

文章编号: 0529-6579 (2000) 01-0072-05

金缕梅族 ITS 序列分析及其系统学意义^{*}

章 群, 施苏华, 黄柳林, 谈凤笑, 金 虹

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 对金缕梅亚科 15 属植物的细胞核核糖体 DNA ITS 区 (含 5.8S 编码区) 序列进行分析, 并构建分子系统树, 初步探讨金缕梅族的系统发育。结果表明: 金缕梅族呈复系演化特征, 木亚族木属和四药门花属是关系密切姐妹群, 与蜡瓣花族系统关系较近, 三者共同构成金缕梅亚科最基部的分支; 马岛金缕梅亚族的 *Noahdendron* 和毛枝花属是秀柱花族的姐妹群; 金缕梅亚族金缕梅属与弗特吉族亲缘关系较密切, 有可能可以合并成一个族。

关键词: 金缕梅亚科; 金缕梅族; nr DNA ITS; 5.8S nr DNA; 系统发育

中图分类号: Q949.746 **文献标识码:** A

金缕梅科 (Hamamelidaceae) 主要分布在亚洲东部, 是被子植物系统发育中的一个关键科, 全世界 31 属约 140 种, 分为 4~6 个亚科^[1~3]。其中具有单个胚珠的金缕梅亚科 (Hamamelidoideae) 23 属 100 余种, 是种系最多最复杂的 1 个亚科, 分为 4~5 个族, 金缕梅族 (Hamamelideae) 10 属约 34 种, 是属种最多的族, 其族下等级及系统位置长期存在争议^[1~5], Endress^[2] 将其分成 3 个亚族。近年来利用 DNA 序列分析研究金缕梅科系统发育已有报道^[6,7], 然而利用分子数据处理争议较大的金缕梅亚科内的系统演化关系, 仍有不足, 例如金缕梅族中马岛金缕梅亚族 (Dicoryphineae) 尚未涉及。本研究测定了马岛金缕梅亚族中毛枝花 (*Trichocladus crinitus*)、*Noahdendron nicholasii* 等的细胞核核糖体 DNA ITS 区 (含 5.8S 编码区) 序列, 比较分析了金缕梅亚科内所有族和亚族代表植物的分子和形态学特征, 旨在深入探讨金缕梅族的系统发育。

1 材料与方法

选用植物的新鲜叶或硅胶干燥叶提取 DNA。材料来源见表 1。

总 DNA 采用 CTAB 法提取, 并用玻璃粉纯化。按 Wen 等^[8] 方法扩增 nr DNA ITS 区, 产物经 QIAGEN 公司的 PCR 纯化试剂盒纯化后直接用于测序。测序引物为: C5.8S, ITS4, N5.8S, N18L18; 用 T7 DNA Sequenase Version 2.0 Kit (Amersham), α -³⁵S-dATP 标记, 测序反

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970057); 国家杰出青年科学基金资助项目 (39825104); 广东省自然科学基金资助项目 (970190)

收稿日期: 1999-05-10; 作者简介: 章群 (1968~), 男, 博士, 现在暨南大学水生所工作; 通讯联系人: 施苏华。

表 1 本研究所用金缕梅亚科和外类群的 nrDNA ITS 区序列及样品来源
Tab 1 Accessions of Hamamelidoideae and the outgroup sampled for the nrDNA ITS studies

编号	种名		来源	Genbank 序列号
1	<i>Tetrathrium subcordatum</i>	F Xing/ 9271(SYS)	Huang et al, 1999	AF127513
2	<i>Loropetalum chinensis</i>	X Li/ 97004(SYS)	Shi et al, 1998	AF127514
3	<i>Corylopsis globrasum</i>	J Wen/ 584(CS)	Shi et al, 1998	AF127516
4	<i>Fortunearia sinensis</i>	Y. Chen/ 42(SYS)	Shi et al, 1998	AF127515
5	<i>Sinowilsonia henry</i>	R Hao/ 974003(SYS)	Huang et al, 1999	AF127512
6	<i>Eustigma oblongifolium</i>	F Xing/ 6746(SYS)	Zhang et al, 1999	AF127518
7	<i>Noahdendron nicholasii</i>	Z Zhang/	Cultivated in Zurich Univ. Botanical Garden	AF147753
8	<i>Trichocladus crinitus</i>	Z Zhang/	Cultivated in Zurich Univ. Botanical Garden	AF147755
9	<i>Sycopsis sinensis</i>	X Li/ 97001(SYS)	Zhang et al, 1999	AF127517
10	<i>Distylium racemosum</i>	Y. chen41(SYS)	Zhang et al, 1999	AF074249
11	<i>Parrotia persica</i>	Alexander J/ 2230A	Strybing Arboretum, USA	AF128004
12	<i>Shaniodendron subaequate</i>	R Hao/ 951004(SYS)	Zhang et al, 1999	AF128801
13	<i>Parrotiopsis jacquemontiana</i>	Alexander J/ 765— 65D	Zhang et al, 1999	AF128802
14	<i>Fothergilla major</i>	J Wen/ 48(CS)	Shi et al, 1998	AF074250
15	<i>Hamamelis mollis</i>	J Wen/ 586(CS)	Wen et al, 1999	AF074262— 3
16	<i>Disanthus cercidifolius</i> var <i>longipes</i>	R Hao/ 974001(SYS)	Shi et al, 1999	AF127507

应产物用 $\rho=6\%$ 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后将胶转移到 3 mm Whatman 滤纸上, 50 ℃ 干燥 3 h, 放射自显影 3 d.

采用 Clustal X 对序列进行排列, 并手工校正. 利用 PHYLIP 软件包 Kimura-2 参数和简约法 (Dnapars) 计算类群间的核苷酸差异值和简约树; 以长柄双花木 (*Disanthus cercidifolius* var. *longipes*) 为外类群, 使用 1 000 个自展数据集 (bootstrap), 改变输入次序 3 次.

2 结果与讨论

排列后的序列总长 696 碱基对, ITS1 区长度为 235 ~ 277 碱基对, ITS2 区长度为 238 ~ 243 碱基对; 5. 8S 长度为 163 ~ 164 碱基对. 各类群间的 K_{muc} 值列于表 2 中. 一致树 (consensus tree) 见图 1.

最近一些研究及我们的工作表明^[6 7], 双花木亚科 (Disanthoideae) 为金缕梅亚科的姐妹群, 因此选用长柄双花木作外类群. ITS 系统树表明, 金缕梅亚科所有种类构成一个单系类群 (monophyletic group), 这一结果得到 100% 自展数据值的支持. 而金缕梅亚科内则表现为复系演化 (polyphyletic). 由于金缕梅亚科内部各属间关系比较复杂, 不少性状交叉且外部形态不稳定, 从单个个体到族等各个分类等级都存在着不同程度的平行和趋同演化现象, 关于金缕梅亚科内的系统演化关系, 族和亚族的划分等, 一直存在着较大争议^[1 ~ 5]. Endress 将该亚科划分为 4 个族: ①金缕梅族, 分为 3 个亚族, 即金缕梅亚族 Hamamelidineae (仅包括金缕梅属 *Hamamelis*), 木亚族 Loropetalineae (包括木属

Loropetalum, 四药门花属 *Tetrathyrium*, 活瓣花属 *Embolanthera*、马来金缕梅属 *Maingaya*), 马岛金缕梅亚族 (包括马岛金缕梅属 *Dicoryphe*, 毛枝花属, *Ostrearia*, *Neostrearia*, *Noahden-dron*); ②蜡瓣花族 *Corylopsideae* (仅包含蜡瓣花属 *Corylopsis*); ③秀柱花族 *Eustigmateae* (包括秀柱花属 *Eustigma*, 牛鼻栓属 *Fortunearia*, 山白树属 *Sinowilsonia*); ④弗特吉族 *Fothergilleae* (包括 *Fothergilla*, *Parrotiopsis*, *Parrotia*, *Sycopsis*, *Distyliopsis*, *Distylium*, *Molinadendron*, *Matudaea*)^[2]. 银缕梅属是新成立的单种属, 被放入弗特吉族^[9].

表 2 金缕梅亚科及外类群 ITS 区序列 Kimura—2 距离矩阵
Tab 2 Kimura 2—parameter distances among Hamamelioideae and the outgroup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0.0000															
2	0.0531	0.0000														
3	0.0922	0.0939	0.0000													
4	0.1265	0.1189	0.1019	0.0000												
5	0.1384	0.1340	0.1114	0.0403	0.0000											
6	0.1207	0.1169	0.0927	0.0303	0.0371	0.0000										
7	0.1377	0.1286	0.1086	0.0554	0.0660	0.0538	0.0000									
8	0.1437	0.1436	0.1147	0.0710	0.0765	0.0678	0.0791	0.0000								
9	0.1344	0.1330	0.1181	0.0712	0.0803	0.0678	0.0964	0.0948	0.0000							
10	0.1342	0.1328	0.1159	0.0661	0.0787	0.0662	0.0962	0.0897	0.0196	0.0000						
11	0.1272	0.1293	0.1145	0.0678	0.0786	0.0644	0.0964	0.0982	0.0135	0.0150	0.0000					
12	0.1254	0.1275	0.1198	0.0678	0.0821	0.0678	0.0980	0.0999	0.0150	0.0165	0.0105	0.0000				
13	0.1461	0.1428	0.1200	0.0661	0.0787	0.0627	0.0965	0.0949	0.0398	0.0413	0.0320	0.0397	0.0000			
14	0.1347	0.1314	0.1093	0.0558	0.0612	0.0491	0.0778	0.0845	0.0320	0.0304	0.0273	0.0320	0.0320	0.0000		
15	0.1259	0.1260	0.1005	0.0525	0.0580	0.0458	0.0728	0.0764	0.0290	0.0305	0.0243	0.0290	0.0243	0.0105	0.0000	
16	0.1980	0.2108	0.1963	0.1843	0.1907	0.1824	0.1960	0.1889	0.1821	0.1799	0.1783	0.1726	0.1740	0.1644	0.1590	0.0000

ITS 系统发育分析结果表明, 金缕梅族内部明显表现为复系演化的特征, 该族 3 个亚族之间亲缘关系较远。木亚族木属和四药门花属是蜡瓣花族蜡瓣花属的姐妹群, 自展数据支持率为 99%; 马岛金缕梅亚族是秀柱花族关系密切的姐妹群, 自展数据支持率为 95%; 金缕梅亚族则与本研究中的弗特吉族成员构成姐妹群关系, 自展数据支持率为 100%。

木亚族四药门花属和木属外部形态的很多性状相似, 木材解剖特征较一致^[2,3]. ITS 序列分析的结果显示它们是亲缘关系密切的姐妹群。二者与蜡瓣花族蜡瓣花属有许多特征相似, 如木材都具有非常原始的次生木质部, 导管多梯形穿孔, 木薄壁组织贫乏, 花部具不育的叶性器官, 花药二

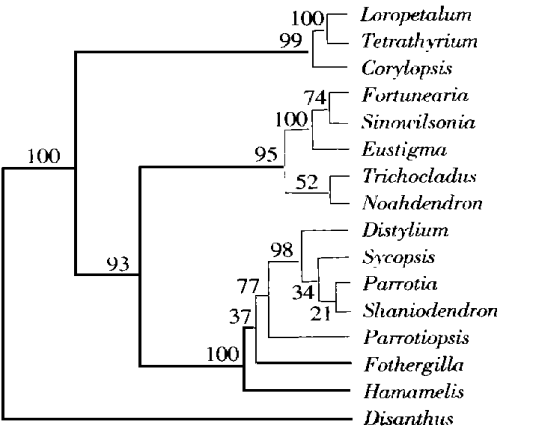


图 1 金缕梅亚科一致树
Fig.1 Consensus tree of Hamamelioideae
图中数字表示 bootstrap 的支持率/%

瓣裂等, 表明其系统位置较近, 但花形态不同; ITS 区的核苷酸差异值较大 (9.2% ~ 9.4%), 因此^[1]木亚族能否归入蜡瓣花族仍需要更深入的研究。

金缕梅属花瓣条形, 花四数, 花着生方式与^[1]木属很相似, 但其它性状有明显的区别。前者分布在温带, 落叶, 花药只有一个花粉囊, 单瓣裂; 后者分布在亚热带, 常绿或半落叶, 花药有 4 个孢子囊, 2 瓣裂^[2]; 花器官在个体发育上差别很大, 维管结构很不相同^[10]; 它们在 ITS 系统树上处于不同的分支 (见图 1), 且核苷酸差异值较大 (12.6%), 说明它们的亲缘关系并不密切^[1~5]。

ITS 系统发育分析还表明, 金缕梅属是弗特吉族的姐妹群, 自展数据支持率为 100%, 它们之间的核苷酸差异值相当小, 只有 1.05% ~ 3.98%, 小于与其它类群间的核苷酸差异值 (5.25% ~ 12.59%)。在形态学特征方面, 金缕梅属与弗特吉属 *Fothergilla* 木材解剖具有较大的一致性, Tang^[3] 认为二属可能有共同的起源; 弗特吉属花粉形态, 弗特吉族各属叶形态, 银缕梅属果枝等与金缕梅属相似, 且金缕梅属、弗特吉属、南亚金缕梅属 *Parrotiopsis* 都是虫媒花^[1~3]; 另外金缕梅属并非严格的四数花, 偶有 5 数花和 3 数花^[4], 花常杂性, 雌花无花瓣, 与弗特吉族 (广义) 是一致的。

关于弗特吉属、南亚金缕梅属、西亚金缕梅属、蚊母树属、水丝梨属、银缕梅属等金缕梅亚科无花瓣类群之间的关系, 章群等 (1999) 已作过较详细的探讨, 不再赘述^[7]。

马岛金缕梅族毛枝花、*Noahdendron* 花药开裂方式独特, 花药每室一瓣裂, 都分布在南半球, 亲缘关系较近^[3]; 毛枝花属具头状或穗状花序, 花单性或雌雄异株, 雄花具花萼花瓣, 雌花无花瓣, 果实具浆果皮, 与山白树属近似。ITS 序列分析的结果显示, 毛枝花属与 *Noahdendron* 之间关系并不是很密切, 它们虽组成了一个单系分支, 但自展数据支持率仅为 52%, 且核苷酸差异值较大 (7.91%); 另一方面马岛金缕梅亚族与秀柱花族各成员间核苷酸差异值较小 (为 5.38% ~ 7.65%), 它们共同组成的一个单系分支获得了 95% 的自展数据支持率。由于缺乏马岛金缕梅亚族另外 3 个属 nr DNA ITS 区序列数据, 马岛金缕梅亚族是独立成族还是与秀柱花族合并马岛金缕梅族, 需进一步研究。

秀柱花属、山白树属和牛鼻栓属木薄壁组织不发达, 导管的梯形穿孔板数目较多^[3]; 托叶线状, 每个枝条上两枚先出叶, 花瓣退化, 蒴果有柄, 具皮孔^[1,2]。来自 ITS 序列分析的结果显示, 这 3 个属之间核苷酸差异值较小, 在 ITS1 区均有一段长达 35bp 的相同缺失, 它们共同组成的单系分支获得了 100% 的自展数据支持率, 说明 3 属亲缘关系密切。

综上所述, 核糖体 DNA ITS 区序列分析的结果和形态解剖证据均表明金缕梅族内部明显表现为复系演化特征, ^[1]木亚族、马岛金缕梅亚族、金缕梅亚族关系较远, 它们分别组成不同的单系分支。^[1]木亚族、金缕梅亚族、马岛金缕梅亚族在分子系统树上的不同位置可能反映了它们进化中的地位。金缕梅属与本研究弗特吉族类群亲缘关系十分密切, 有可能可以合并成一族。^[1]木亚族与蜡瓣花属关系密切, 马岛金缕梅亚族与秀柱花族很近缘; ITS 序列分析的数据还支持将牛鼻栓属和山白树属并入秀柱花族^[4]。

致谢: 中科院北京植物所张志耘博士, 华南植物研究所邢福武、刘念研究员, 江苏植物研究所郝日明先生, 南京林业大学李湘萍老师; 美国加州自然博物馆 P. Fritsch 和 B. Bartholomen 博士; 美国哈佛大学 Arnold 树木园 J. Alexander 博士提供部分实验材料, 谨此致谢。

参考文献:

- [1] 张宏达. 金缕梅科, 中国植物志, 第 35 卷 2 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] ENDRESS P K. A suprageneric taxonomic classification of the Hamamelidaceae[J]. *Taxon*, 1989, 38(3): 371~376.
- [3] BOGLE A L, PHILBRICK T C. A generic atlas of *Hamamelidaceous pollens*[J]. *Contributions from the Gray Herbarium*, 1980, 210: 29~103.
- [4] HARMS H. Hamamelidaceae[C]. In: ENGLER A, PRANTL K eds. *Die natürlichen*[M]. Leipzig, 1930, 2: 18.
- [5] TANG Y. Systematic anatomy of the woods of the Hamamelidaceae[J]. *Bull Fan Memorial Inst Biol*, 1943(1): 8~63.
- [6] SHI S H, CHANG H T, CHEN Y Q, et al. Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS regions of nuclear ribosomal DNA[J]. *Biochem Syst Ecol*, 1998, 26: 55~69.
- [7] 章群, 施苏华, 黄椰林, 等. 金缕梅亚科 ITS 序列分析及其系统发育初探[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 107~110.
- [8] WEN J, ZIMMER E A. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1996(6): 166~177.
- [9] 邓懋彬, 魏宏图, 王希蓁. 银缕梅属——中国金缕梅科一新属[J]. 植物分类学报, 1992, 30(1): 57~61.
- [10] MIONE T, BOGLE A L. Comparative ontogeny of the inflorescence and flower of *Hamamelis virginiana* and *Loropetalum chinense* (Hamamelidaceae)[J]. *Amer J Bot*, 1990, 77: 77~91.

Phylogeny of the Tribe Hamamelideae (Hamamelidaceae) Based on the ITS Sequences

ZHANG Qun^{*}, SHI Su-hua, HUANG Ye-lin, TAN Feng-xiao, JIN Hong

Abstract: The phylogeny of 15 genera representing all tribes and subtribes of Hamamelidoideae was constructed based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) and the 5.8S coding region of nuclear ribosomal DNA using parsimony method with *Disanthus* as an outgroup. The monophyly of the subfamily Hamamelidoideae was strongly supported, however the tribe Hamamelideae was polyphyletic; *Loropetalum* and *Tetrathyrium* of the tribe Loropetalineae, together with *Corylopsis*, forming the basal clade of the Hamamelidoideae; *Trichocladus* and *Noahdendron* of the subtribe Dicoryphineae formed a clade with the tribe Eustigmateae (*Eustigma*, *Sinowilsonia* and *Fortunearia*); and Hamamelidineae (*Hamamelis*) was so closely related to the taxa of the tribe Fothergilleae used in this study (100% bootstrap values) and their sequence divergences were so low, together with other lines of evidences, that they might be treated in the same tribe.

Keywords: Hamamelidoideae; Hamamelideae; nr DNA ITS; phylogeny

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China