

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0039-42

中国主要红树科植物的分子系统发育^{*}

黄椰林¹, 邱小忠¹, 施苏华^{1**}, 蓝崇钰¹, 文 军²

(¹中山大学生命科学学院, 广州 510275; ² Department of Biology, Colorado State University)

摘 要: 测定和分析了红树科 (Rhizophoraceae) 5 属 6 种植物的 rDNA ITS 区序列, 所构建的 ITS 区分子系统树图表明: 红树科植物可形成 1 个单系的类群. 但在部分属种 ITS 序列分析的结果与红树科传统的分类系统有所不同, 陆生红树科植物竹节树属 (*Carallia*) 的竹节树 (*C. brachiata*) 和旁杞木 (*C. pectinifolia*) 之间的分子差异很大, 呈复系演化的特征. 旁杞木与红树林主要植物秋茄属 (*Kandelia*) 的秋茄 (*K. candel*) 和红树属 (*Rhizophora*) 的红海榄 (*R. stylosa*) 的关系较近, 竹节树则与另一红树林的主要种类角果木属 (*Ceriops*) 的角果木 (*C. tagal*) 呈姐妹群关系.

关键词: 红树科, 系统演化, ITS 区, 核糖体 DNA

分类号: Q 949.761.7 Q 751 **文献标识码:** A

红树科植物包括生长在热带、亚热带海岸的“胎生”的红树林主要树种和生长在内陆的非胎生植物. 由于其特殊的生态环境和形态解剖结构, 有关红树科的形态解剖学、生态学、细胞学及区系学等方面的研究吸引了无数的生物学工作者的关注^[1~5]. 红树科自建立以来, 其科下的进一步分类就一直争论不休^[4,5]. 在我国, 红树科主要有 6 属, 13 种, 1 变种, 产于西南至东南部, 而以南部海滩为多, 分属红树族 (Rhizophoreae) 和竹节树族 (Gynotrocheae), 其中的竹节树族为内陆植物, 其代表植物是竹节树 (*Carallia brachiata*)^[2]. 竹节树属 (*Carallia*) 中有 1 类的叶缘是具有锯齿的, 另 1 类是无锯齿的. 有锯齿的类群主要包括锯叶竹节树 (*C. diplopetala*)、肾瓣竹节树 (*C. lanceaefolia*) 和旁杞木 (*C. pectinifolia*). 旁杞木以前常被误认为是锯叶竹节树, 有关资料对两者的形态描述也比较混乱^[1,9], 2 种植物的叶缘都有锯齿, 叶形也较相似, 但锯叶竹节树的花瓣为 14 裂, 与雄蕊同数, 排成 2 轮. 旁杞木的花萼与花瓣裂片同数, 雄蕊 12~14 枚, 雄蕊是花瓣的 2 倍. 我国常见的是旁杞木, 而锯叶竹节树分布在广西, 极其罕见. 这些叶缘有齿的内陆红树科植物和叶缘无齿的内陆类群是否为同一属植物^[1], 本研究拟通过对我国红树科的主要属及其代表种类的 rDNA ITS 区序列分析, 为红树科的系统发育研究提供分子证据.

* 基金项目: 国家自然科学基金 (39570052, 39970057), 广东省自然科学基金 (970190)

** 通讯联系人

收稿日期: 1998-08-01 第一作者简介: 黄椰林, 男, 23 岁, 研究生

1 材料与方法

1.1 材 料

本研究所用植物来源见表 1.

表 1 红树科和外类群的序列和样品来源

Tab 1 Accessions of Rhizophoraceae and the complex outgroup sampled for the ITS studies			
种 类	凭证标本号	序列和样品来源	Genbank 收录号
红海榄(<i>Rhizophora stylosa</i>) ^{* 1)}	Qiu974306	深圳福田自然保护区, 广东	AF105082
木榄(<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>) [*]	Shi044/Qiu974305	深圳福田自然保护区, 广东	AF105084
秋茄树(<i>Kandelia candel</i>) [*]	Shi046/Qiu974303	深圳福田自然保护区, 广东	AF105081
竹节树(<i>Carallia brachiata</i>) [*]	Shi045/Shi9704115	黑石顶自然保护区, 广东	AF105080
旁杞木(<i>Carallia pectinifolia</i>) [*]	Shi057/Shi9704112	黑石顶自然保护区, 广东	AF105079
角果木(<i>Ceriops tagal</i>) [*]	Zhang9711902	东寨港红树林自然保护区, 海南	AF105083
壳菜果(<i>Mytilaria laosensis</i>)	Shi9703054	施苏华等, (待发表)	
桃金娘(<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>) [*]	Shi9704113	黑石顶自然保护区, 广东	AF105085

1) *代表为本研究所测; 分类按 van Vliet G J C M(1976 系统)

1.2 实验方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 采用改进了的 CTAB 法^[7]提取植物总 DNA.

1.2.2 PCR 反应 采用特异性扩增引物 ITS4 (5' TCCTCCGCTTATGATATGC 3'), ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3')按程序(94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 50℃ 2 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min)进行扩增.PCR 反应产物经 Qiagen 公司的 PCR 产物纯化试剂盒纯化.

1.2.3 序列测定 采用双脱氧链终止法, 以 α -³⁵S-dATP 作为放射性标记, 分别采用引物 ITS4、ITS5 及 C5. 8S (5' TGCGTTCAAAGACTCGAT 3'), N5. 8S (5' ATCGAGTCTTTGAACGCA 3')直接测序^[6]. 序列测定采用 DNA 聚合酶测序试剂盒 (T7 DNA sequenase version 2.0 kit). 部分样品(如红海榄和角果木)的序列由 DNA 自动测序仪获得(广州血液中心).

1.2.4 数据处理 所测序列采用 Clustal X 程序^[8]进行对位排列; PAUP 3.1.1 软件包^[9]在

表 2 红树科植物 ITS 区序列距离矩阵¹⁾

Tab 2 Kimura two-parameter sequence divergence values of taxa in Rhizophoraceae and their complex outgroup												
种 类	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>K. candel</i> 46	—	0.141	0.407	0.402	0.372	0.375	0.384	0.025	0.141	0.157	0.313	0.361
<i>C. pectinifolia</i> 57	78	—	0.375	0.403	0.355	0.358	0.373	0.149	0.165	0.035	0.336	0.382
<i>Rh. tomentosa</i> 141	226	218	—	0.378	0.433	0.431	0.412	0.411	0.395	0.392	0.496	0.560
<i>M. laosensis</i> 123	223	234	263	—	0.449	0.459	0.455	0.434	0.434	0.439	0.491	0.553
<i>C. brachiata</i> 45	206	206	283	293	—	0.009	0.380	0.383	0.398	0.378	0.481	0.558
<i>C. brachiata</i> 149	208	208	293	312	6	—	0.376	0.381	0.396	0.377	0.490	0.562
<i>Cer. tagal</i> 244	213	217	286	316	248	256	—	0.393	0.390	0.382	0.485	0.551
<i>K. candel</i> 172	14	86	284	300	249	258	271	—	0.133	0.171	0.384	0.447
<i>R. stylosa</i> 173	78	96	275	302	260	269	271	92	—	0.160	0.387	0.457
<i>C. pectinifolia</i> 146	87	20	272	304	246	255	264	118	111	—	0.401	0.443
<i>B. gymnorhiza</i> 44	171	192	333	330	309	328	326	257	260	269	—	0.017
<i>B. gymnorhiza</i> 174	152	164	297	293	280	297	292	237	242	235	9	—

1) 对角线左下部为绝对距离; 对角线右上部为经过校正的 K_{unc} 值; 缺失位点不参与比较

Macintosh II ci 机上对序列进行统计分析和分支分析, 计算各类群间的核苷酸差异数及差异校正值(K_{mc} 值), 采用最大简约法获得最大简约树; 应用自展法检验系统树, 自展数据为 100 次. 分支分析中采用 *Mytilaria laosensis*, *Rhodomyrtus tomentosa* 作为复合外群组.

2 结 果

测得我国红树科植物主要属的代表种 6 种共 10 个分类群以及作为外群种类的桃金娘科的桃金娘的 ITS 区序列, 各类群的核苷酸差异数及 K_{mc} 值列于表 2 中. 在此基础上, 通过分支分析获得最大简约树列于图 1, 树的总长度为 1 204, Consistency index 为 0. 772, Retention index 为 0. 734, Rescaled consistency index 为 0. 566. 自展数据集中各分支长度和各分支的自展数据支持率见图 1.

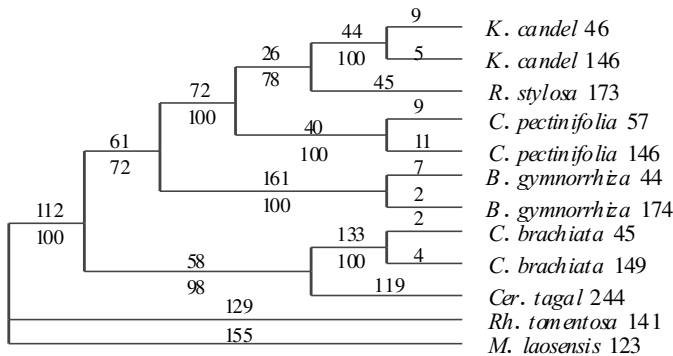


图1 红树科植物 ITS 区序列所构建的最大简约树图

Fig. 1 The most parsimonious tree of Rhizophoraceae based in the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA

3 讨 论

作为一个独立的科, 红树科具有一些共同的特点, 例如其木材纤维具有独特的梯状穿孔。此外, 红树科的筛管分子中普遍存在 PV 亚型的筛分子质体, 在双子叶植物中只有 3 个科 (另外 2 个科是 *Cyrillaceae* 和 *Erythroxylaceae*) 的植物筛管分子具有 PV 亚型的蛋白质积累^[3]。但由于生态环境差异极大, 红树科中各属之间的形态解剖结构差异也非常大。van Vliet^[5] 将红树科植物分为 *Rhizophoreae*, *Anisophylleae*, *Macarisia*, *Gynotrocheae* 等 4 个族, 并列各族所包括不同的属。他认为红树科中生境不同的红树林植物和内陆植物, 出现一些明显的形态解剖上的差别, 但没有足够理由说明这些差异是由于生境不同而引起的。他同时认为红树科植物的木材结构变化很大, 而其中的红树林植物又具有胎生现象及其它的一些共同点, 似乎其进化过程更满足单系起源假说。但事实上, 在相同生境生长的海滩红树科植物以及内陆类群各自内部也存在着较大的形态学上的差异。

根据我国主要红树科植物 ITS 区序列所构建的最大简约树和计算机自展数据值的分析结果(图 1)表明:红树科的所有种类形成一个单系的类群,这个结果得到了 100% 的计算机自展数据值支持,这说明红树科植物虽然是一个差异较大的类群,但它们作为一个科是成立的.从系统发育分析的结果可以看出:红树科系统分类的分子生物学证据与传统的分类有所不同,陆生红树科植物竹节树属的竹节树和旁杞木并非属于同一个分支,而呈复系演化的特征.海滩红树林主要树种 *Kandelia candel* 与 *Rhizophora stylosa* 的关系最近(计算机自展数据值为 78%),它们和内陆红树科植物竹节树属中的有锯齿种类之一旁杞木形成了一个单系类群,这个结果得到 100% 的计算机自展数据值的支持;另一方面,内陆种类

竹节树属中的无锯齿类群竹节树则与 *Ceriops tagal* 为姐妹群关系, 他们形成另一个单系类群 (计算机自展数据值为 98%). 因此, 核糖体 DNA ITS 区序列分析的结果不支持竹节树属 2 个种归于同一属的观点. 此可能提示在红树科的系统发育演化过程中, 竹节树与旁杞木是各自沿不同方向发展的. 关于竹节树属中有锯齿和无锯齿类群间的进一步分子系统学研究正在进行之中.

参考文献:

- [1] 高蕴璋. 红树科的新植物. 植物分类学报, 1978, 16 (2): 109 ~ 110
- [2] 高蕴璋. 红树科. 广东植物志 (第 1 卷). 广州: 广东科技出版社, 1983. 107 ~ 113
- [3] BEHNKE H D. Heidelberg sieve-element plastids of Cryillaceae, Erythroxylaceae and Rhizophoraceae; description and significance of subtype PV plastids. Pl Syst Evol, 1982, 141: 31 ~ 39
- [4] GEH S Y, HSUAN K. Morphological studies on some inland Rhizophoraceae. Gardens' Bulletin, Singapore, X VII, 1974, 183 ~ 221
- [5] VAN VLIET G J C M. Wood anatomy of the Rhizophoraceae. Leiden Botanical Series, 1976 (3): 20 ~ 75
- [6] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴 (第 2 卷). 北京: 科学出版社, 1980. 980 ~ 983
- [7] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19: 11 ~ 15
- [8] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F. The CLVSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4876 ~ 4882
- [9] SWOFFORD D L, PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony, ver 3. 1. 1. Champaign, Illinois: Natural Survey, 1993

The Molecular Phylogeny in Rhizophoraceae in China

HUANG Yelin^{*}, QIU Xiaozhong, SHI Suhua, LAN Chongyu, WEN Jun

Abstract: The nucleotide sequences of ITS rDNA regions from 10 taxa of five genera of Rhizophoraceae family and *Rhodomyrtus tomentosa* (Myrtaceae) as one of the complex outgroup were determined. *Mytilaria laosensis* (Hamamelidaceae) was sampled as the other complex outgroup. All species of Rhizophoraceae formed a monophyletic group which was supported by 100% bootstrap value. There was a high divergence between two species of the inland genus *Carallia*, which were separated into the different clades in the most parsimonious tree. It was showed that the *Carallia pectinifolia* is more closely related to *Kandelia candel* and *Rhizophora stylosa* than to *Carallia brachiata*. In the other hand, there was a sister group relationship between the *Carallia brachiata* and *Ceriops tagal*.

Keywords: Rhizophoraceae, phylogeny, ITS regions of ribosomal DNA

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