

文章编号: 0529-6579 (1999) 03-0063-05

拟单性木兰属近缘植物 *matK* 基因的序列分析^{*}

潘恒昶, 施苏华, 金 虹, 黄椰林, 张宏达

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 测定了木兰科 (Magnoliaceae) 拟单性木兰属 (*Parakmeria*) 等 10 种 (11 个样) 植物的叶绿体 DNA *matK* 基因部分序列 (1 039 碱基对). 最大同源性分析构建的系统树图建议: ① 拟单性木兰属与单性木兰属 (*Kmeria*) 有极近的同源关系; ② 木兰属 (*Magnolia*) 的玉兰亚属 (Subgenus *Yulania*) 与拟单性木兰属和单性木兰属关系亦很近, 并形成 1 个单系分支; 而木兰属的 2 个亚属, 木兰亚属 (Subgenus *Magnolia*) 与玉兰亚属之间的关系却较远, 木兰属内呈并系演化特征; ③ 木兰亚属, 木莲属 (*Manglietia*) 以及玉兰亚属、拟单性木兰属和单性木兰属所组成的分支形成一个单系分支. 拟单性木兰属、单性木兰属的系统位置, 以及它们与木兰属之间的关系需要重新考虑.

关键词: 拟单性木兰属; 木兰科; 叶绿体 DNA *matK* 基因; 系统发育

中图分类号: Q 78 **文献标识码:** A

拟单性木兰属 (*Parakmeria* Hu et Cheng) 与单性木兰属 (*Kmeria* Dandy) 是否成立及其归属一直是木兰科 (Magnoliaceae) 植物分类学研究领域长期争论的问题. 刘玉壶^[1]认为该两属成立, 并同属于木兰族 (Magnolieae) 的木兰亚族 (Magnoliinae). 而 Chen 等^[2]则认为单性木兰属成立, 但拟单性木兰属应归入木兰属 (*Magnolia*). 但也有人认为它们都可以归于木兰属内 (张宏达, 学术讨论). 刘玉壶等^[3]更提出要把单性木兰 *Kmeria septentrionalis* 从单性木兰属中分出, 另立为一属, 即焕镔木属 (*Woonyungia*). 但各家对于它们同属于木兰亚族则都没有异议. 本研究以叶绿体 DNA *matK* 基因为分子指标, 测定了木兰科拟单性木兰属等 10 种植物叶绿体 DNA *matK* 基因的部分序列 (1 039 碱基对), 比较其同源性关系, 从分子系统学角度为探讨拟单性木兰属与单性木兰属的系统位置提供新的证据.

1 材料与方法

1.1 材 料

选用植物的新鲜叶片作为 DNA 提取的材料. 样品来源见表 1.

^{*} 基金项目: 国家杰出青年基金 (39825104); 国家自然科学基金 (39970057); 广东省自然科学基金 (970190) 资助项目 通讯联系人: 施苏华

收稿日期: 1998-10-15 作者简介: 潘恒昶, 男, 1975 年生, 现工作单位: 广州市医药公司.

表 1 本研究所用木兰科和外类群的材料来源

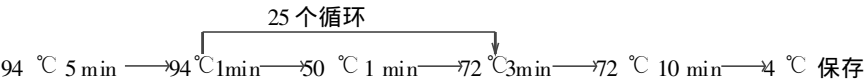
Tah 1 Accessions of Magnoliaceae and its outgroups sampled in this study

编号	种名（属）	标本凭证号	样 品 来 源	注册号
1	红茴香（外类群）	J. P. 274(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123463
2	齿叶阿丁枫（外类群）	Hao155(中山大学)	中山植物园, 南京	AF133223
3	绢毛木兰（木兰属）	T. C01(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123464
4	玉兰（木兰属）	S. Shi306(中山大学)	中山大学校园, 广州	AF123465
5	单性木兰（雌株, 单性木兰属）	J. P. 261(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123471
6	单性木兰（雄株, 单性木兰属）	J. P. 262(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123472
7	云南拟单性木兰（拟单性木兰）	J. P. 264(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123474
8	乐东拟单性木兰（拟单性木兰）	J. P. 263(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123475
9	峨嵋拟单性木兰（拟单性木兰）	T. C02(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123476
10	毛桃木莲（木莲属）	S. Shi 144(中山大学)	黑石顶自然保护区, 广东	AF123477
11	海南木莲（木莲属）	T. C74(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123480
12	鹅掌楸（鹅掌楸属）	J. P. 275(华南植物所)	华南植物园, 广州	AF123481

1. 2 实验方法

1. 2. 1 植物 DNA 的提取与纯化 采用 CTAB 法^[4] 提取植物总 DNA，并用玻璃粉纯化试剂盒（自制）进行纯化。

1. 2. 2 PCR 扩增 *matK* 基因 采用 2 套引物：MG1 与 MG15，*trank*-3914F 与 *trank*-2R（Johrson and Soltis, 1994），其中 MG1 和 MG15 引物扩增的效果较好。PCR 扩增按以下程序进行：



1. 2. 3 PCR 产物的纯化 采用 Ultrafree-MC filters（Millipore）纯化试剂盒，除去未反应的 PCR 引物与 dNTPs。

1. 2. 4 测序 本实验不经分子克隆，而将纯化后的 PCR 产物直接进行双链测序。采用双脱氧链终止法^[3]，用 T₇ DNA Sequenase Version 2. 0 Kit（Amersham），以 α-³⁵S-dATP 作为放射性探针。测序采用了 3 个引物：MS3R, MS2F, *matK*-1470R^[6]。测序反应产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，50 °C 干燥 3 h，放射自显影。

1. 2. 5 数据处理 利用 PAUP 3. 1. 1 软件包^[7] 按照最大同源性原则将所测序列进行排列比较，得出相互间的差异数值即序列间相同点的核苷酸差异数。按照 Kimura^[7] 的公式对核苷酸差异数进行校正：

$$K_{nuc}=1/2ln\left[(1-2P-Q)\sqrt{1-2Q}\right]$$

其中，*P* 为转换型核苷酸差异与总核苷酸数比；*Q* 为颠换型变异与总核苷酸数比。

2 结果与讨论

对测序结果进行最大同源性排列，用 PAUP 3. 1. 1 软件包进行统计分析，得出各种间的核苷酸差异数及 *K_{nuc}* 值，列于表 2。可以看出：单性木兰雌雄株之间序列完全一致，没有 1 个核苷酸的差别；拟单性木兰属的 3 个种之间，仅乐东拟单性木兰（*Parakmeria lotun-*
gensis）有 1 个核苷酸的差异（187 位）；拟单性木兰属与单性木兰属之间只有 3 个核苷

表 2 Kimura 二参数矩阵¹⁾

Tah 2 Kimura two-parameter sequence divergence values of taxa in *Parakmeria* and its related genera of Magnoliaceae

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	—	0.178	0.126	0.118	0.118	0.118	0.120	0.118	0.120	0.120	0.123	0.123
2	113	—	0.149	0.146	0.147	0.147	0.145	0.144	0.145	0.146	0.149	0.157
3	82	150	—	0.013	0.014	0.014	0.012	0.012	0.011	0.012	0.011	0.020
4	77	147	13	—	0.006	0.006	0.005	0.003	0.004	0.011	0.012	0.026
5	77	148	15	6	—	0.000	0.005	0.003	0.004	0.013	0.014	0.027
6	77	148	15	6	0	—	0.005	0.003	0.004	0.013	0.014	0.027
7	78	146	12	5	5	5	—	0.002	0.001	0.012	0.011	0.027
8	7	145	12	3	3	3	2	—	0.001	0.010	0.011	0.026
9	78	146	11	4	4	4	1	1	—	0.011	0.010	0.027
10	78	147	12	11	13	13	12	10	11	—	0.001	0.024
11	79	148	11	12	14	14	11	11	10	1	—	0.026
12	80	145	19	24	25	25	25	24	25	23	24	—

编号同表 1；表中左下角数字为核苷酸绝对差异数，右上角数字为 K_{nuc}

酸（205 位，619 位和 639 位，见表 2）的差别。拟单性木兰属，单性木兰属和木兰属的玉兰亚属的绝对核苷酸差异数仅介于 3~6 之间，而它们与木兰亚属的核苷酸差异数则达 13。拟单性木兰属和单性木兰属与木兰亚属的绝对核苷酸差异数介于 11~15 之间。根据这些数据结果，用 PAUP 3.1.1 软件包，采用穷举法筛选出最佳的 3 棵系统树，列于图 1 中。

关于拟单性木兰属与单性木兰属的系统位置是木兰科分类学研究中长期争议的问题。由于其形态解剖学特征与木兰亚科的其余各属均有重叠现象，有学者^[2,7]将这两属归入木兰属。Canright^[10]根据单性木兰属在

木材解剖形态上与产热带的木兰属种类无区别，也将该属归入木兰属。刘玉壶^[1]则以雌蕊群具柄为主要依据，主张拟单性木兰属应成立，同时也认为单性木兰属应该独立成属。他在 1997 年的新系统中又进一步将单性木兰属中的单性木兰分出来成为一新属，即焕镔木属。Chen 等^[2]亦认为单性木兰为一独立的属。但他们将拟单性木兰归入木兰属内。

本研究的结果表明，在所比较的 1 039 碱基对长的叶绿体 DNA *matK* 基因序列中，拟单性木兰属与单性木兰属之间仅有 3 个核苷酸的差别（见表 2），表明它们之间的关系非常密切，它们组成了 1 个单元的分枝，但此分支仅得到了 57% 的计算机自展数据支持率（bootstrap）的支持。同时，两者与木兰属的落叶种类玉兰亚属（Subg. *Yulania*）的玉兰（*Magnolia denudata*）的核苷酸差异也仅为 3~6 个。从 *matK* 基因序列分析所得的系统发育树图（图 1）中可以看到，玉兰与拟单性木兰属的 3 个种，单性木兰属的雌雄株组成的分

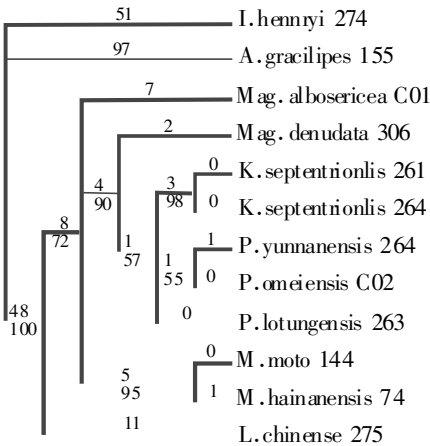


图 1 系统发育树图
Fig. 1 Strict consensus tree

支呈单系演化关系, 这一结果得到了 98% 的计算机自展数据支持率的支持. 值得注意的是, 木兰属的另 1 个亚属常绿的木兰亚属的绢毛木兰 (*Magnolia albosericea*) 则与拟单性木兰、单性木兰及玉兰之间的核苷酸差异则相对较大(绝对核苷酸差异数介于 11 ~ 15 之间, 见表 2 与图 1); 木莲属的 2 个种、木兰亚属、以及玉兰亚属、拟单性木兰属和单性木兰属的共同分支形成 1 个单系的分支, 此得到了 72% 的计算机自展数据值得支持. 这一结果表明, 在 *matK* 基因的序列分析中, 木兰属内部呈并系演化的特征(见图 1). 玉兰亚属与拟单性木兰、单性木兰之间关系比与木兰亚属的关系更近, 此意味着拟单性木兰属和单性木兰属应独立的意见不能得到叶绿体 DNA *matK* 基因序列分析结果的支持. 同时木兰属的木兰亚属与玉兰亚属之间的分子差异相对较大(为 13), 因此, 木兰属、拟单性木兰属、以及单性木兰属的系统位置应该重新考虑. 另一个有意义的结果是木莲属、木兰亚属与玉兰亚属、拟单性木兰属及单性木兰属的分支, 共同形成 1 个单元的分支而与鹅掌楸属分立, 这得到了 72% 计算机数据自展值支持(见图 1). 总体来说, 本研究所分析的所有木兰科植物形成了 1 个单元的类群(其多数支持率为 100%, 见图 1); 这结果表明, 不支持鹅掌楸亚科独立出去成为鹅掌楸科(Liriodendraceae)的主张, 但鹅掌楸属与木兰科的其余各属差异确实相对较大(核苷酸绝对差异数为 19 ~ 25 之间), 将其分为鹅掌楸亚科是合适的.

80 年代以来, 人们常用叶绿体 DNA 的 *rbcL* 基因序列分析来帮助解决系统学上长期悬而未决的问题. 虽然 *rbcL* 基因研究取得一定成果, 但由于 *rbcL* 基因的进化速度较慢, 对于科以下的分类则不能取得令人满意的结果^[10]. 叶绿体 DNA *matK* 基因序列可以弥补 *rbcL* 基因的不足. 已经证明 *matK* 基因序列分析可以用来作科以下水平的系统发育关系的分析^[10, 11]. *matK* 位于叶绿体 DNA *trnK* 基因高度保守的 2 个外显子之间. 以前的研究证实 *matK* 基因的 3' 端比较保守, 而 5' 端则变异较大^[10]. 因此整个 *matK* 基因可以用来作不同水平的系统发育分析. 用于科间水平的分析, *matK* 基因的 3' 端能提供足够的信息; 而用于科内水平的分析, 则 5' 端能提供足够的信息. 本研究的结果发现, 拟单性木兰属和单性木兰属与木兰属的差异还不到所测序列长度的 2%, 木兰属与木莲属的差异也不到 2%. 由此可以看出本研究所测得的 *matK* 基因片段的序列相当保守, 因而对于木兰科内的分类和系统发育研究而言也显得过于保守. 进一步的工作可以集中向 5' 端测得更长些, 或利用某个进化速率更快的基因深入研究木兰科内各类群的系统发育关系.

参考文献:

- [1] 刘玉壶. 木兰科分类系统的初步研究 [J]. 植物分类学报, 1984, 22 (2): 89 ~ 109
- [2] CHEN B L, HANS P N. Notes on Magnoliaceae III: the Magnoliaceae of China [J]. Ann Missouri Bot Gard, 1993, 80: 999 ~ 1104.
- [3] 刘玉壶. 焕镛木属——中国木兰科一新属 [J]. 植物研究, 1997, 17 (4): 353 ~ 356
- [4] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11 ~ 15.
- [5] SANGER F, NICKLEN S, COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74: 5463 ~ 5467.
- [6] 金虹, 施苏华, 潘恒昶, 等. 含笑亚族及其近缘植物 *matK* 因基序列分析. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38 (10): 93 ~ 97.

- [7] KIMUEA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions [J] . J Molec Evol, 1980, 16: 111~120.
- [8] CANEIGHT J E. The comparative morphology and relationships of the Magnoliaceae IV. Wood and nodal anatomy [J] . J Arn Arb, 1955, 36: 110~140.
- [9] SWOFFORD D L. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, ver 4.0 [M] . Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland, 1991.
- [10] STEELE K P, VILGALYS R. Phylogenetic analyses of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene *matK* [J] . Syst Bot, 1994, 19: 126~142.
- [11] HILU K W, LIANG H. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics [J] . Am J Bot, 1997, 84: 830~839.

Phylogeny of *Parakmeria* (Magnoliaceae) and Its Related Taxa Inferred from the *matK* Gene Sequence

PAN Heng-chang, SHI Su-hua^{*}, JIN Hong, HUANG Ye-lin, ZHANG Hong-ta

Abstract: The 1 039 bp sequences of the chloroplast *matK* gene from nine species (ten samples) relating to *Parakmeria* and *Kmeria* of Magnoliaceae were determined. The phylogenetic tree based on Parsimony analysis suggested: ① The three species of *Parakmeria* and the two samples (including male and female) of *Kmeria* were highly homologous, which indicated a very close relationships among them; ② the Subgenus *Yulania* of *Magnolia* was shown very closely to *Parakmeria* and *Kmeria* (the sequence divergences among them were 3~6 in 1 039 bps), and they formed a monophyletic clade. However there is a rather far relationship between the two subgenera Subgenus *Yulania* and Subgenus *Magnolia* (the sequence divergence was 13), which was suggested to be paraphyletic; ③ the monophyly was strongly supported among the Subgenus *Magnolia*, *Manglietia* and the clade of *Magnolia* Subgenus *Yulania*, *Parakmeria* and *Kmeria*. The phylogenetic position of *Parakmeria* and *Kmeria*, and the relationships among them and *Magnolia* need to be re-considered.

Keywords: *Parakmeria*; Magnoliaceae; *matK* gene; phylogeny

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