

文章编号: 0529-6579 (1999) 06-0067-05

含笑亚族植物的 RAPD 分析及其系统学意义^{*}

王 艇¹, 朱建明¹, 苏应娟¹, 曾庆文², 黄 超³

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 中国科学院华南植物园;

3. 湖北中医学院药学系)

摘 要: 利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术分析了 14 种含笑亚族植物. 对 Operon 公司 60 个引物进行筛选, 发现 13 个引物的带型清晰并呈多态性. 该 13 个引物在每个样本中扩增的片段总数在 60~80 个之间. 采用 UPGMA 法对由 RAPD 数据求出的遗传距离进行聚类分析, 得到的结果显示, 植物明显地分为 2 个亚类群, 支持将合果木独立成属与含笑属并列的处理方式; 不同意把观光木从含笑属中独立出来单独成属的观点.

关键词: 含笑亚族; RAPD 分析

中图分类号: Q 949 **文献标识码:** A

狭义木兰科 Magnoliaceae 是被子植物系统学研究中的一个关键类群. 目前国际上有三个关于木兰科最具代表性的分类系统^[1]: Dandy 系统、刘玉壶系统及 Nooteboom 系统. 其中刘玉壶提出了含笑亚族的概念, 包括含笑属、合果木属和观光木属; 而 Dandy 是将含笑属、合果木属与观光木属并列置于木兰族之下; Nooteboom 却认为应将观光木与合果木作为含笑属下单种来考虑.

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析具有成本低、操作简单、分析速度快, 仅需要极微量的模板 DNA 即能获得丰富的多态性特征等优点, 已被广泛应用于研究种属关系、种群关系, 尤其是属下分类单位的分类和进化等方面的研究^[2,3]. 本实验采用 RAPD 分析方法研究了黄兰 (*Michelia champaca* Linn.), 白兰 (*M. alba* DC.), 多花含笑 (*M. floribunda* Finet et Gagnep.), 云南含笑 (*M. yunnanensis* Franch. ex Finet et Gagnep.), 紫花含笑 (*M. crassipes* Law), 含笑花 (*M. figo* (Lour.) Spreng.), 苦梓含笑 (*M. balansae* (A. DC.) Dandy), 黄心夜合 (*M. martinii* (Levl.) Dandy), 乐昌含笑 (*M. chapensis* Dandy), 醉香含笑 (*M. macclurei* Dandy), 深山含笑 (*M. maudiae* Dunn), 金叶含笑 (*M. foveolata* Merr. ex Dandy), 合果木 (*Paramichelia baillonii* (Pierre) Hu), 观光木 (*Tsoongiodendron odoratum* Chun) 等 14 种植物, 目的在于为解决含笑亚族的系统分类问题提供新的分子水平证据.

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (39500013 39700117) 资助项目; 广东省自然科学基金 (950099, 970176) 资助项目; 广州市重点科技攻关资助项目

收稿日期: 1998-12-16 作者简介: 王艇, 男, 1969 年生, 博士, 副教授.

1 材料和方法

1.1 材 料

含笑亚族中 14 个种的材料均采自广州华南植物园，见表 1.

表 1 用于本研究的材料和采集株数

Tab 1 Plant material used in this study

编号	材料	采集株数	编号	材料	采集株数
1	观光木(<i>T. odorum</i>)	3	8	白兰(<i>M. alba</i>)	3
2	乐昌含笑(<i>M. chapensis</i>)	5	9	合果木(<i>P. baillonii</i>)	3
3	含笑花(<i>M. figo</i>)	4	10	深山含笑(<i>M. maudiae</i>)	5
4	黄心夜合(<i>M. martinii</i>)	3	11	紫花含笑(<i>M. crassipes</i>)	4
5	云南含笑(<i>M. yunnanensis</i>)	4	12	金叶含笑(<i>M. foveolata</i>)	6
6	多花含笑(<i>M. floribunda</i>)	4	13	醉香含笑(<i>M. macchurei</i>)	3
7	黄兰(<i>M. champaca</i>)	7	14	苦梓含笑(<i>M. balansae</i>)	4

1.2 方 法

1.2.1 植物 DNA 提取 取所采集的同种含笑亚族植物各株的叶子，各剪取约 0.1 g 混合用于 DNA 提取. 采用 CTAB 法^[4]提取总 DNA . 使用北京原平生物技术公司的玻璃奶试剂盒纯化 DNA，方法：50 μ L DNA 溶液中加入 3 倍体积的溶胶液，混匀. 加入 10 μ L 玻璃奶，混匀，室温静置 5 min. 离心 8 000 r/min 数秒，吸弃上清. 加 125 μ L 漂洗液，用加样器吸漂洗液将玻璃奶冲散均匀，离心弃上清，重复 2 次. 加入 pH 8.0 TE 溶液 20 μ L，混匀，60 $^{\circ}$ C 水浴 5 min，离心 15 000 r/min 数秒，回收上清，重复 1 次. 纯化后 DNA 溶液于-20 $^{\circ}$ C 保存，用于 PCR.

1.2.2 DNA 扩增 每 25 μ L 反应体积含 1 $\times$ Tag 酶 buffer (Promega 公司); 50 ng 总 DNA; 2.0 mmol/L MgCl₂; 100 μ mol/L 的各 dATP、dGTP、dCTP、dTTP (Promega 公司); Tag 酶 2 个单位 (Promega 公司); 1/10 反应体积的引物 (Operon 公司). 对照样品加除总 DNA 以外的以上各成分，用双蒸水代替总 DNA.

在 PCR 仪 (Perkins-elmer cetus model 2400) 上按下列程序进行扩增：94 $^{\circ}$ C 变性 3 min20 s, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延长 2 min, 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min, 1 个循环.

PCR 结果检测：取 20 μ L 扩增产物于 ρ =1.4% 琼脂糖凝胶 (加溴化乙锭至 1.0 μ g/mL), 1 $\times$ TAE 缓冲溶液中电泳，稳压 (5.7 V/cm) 电泳 1 h 20 min, λ -DNA/ *Eco*RI + *Hind* III (Promega 公司) 用作 M_r 标准. 254 nm 紫外灯下观察并拍照记录.

采用 Czekanowski 相似系数计算种间遗传相似程度，用 UPGMA 法对各个种间的相似系数进行聚类分析.

2 结果与分析

2.1 随机扩增引物的筛选

对 3 组 (Operon 公司 A、C 和 E 组) 共 60 个随机引物进行筛选. 仅选用能得到清晰扩增带、对照无假带、扩增假带弱的引物，共 13 个 (表 2) 进行正式的扩增.

表 2 用于本研究的引物及其序列
Tah 2 The primers used in this study and their sequences

引物	序列（5′—3′）	引物	序列（5′—3′）
OPA—10	GTGATCGCAG	OPE—07	AGATGCAGCC
OPA—14	TCTGTGCTGG	OPE—11	GAGTCTCAGG
OPA—16	AGCCAGCGAA	OPE—12	TTATCGCCCC
OPA—17	GACCGCTTGT	OPE—14	TGCGGCTGAG
OPA—18	AGGTGACCGT	OPE—16	GGTGACTGTG
OPC—06	GAACGGACTC	OPE—17	CTACTGCCGT
		OPE—18	GGACTGCAGA

2.2 PCR 扩增结果与相似性系数分析

采用 13 个引物对 14 个样本的总 DNA 进行扩增，每个样本扩增的总带数在 60~80 之间，扩增片段的 M_r 介乎 280 与 3 700 bp 之间（图 1）。每一 DNA 片段被看作一个可区分的分子标记，用于计算各分类群间的相似程度。

根据这些种间遗传距离，采用 UPGMA 法聚类分析，得到一树状分枝图（图 2）。

3 讨 论

对于含笑亚族中含笑属（*Michelia*）、合果木属（*Paramichelia*）及观光木属（*Tsoongiodendron*）的系统分类问题，一直存在争论。Willis 曾经认为合果木可以独立成属，亦可归入含笑属^[3]。后来，Willis 和 Dandy 同意独立成合果木属^[6,7]。李捷^[1]通过分支分析认为合果木属与观光木属能结合在一起形成姊妹类群，并与含笑属的其它类群构成含笑分支。孢粉学证据支持合果木属与观光木属归并于含笑属下，与 Nootboom 观点吻合。木材结构分析证据表明含笑属与合果木属亲缘关系较近，与观光木属亲缘关系更近^[8]。而刘玉壶却认为虽然合果木属花粉与木材解剖特征均似含笑属，但依据幼叶卷折式，花、聚合果形态等较进化特征及地理分布等与含笑亚族其它属有明显区别，应独立成属。而观光木属的枝、叶、花、果等具有进化特征，木材解剖形态也比含笑属进化，此外，观光木属局限的地理分布显然与含笑亚族其它两属迥然不同，属的界限分明，应是独立的单属种，而且是木兰科中最进化的属^[9]。

依据本研究所获得的 RAPD 结果进行分析，从树系图上可以看出含笑亚族植物明显地分为 2 个亚类群：合果木属和含笑属。观光木与紫花含笑遗传距离最近，为 0.387，只能作为含笑属中一个单种来考虑，不能将其独立成属。所以，本研究支持将合果木独立成属与含笑属并列的处理方式；不支持把观光木从含笑属中独立出来单独成属的观点。同时也支持 Dandy 将合果木属与含笑属并列及 Nootboom 所认为的观光木是含笑属下的单种这两个观点，却不支持 Dandy 将观光木属与含笑属并列及 Nootboom 所认为的合果木是含笑属下的单种这两个观点。

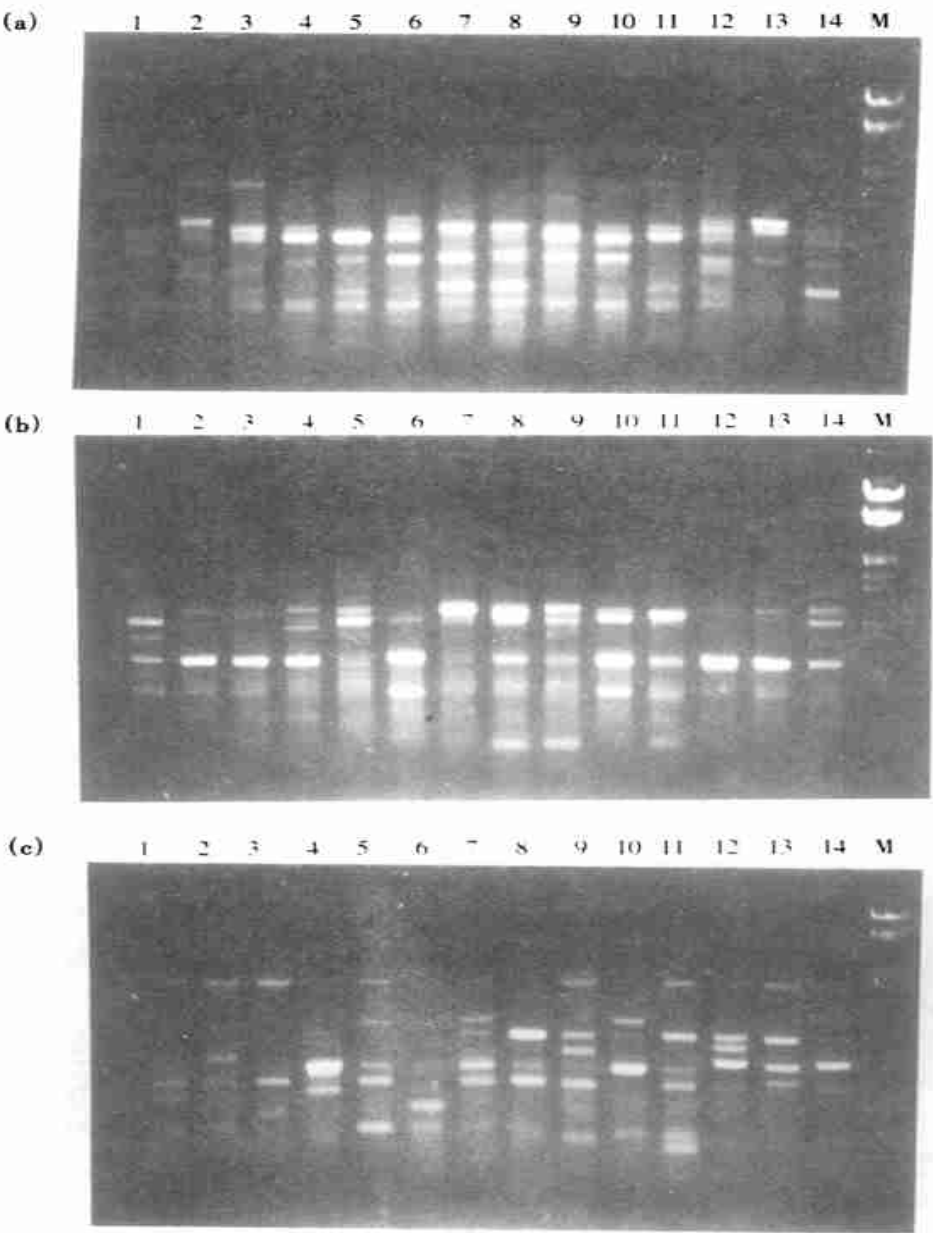


图 1 OPA—10 (a)，OPC—06 (b)，OPE—17 (c) 引物的 RAPD 扩增产物

Fig. 1 RAPD products amplified by OPA—10 (a)，OPC—06 (b)，OPE—17 (c)

1 *T. odorum*; 2 *M. chapensis*; 3 *M. figo*; 4 *M. martinii*; 5 *M. yunnanensis*; 6 *M. floribunda*; 7 *M. champaca*;
8 *M. alba*; 9 *P. baillonii*; 10 *M. maudiae*; 11 *M. crassipes*; 12 *M. foxeolata*; 13 *M. macclurei*;
14 *M. balansae*; M λ -DNA/ *Eco*RI + *Hind* III

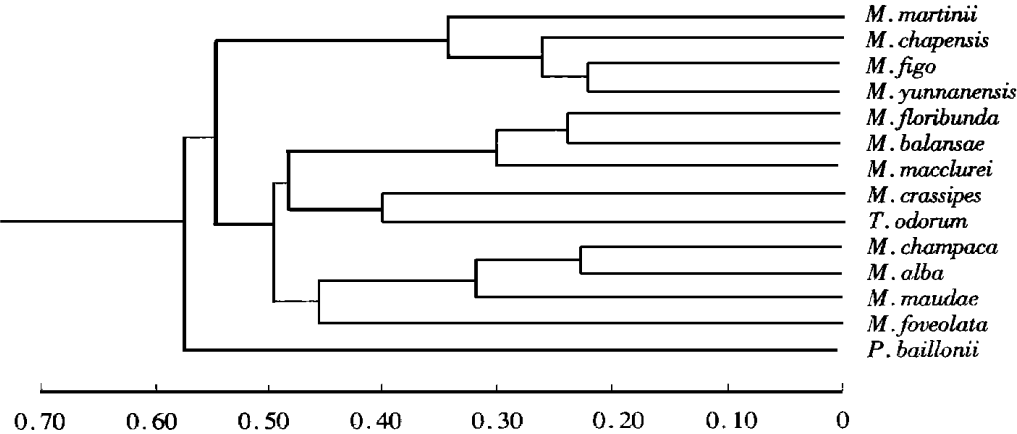


图 2 用 Czekanowski 相似系数分析产生的树状分枝图

Fig. 2 Dendrogram generated by using Czekanowski's coefficient of similarity

参考文献：

[1] 李捷. 木兰科植物的分支分析 [J]. 云南植物研究, 1997, 19 (4): 324~356.
[2] 唐绍清, 施苏华, 陈月琴, 等. 金花茶与近缘种的 RAPD 分析及分类学意义 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1998, 37 (4): 28~32.
[3] 张学勇, 董玉琛, 李培, 等. E 和 St 基因组特异 RAPD 片段在部分小麦族植物中的分布 [J]. 遗传学报, 1998, 25 (2): 131~141.
[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] WILLIS J C. A dictionary of the flowering plants and ferns [M]. London, 1966.
[6] WILLIS J C. A dictionary of the flowering plants and ferns [M]. London, 1973.
[7] DANDY J E. Magoliaceae [A]. In: HUTCHINSON J ed. The genera of flowering plants dicotyledons [C]. Clarendon, Oxford Press, 1964. 50~57.
[8] 张哲增. 香花木的木材解剖 [J]. 植物学报, 1974, 16 (2): 156~158.
[9] 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.

Systematic Relationship of Subtrib Micheliinae Based on Random Amplified Polymorphic DNA

WANG Ting^{*}, ZHU Jian-ming, SU Ying-juan, ZENG Qing-wen, HUANG Chao

Abstract: Fourteen species of subtrib Micheliinae were analyzed, using random amplified polymorphic DNA (RAPD) genetic markers. Sixty primers were screened, 13 selected primers produced clear polymorphic patterns. Each of the 13 primers amplified 60~80 DNA fragments. Generated by using UPGMA algorithm to cluster genetic distances calculated from RAPD data, the results imply: ① The studied species are apparently clustered into two subgroups, *Michelia* and *Paramichelia*; ② separate *P. baillonii* from *Michelia* to establish a new genus *Paramichelia* and it is unreasonable to separate *T. odorum* from *Michelia* to establish a new genus *Tsoongiodendron*.
Keywords: subtrib Micheliinae; RAPD analysis