

用核糖体 DNA 的 ITS 序列探讨滇桐属的系统学位置^{*}

袁长春¹, 施苏华¹, 钟 扬², 龚 洵¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘 要: 采用 PCR 直接测序方法, 对来自椴树科、梧桐科、木棉科 17 属的 33 个种和作为外类群的锦葵科 2 属 4 个种的核糖体 DNA ITS 区 (含 5.8S 区) 序列进行了分析。结果表明, 滇桐属 (*Craigia*) 与椴树属为姐妹群关系, 二者构成单系类群, 因而将滇桐属置于椴树科中较为合理; 刺果藤属和翅子树属有较近的亲缘关系, 并与蚬木属和柄翅果属构成一个单系类群, 二者可能与椴树科有更近的亲缘关系; 榴莲属与椴树科的破布叶属构成单系类群; 山芝麻属与椴树科、梧桐科和木棉科构成并系关系; 因此, 这些属的系统位置尚需进一步确定。综合分析的结果支持将椴树科、梧桐科和木棉科归并到锦葵科中的观点。

关键词: 系统发育; ITS; 姐妹群; 滇桐属 *Craigia*

中图分类号: Q78; Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 06-0073-05

滇桐属 *Craigia* 建立于 1921 年。最初, Smith 等^[1] 根据 Forrest 采自中国云南的标本而命名, 并认为其雄蕊形态表明了与梧桐科的毛瓣族 *Lasiopetaleae* 和刺果藤族 *Buettneriidae* 的亲缘关系, 故置于梧桐科中。

对于滇桐属的系统位置国内外学者长期以来都有争议。1952 年, Erdtman 观察研究滇桐的花粉时, 首次对滇桐属的系统位置提出异议, 认为其花粉形态类似于椴树科的椴属 *Tilia* 和莫托木属 *Mortoniadendron*, 认为滇桐属为“地位不能肯定的属”。1956 年, 陈焕镛等^[2] 把具蒴果的滇桐 *Craigia yunnanensis* 标本错定为椴树科蚬木属 *Burretiodendron* 的一个新种, 即圆朔蚬木 *B. combreoides*。1961 年 Kostermans^[3] 将一个残缺不全的、具果的、实际为 *Craigia yunnanensis* 的标本, 鉴定为 *Burretiodendron yunnanensis*, 次年他干脆把 *B. yunnanensis* 代替了 *C. yunnanensis*, 从而取消了滇桐属。

1967 年, Hutchinson 的《有花植物属志》将滇桐属置于梧桐科毛瓣族。1973 年, Aiy Shaw 修订的“Willis 字典”又将滇桐属移置于椴树科中。1977 年, 徐祥浩^[4] 认为, 滇桐属的花部构造和果实形态均与蚬木属不同, 并以“植物体有星状毛, 花辐射对称, 5 基数, 萼片 5 枚, 镊合状排列, 有退化雄蕊, 花药 2 室”为由, 将其置于梧桐科。

1978 年, 张宏达等^[5] 把滇桐属归入椴树科, 并将它与蚬木属等组成椴树科的一个亚科, 即蚬木亚科 *Excentrodendroideae*。1982 年, 吴德邻等也把滇桐属归入椴树科。1985 年, 龙活等^[6] 比较了滇桐属与椴树科和梧桐科的某些属的花粉形态, 认为滇桐属花粉与梧桐科的苹婆属 *Sterculia* 及梭罗树属 *Reevesia* 中部分种类相似, 因而认为把滇桐属置于梧桐科内比较合适。1989 年, 诸葛仁^[7] 选择 15 个形态特征用分支分析的方法所得出的结论, 支持把滇桐属作为椴树科成员的观点。

迄今为止, 还没有确切的形态学证据支持滇桐属的归属。本研究采用直接 PCR 测序方法, 获得滇桐与相关类群的 rDNA ITS 序列, 并进行分子系统学分析。旨在探讨滇桐属的系统位置及其近缘类群的系统发育关系。

1 材料和方法

1.1 材 料

实验材料见表 1, 包括 19 属 37 个种, 分别来自云南、广西和广东等地, 其中 *Pachira aquatica*, *P. macrocarpa* 原产墨西哥, *Chorisia speciosa* 原产美国洛杉矶。并有部分 ITS 序列来自 GenBank。其中属于锦葵科的锦葵属 *Malva* 和木槿属 *Hibiscus* 的 4 种材料用作为复合外类群。

* 收稿日期: 2002-04-08

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (39825104); 国家自然科学基金资助项目 (30070053); 广东省自然科学基金资助项目 (001223)

作者简介: 袁长春 (1964 年生), 男, 副教授; E-mail: lsh03@zsu.edu.cn

表 1 用于核糖体 DNA ITS 序列测定的类群、样品来源及其凭证
Tab 1 Taxa, source and voucher included in nrDNA-ITS sequence analyses

样品	科名	来源	凭证标本/GenBank 编号
<i>Sterculia nobilis</i>	Sterculiaceae	Zhongshan University campus	YeYuan99120501/AF460183
<i>Sterculia lanceolata</i>	Sterculiaceae	Zhongshan University campus	YeYuan2000052703/AF460184
<i>Firmiana platanifolia</i>	Sterculiaceae	Zhongshan University campus	YeYuan99120502/AF460185
<i>Firmiana major</i>	Sterculiaceae	Kunming Botanical Garden	GongYuan200061101/AF460186
<i>Abronia augustum</i>	Sterculiaceae	GenBank	AAU277462
<i>Burretiodendron esquirolii</i>	Tiliaceae	Guangxi Botanical Garden	Tang99121403/AF460200
<i>Excentrodendron hsiennu</i>	Tiliaceae	Guangxi Botanical Garden	Tang99121402/AF460201
<i>Pterospermum heterophyllum</i>	Sterculiaceae	South China Botanical Garden	Jian200107105/AF460202
<i>Byttneria urticifolia</i>	Sterculiaceae	GenBank	BUR277464
<i>Tilia hupeiensis</i>	Tiliaceae	Shangzhi county, Hunan	Chen20008001/AF460197
<i>Tilia tomentosa</i>	Tiliaceae	GenBank	AF250023
<i>Tilia platyphyllos</i>	Tiliaceae	GenBank	AF250292
<i>Tilia heterophylla</i>	Tiliaceae	GenBank	AF174639
<i>Tilia paucicostata</i>	Tiliaceae	Kunming Botanical Garden	GongYuan200061102/AF460198
<i>Craigia yunnanensis</i>	?	Kunming Botanical Garden	Gong99122212/AF460199
<i>Micoccos paniculata</i>	Tiliaceae	Southern China Botanical Garden	Jian2001071009/AF460194
<i>Durio zibethinus</i>	Bombacaceae	GenBank	AF287710
<i>Durio lowianus</i>	Bombacaceae	GenBank	AF287711
<i>Durio singaporensis</i>	Bombacaceae	GenBank	AF287702
<i>Durio oblongus</i>	Bombacaceae	GenBank	AF287703
<i>Reevesia thyrsoides</i>	Sterculiaceae	GenBank	AF233303
<i>Reevesia longipetiolata</i>	Sterculiaceae	South China Botanical Garden	Jian2001071006/AF460195
<i>Reevesia orbicularifolia</i>	Sterculiaceae	Kunming Botanical Garden	Gong99122207/AF460196
<i>Bombax buonopazense</i>	Bombacaceae	GenBank	AF028523
<i>Bombax malabaricum</i>	Bombacaceae	Zhongshan University campus	Ye99120503/AF460192
<i>Pachira aquatica</i>	Bombacaceae	South China Botanical Garden	Jian2001071001/AF460189
<i>Pachira macrocarpa</i>	Bombacaceae	South China Botanical Garden	Jian2001071002/AF460190
<i>Chorisia speciosa</i>	Bombacaceae	South China Botanical Garden	Jian2001071003/AF460191
<i>Adansonia malagascariensis</i>	Bombacaceae	GenBank	AF028532
<i>Adansonia perrieri</i>	Bombacaceae	GenBank	AF028538
<i>Adansonia grandidieri</i>	Bombacaceae	GenBank	AF028527
<i>Adansonia digitata</i>	Bombacaceae	South China Botanical Garden	Jian2001071004/AF460193
<i>Helicteres guazumifolia</i>	Sterculiaceae	GenBank	AF233300
<i>Malva venosa</i>	Malvaceae	GenBank	AF303033
<i>Malva dendromorpha</i>	Malvaceae	GenBank	AF303032
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Malvaceae	Zhongshan University campus	Yuan2000031214/AF460187
<i>Hibiscus syriacus</i>	Malvaceae	Kunming Botanical Garden	Yuan2000606/AF460188

1.2 实验方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取总 DNA。DNA 的纯化采用玻璃粉纯化系统 (GPS), 按以下步骤进行: 取 50 μ L DNA 1 $\times$ TE 溶液加入 3 倍体积的 6 mol/L NaI 和 3 μ L 玻璃粉 1 $\times$ TE 溶液, 混匀, 8 000 r/min 离心 2 min; 弃上清液, 加洗脱液 (含 0.2 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, φ = 50% ethanol) 100 μ L, 混匀, 8 000 r/min 离心 2 min; 弃上清液, 重复洗脱 3 次; 晾干, 加 50 μ L 1 $\times$ TE 溶液, 至沉淀完全溶解;

10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液移至新管, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增及 ITS 测序 采用引物 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 和 ITS5(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'), 按程序 (94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 6 min) 进行 PCR 扩增, 得到核糖体 DNA 的 ITS 片段 (包括 ITS-1, 5.8S 和 ITS-2)。PCR 产物用 QIAGEN 公司的 PCR 纯化试剂盒进行纯化, 然后采用 PE 公司 377 型自动测序仪

进行测序。

1.2.3 数据分析 所得序列用 ClustalX 程序进行
对位排列, 并手工校正。使用 PAUP4.0b8 软件对
序列进行统计和分支分析, 用启发式搜索方法
(heuristic search methods) 寻找最简约树 (most parsimonious trees)。当分析结果出现多个步长相同的简
约树时, 分析多数原则一致树, 计算其一致性指数
和维持性指数, 并用自展法 (bootstrap) 检测系统
树各分支的置信度, 自展数据集为 1 000 次。并用
Kimura 双参数模型计算序列分歧度。

2 结 果

整个 ITS 区的长度范围为 607 ~ 707 bp, GC 百
分含量为 63%, 其中 ITS1 长度为 253 ~ 309 bp,
ITS2 为 206 ~ 244 bp, 5.8S rDNA 为 162 ~ 163 bp

(*Malva venosa* 和 *M. dendromorpha* 缺失一个碱基)。
滇桐的 ITS1 长度为 292 bp, ITS2 为 234 bp, ITS
区长度为 689 bp, GC 百分含量为 60%。序列间的
Kimura 距离为 0 ~ 0.506 7, 平均为 0.302 6。
排序后的 ITS 序列总长度为 757 (包括 gap 和
5.8S 区), 其中变异位点为 508, 信息位点为 427。
运用 PAUP4.0b8 软件以 *Hibiscus syriacus*, *Hibiscus
rosa sinensis*, *Malva venosa* 和 *Malva dendromorpha* 为
复合外类群进行分支分析时得到 35 个步长相同的
最简约树, 其多数原则一致树见图 1。其中图 1
(a) 为 Bootstrap 值大于 50% 的多数原则一致树, 树的
总长度为 2168 步, 一致性指数为 0.463, 维持性
指数为 0.573。图 1 (b) 为加上其他一致类群后所
得到的多数原则一致树, 树的总长度为 2 053, 一
致性指数为 0.488 6, 维持性指数为 0.681 6。

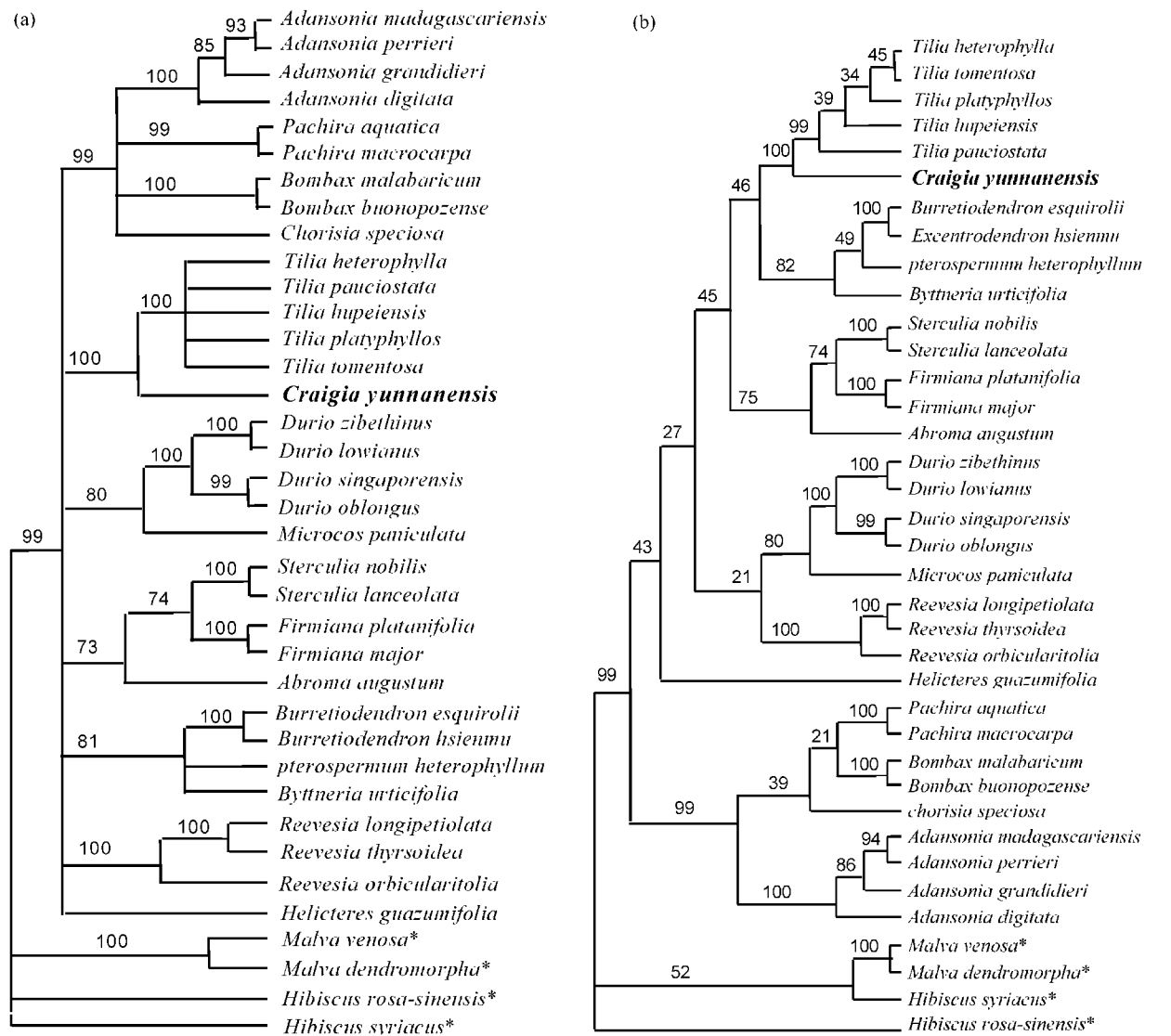


图 1 基于 ITS 序列构建的多数原则一致树 (Bootstrap 置信值标示于树上)

Fig. 1 Majority rule consensus trees based on ITS sequence (bootstrap values are shown in the trees)

(a) Bootstrap 置信值大于 50% 的多数原则一致树; (b) 加上其他一致类群后的多数原则一致树; * 表示外类群

3 讨 论

自 Smith 和 Evans 建立滇桐属以来, 其系统位置始终存在争议, 争论的焦点主要围绕滇桐属应该放入梧桐科还是应该归到椴树科。多数学者倾向于置入椴树科的观点, 中国植物志也将其置于椴树科、蚬木亚科、滇桐族, 并与蚬木族并列^[8]。最近, 徐颂军等认为其花果形态与蚬木族的蚬木属和柄翅果属有很大差别, 主张单独成立滇桐亚科 *Craigioideae*^[9]。ITS 系统树表明(图 1(a)), 滇桐与椴树科的椴树属 5 个种构成一个单系类群, 滇桐属与椴树属为姐妹群关系, 自展支持率为 100%。滇桐与椴树属 5 个种的 Kimura 距离为 0.083 5~0.111 8, 平均为 0.094 2, 也表明这两个属间亲缘关系较近。因此, ITS 序列分支分析结果支持将滇桐属归入椴树科的观点。

从形态特征来看, 滇桐属具有雄蕊多数, 花丝分离, 仅基部略为连生, 且分为 5 组, 并且具有开裂的翅果, 这些都是椴树科的属性。在梧桐科, 雄蕊两轮, 通常连合成管或分别着生于萼片及花瓣上。至于植物体被星状毛, 花辐射对称, 5 基数, 萼片镊合状排列, 具退化雄蕊, 花药 2 室等特征均为梧桐科和椴树科所共有, 不能以此作为归入梧桐科的理由。

从图 1(b) 可知, 滇桐与 *Burretidendron exquirolii* 不在同一分支, 两者的 Kimura 距离为 0.265 1, 不支持 Kosterman 将滇桐组合为 *Burretidendron yunnanense* 的观点。同时, 蚬木属与 *Burretidendron exquirolii* 构成姐妹群关系, 自展支持率为 100%, 因而不支持滇桐属与蚬木属有较近的亲缘关系。同样, 就花果形态而言, 滇桐属与柄翅果属或蚬木属也有显著不同, 前者花两性, 无花瓣, 外轮退化雄蕊 10 枚, 成对着生, 内轮能育雄蕊 20 枚, 分为 5 组, 而蚬木属及柄翅果属花两性或单性, 具花瓣和花萼, 无退化雄蕊; 虽然在果实在外观上, 滇桐属与蚬木属及翅果属种类的果实相似, 但前者是室背开裂, 具 5 条膜质具脉纹的薄翅, 而后者为室间开裂, 果翅不具脉纹^[7]。因此, 建议将滇桐属从蚬木亚科中分出来, 将其置于椴树亚科或单独成立滇桐亚科。

刺果藤属 *Byttneria* 和翅子树属 *Pterospermum* 属于梧桐科的植物, 但从 ITS 序列分析的结果发现, 在系统树上并没有与其它梧桐科的类群聚在一起。相反, 与椴树科的柄翅果属和蚬木属有较为密切的关系, 形成姐妹群关系, 共同构成一个单系类群(图 1(a)), 从图 1(b) 所显示的结果来看, 刺果藤属

成为这一单系类群的基出分支。由此推测, 刺果藤属和翅子树属与椴树科的关系较其与梧桐科的关系更近。最初, Smith 和 Evans 也是因为滇桐属的雄蕊形态与梧桐科的毛瓣族和刺果藤族相似, 而将其置于梧桐科中。因此, 对于刺果藤属和翅子树属的系统位置有必要进一步确定。

榴莲属 *Durio* 全球约有 27 种, 传统系统分类将其放入木棉科中, 因为具有单叶, 羽状叶脉, 有副萼; 假种皮厚, 肉质, 几乎全包住种子; 蒴果大, 外面具圆锥状的粗刺, 室背开裂、果片 3~5 以及隔膜留在果片上等特征, 成为木棉科中较特殊的类群。本次实验的结果显示, 木棉科的瓜栗属 *Pachira*、木棉属 *Bombax*、丝木棉 *Chrisia* 以及猴面包树属 *Adansonia* 构成一个单系类群(图 1(a)), bootstrap 值为 99%, 而榴莲属却与椴树科的破布叶属 *Microcos* 构成一个单系类群。因此, 对于榴莲属的系统位置尚需进一步研究。

对于山芝麻属 *Helicteres* 的系统位置, 也长期存在争议。最近, 徐颂军等将梧桐科归为 12 个族, 其中山芝麻族 *Helictereteae* 含有 5 个不同的属, 即山芝麻属 *Neoregnella*、鹧鸪麻属 *Kleinhovia*、梭罗树属 *Reevesia* 和 *Ungeria*^[10]。从 ITS 序列分析的结果来看, 山芝麻属既没有与梭罗树属聚在一起, 也没有显示出与其它梧桐科的属有近的亲缘关系, 因此, 其分类位置尚不能确定。

在 Cronquist 系统、Takhtajan 系统和 Thorne 等分类系统中, 认为椴树科、梧桐科和木棉科与锦葵科 *Malvaceae* 有较近的亲缘关系, 并分别将三者作为独立的科置于锦葵目 *Malvales* 中。但是, 在基于 *rtxL* 基因、*atpB* 基因和 18S *rDNA* 基因所建立起来的 APG 系统中, 将椴树科、梧桐科、木棉科和锦葵科合并为一个科, 即锦葵科, 置于锦葵目中。ITS 序列分析的结果显示这种合并的合理性, 从图 1 可以看出, 椴树科、梧桐科、木棉科并没有分别构成 3 个单系类群, 而是互相渗透的复系类群, 尤其是椴树科和梧桐科的关系更是如此。显然, 有必要对上述类群间复杂的系统发育关系开展进一步研究。

致谢: 叶创兴教授在采样中给予热情指导, 唐绍清和简曙光两位博士提供部分实验材料, 谨此一并致谢。

参考文献:

- [1] SMITH W W, EVANS W E. *Craigia*, a new genus of Sterculiaceae [J]. Trans Bot Soc Edin, 1921, 28: 69-70.
- [2] 陈焕镛, 侯宽昭. 华南经济树木六新种 [J]. 植物分类学报, 1956, 5(1): 1-18.

[3] KOSTERMANS A J G H. The genus *Burretiodendron rehder* (Tiliaceae)[J] . Reinwardtia, 1961, 6(1): 1— 16.

[4] 徐祥浩. 中国梧桐科植物的整理[J] . 植物分类学报, 1977, 15(1): 73— 84.

[5] 张宏达, 缪汝槐. 椴树科岷木亚科的系统分类[J] . 中山大学学报(自然科学版), 1978, 17(3): 19— 26.

[6] 龙活, 何丽卿, 徐祥浩. 滇桐的花粉形态及其系统位置的探讨[J] . 植物分类学报, 1985, 23(3): 179— 184.

[7] 诸葛仁. 滇桐属系统位置的分支分析[J] . 云南植物研究, 1989, 11(1): 17— 23.

[8] 张宏达, 缪汝槐. 中国植物志(椴树科)[M] . 北京: 科学出版社, 1989: 47— 123.

[9] 徐颂军, 徐祥浩. 梧桐科一些属的分类位置探讨[J] . 热带亚热带植物学报, 2000, 8(1): 11— 16.

[10] 徐颂军, 徐祥浩. 梧桐科植物的地理分布[J] . 热带亚热带植物学报, 2001, 9(1): 19— 30.

A Reevaluation of the Taxonomic Position of the Genus *Craigia*
Based on the nrDNA ITS Sequence

YUAN Chang chun¹, SHI Su hua¹, ZHONG Yang², GONG Xun¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;
2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: There are various arguments on the taxonomic position of the genus *Craigia* Smith et Evans. In the present paper, 33 species representing 17 genera of the Tiliaceae, Sterculiaceae and Bombacaceae and 4 outgroup species from Malvaceae were used to analyze the molecular phylogeny of the genus *Craigia* using sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S rRNA gene of nuclear ribosomal DNA. Direct PCR sequencing method was used in the study. The most parsimonious trees were obtained by PAUP analysis with heuristic search. In the trees, the *Craigia yunnanensis* is basal to a monophyletic group comprising *Tilia paucicostata*, *T. hupeiensis*, *T. platyphyllos*, *T. tomentosa* and *T. heterophylla* (bootstrap value = 100). Therefore, it is reasonable to classify the genus *Craigia* into the Tiliaceae. There is a relatively close relationship between *Pterospermum heterophyllum* and *Byttneria urticifolia*, and the both become basal to the monophyletic group comprising *Burretiodendron esquirolii* and *Excentrodendron hsiemmu* (bootstrap value= 81). The same thing occurred between the genus *Durio* (Bombacaceae) and *Microcos paniculata* (Tiliaceae). As to the status of the genus *Helicteres* is still undetermined, there is a parallel relationship among it and Bombacaceae, Sterculiaceae and Tiliaceae. Since the three families Bombacaceae, Sterculiaceae and Tiliaceae are shown to be polyphyletic, further studies on their phylogenetic relationships are necessary.

Key words: Phylogeny; ITS; sister group; *Craigia*