN WM ,WILLIAMS NH. Phylogeny of *Hedychium* and Related genera ( Zingiberaceae) Based on ITS sequence data [J]. Edinburgh Journal of Botany 2000 ,57: 261-270.
- [15] TAKANO A ,OKADA H. Multiple occurrences of triploid formation in *Globba* ( Zingiberaceae) from molecular evidence [J]. Plant Systematics and Evolution , 2002 ,230: 143-159.
- [16] DOYLE JJ ,DOYLE JSA. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemical Bull ,1987 ,19: 11-15.
- [17] WHITE TJ ,BRUNS T ,LEE S ,et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]//INNIS M A ,GELFAND D H ,SNINSKY J J ,et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. USA: Academic Press ,1990 ,315-322.
- [18] STEELE PK ,VILGALYS R. Phylogenetic analyses of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene *matK* [J]. Systematic Botany ,1994 ,19: 126-142.
- [19] MADISON WI. SeqMan II ,DNASTAR [CP]. 1998.
- [20] HALL TA. BioEdit: a user - friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic acids symposium series , 1999 ,41: 95-98.
- [21] SWORFOORD DL. PAUP\* 4.0b10: Phylogenetic analysis using parsimony ( \* and other methods) ,beta version [C]. Sunderland: Sinauer Associates 2002.
- [22] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution ,1985 ,39: 783-791.
- [23] HUELSENBECK J P ,RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. Bioinformatics 2001 ,17: 754-755.
- [24] RONQUIST F ,HUELSENBECK J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics 2003 ,19: 1 572-1 574.
- [25] POSADA D ,CRANDALL K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. Bioinformatics ,1998 , 14: 817-818.
- [26] MABBERLEY DJ. The Plant Book. A portable dictionary of the higher plants [M]. London: Cambridge University Press ,1993.
- [27] WENDLE JF ,SCHNABEL A ,SEELANAN T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton ( *Gossypium*) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ,1995 ,92: 80-284.
- [28] NEWMAN MF. *Distichochlamys* a new genus from Vietnam [J]. Edinburgh Journal of Botany ,1995 ,52: 65-69.
- [29] LARSEN K ,NEWMAN M. A new species of *Distichochlamys* from Vietnam and some observations on generic limits in Hedychieae ( Zingiberaceae) [J]. Natural History Bulletin of the Siam Society 2001 ,49: 77-80.

- [30] COWLEY J. A revision of *Roscoea* (Zingiberaceae) [J]. Kew Bulletin, 1982, 13: 8-13.
- [31] BRANNEY TME. Hardy Ginger [M]. Portland: Timber Press, 2005.
- [32] SMITH R M. Zingiberaceae: Synoptic keys to the Tribes Zingibereae, Globbeae, Hedychieae, Alpinieae (in part) [J]. Notes from Royal Botanic Garden Edinburgh, 1981.
- [33] LARSEN K, LOCK JM, MAAS H, et al. Zingiberaceae [C]//KUBITZKI K. The Families and Genera of Vascular Plants IV: Flowering Plants: Monocotyledons. Berlin: Springer-Verlag, 1998, 474-495.
- [34] SKORNICKOVA J, SABU M. The Recircumscription of *Curcuma* L. to Include the Genus *Paracautleya* R. M. Sm [J]. Gardens' Bulletin Singapore, 2005, 57: 37-46.
- [35] SIRIRUGSA P. A revision of the genus *Boesenbergia* Kuntz (Zingiberaceae) in Thailand [J]. Natural History Bulletin of the Siam Society, 1992, 40: 67-90.
- [36] RAO AS, VERMA DM. *Curcumorpha* - A new genus of Zingiberaceae [J]. Bulletin of the Botanical Survey of India, 1971, 13: 339-341.
- [37] LARSEN K. Further studies in the genus *Boesenbergia* (Zingiberaceae) [J]. Nordic Journal of Botany, 1997, 17: 361-366.
- [38] NGAMRIABSAKUL C, TECHAPRASAN J. The phylogeny of Thai *Boesenbergia* (Zingiberaceae) based on petA-psbJ spacer (chloroplast DNA) [J]. Songklanakarin Journal of Social, 2006, 28: 49-57.
- [39] SAENSOUK P, THEERAKULPISUT P, CHANTARAN-OTHAI P. *Cornukaempferia larsenii* sp. nov. (Zingiberaceae): A New Species from Thailand [J]. The Natural History Journal of Chulalongkorn University, 2007, 7: 115-119.
- [40] MOOD J, LARSEN K. *Cornukaempferia* a new genus of Zingiberaceae from Thailand [J]. Natural History Bulletin of the Siam Society, 1997, 45: 217-221.
- [41] LARSEN K, SMITH RM. Notes on *Caulokaempferia* [J]. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 1972, 31: 287-295.
- [42] 吴德邻, 陈忠毅. 中国姜科一新属 - 苞叶姜属 [J]. 云南植物研究, 1989, 27: 124-128.
- [43] LARSEN K, MOOD J. Revision of the genus *Haniffia* (Zingiberaceae) [J]. Nordic Journal of Botany, 2000, 20: 285-289.

## A investigation on the phylogeny of tribe Zingibereae (Zingiberaceae) based on nrDNA ITS and cpDNA *matK* sequence data

ZHENG Man-li<sup>1,2</sup>, XIA Yong-mei<sup>3</sup>

(1. Laboratory of Plant Evolutionary Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China;

3. Laboratory of Plant Phylogenetics and Conservation Biology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

**Abstract:** Zingibereae is the largest tribe in the family Zingiberaceae with 25 genera. Zingibereae and Globbeae comprised the Zingiberoideae. In our study, we choose ITS and *matK* sequences to reconstruct gene trees for Zingibereae through maximum - parsimony, bayesian - inference and maximum - likelihood methods. Our goal in the present study is to clarify the relationship between Zingibereae and Globbeae, to generate hypotheses on the phylogenetic relationships among the genera of the Zingibereae. The topologies of gene trees revealed that: ① Zingiberoideae resolved as a monophyletic lineage. ② *Distichochlamys* and *Scaphochlamys*, *Roscoea* and *Cautleya*, *Pommereschea* and *Rhynchanthus* are strongly supported as sister genera. ③ *Hedychium*, *Roscoea*, *Kaempferia*, *Zingiber* are respectively resolved as monophyletic lineage. ④ *Cucurma* is paraphyletic with *Paracautleya*, *Smitha* and *Hitchenia*. ⑤ *Boesenbergia* is paraphyletic with *Curcumorpha*. However, deep lineages within Zingibereae are poorly resolved, more powerful markers are needed in further study.

**Key words:** Zingibereae; Zingiberaceae; ITS; *matK*; phylogeny