

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0093-97

含笑亚族及其近缘植物 *matK* 基因序列分析^{*}

金 虹, 施苏华^{**}, 潘恒昶, 黄柳林, 张宏达

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 测定了木兰科等 14 种植物的叶绿体 *matK* 基因的一段长 1 039 碱基对的序列. 最大同源性分析构建的系统树图建议: ① 与一般的分类系统的结果一致, 含笑属的 3 个种间具有极高的同源性; ② 合果木属、观光木属与含笑属之间的同源性也很高, 建议它们有可能可以归为同一亚族, 甚至归为同一属; ③ 与一般分类系统相反, 长蕊木兰属与木兰属的关系较远而与含笑属极接近, 故有可能归入含笑亚族.

关键词: 系统发育关系, 木兰科, *matK* 基因, 含笑亚族

分类号: Q 949.747.1, Q 751 **文献标识码:** A

近年来, 采用分子生物学手段来分析许多存在争议的系统学问题, 已经获得了很大成功^[1]. 其中基因序列分析是比较常用的手段之一. 已经报道用来作序列分析的基因主要有 ITS^[2] 及 *rbcL*^[3] 等. 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, 对于科以下的分类不能取得令人满意的结果^[4]. *matK* 基因全长约为 1 500 碱基对, 位于叶绿体赖氨酸 tRNA 基因 (*tmK*) 的内含子内, 为单一拷贝编码基因^[5]. *matK* 基因所编码的蛋白其羧基端的 102 个氨基酸在结构上与成熟酶样多肽相似, 有可能参与了 II 类内含子的剪接. 大量的实验结果表明在科及科以下分类单元的研究中 *matK* 比 *rbcL* 更合适.

木兰科 (Magnoliaceae) 是被子植物系统发育与进化研究中的关键科, 在各大植物分类系统中均处于原始的位置, 研究木兰科植物的系统发育对于研究整个被子植物的系统发育具有重大意义. 含笑属 (*Michelia* Linn.) 是狭义木兰科中常见的类群之一. 它所包含的种类多少及其在木兰科中的分类地位长期以来争论不休^[6~8].

本论文选取含笑属以及与之相关的有争议的若干个类群, 利用 *matK* 基因序列分析, 来探讨其系统学问题.

1 材料与方法

1.1 材 料

选用新鲜叶片作为材料, 样品来源见表 1.

* 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: 1998-10-15 第一作者简介: 金虹, 女, 22 岁, 研究生

表 1 木兰科和外类群的材料来源（按刘玉壶，1994 系统）

Tah 1 Accessions of Magnoliaceae and the complex outgroup sampled

类 群	标本凭证号	样品来源
<i>Illicium henryi</i>	J. P. 274（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Alcimandra cathcartii</i>	J. P. 271（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Liriodendron tulipifera</i>	J. P. 272（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Magnolia henryi</i>	T. C04（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Magnolia albosericca</i>	T. C01（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Magnolia denudata</i>	J. P. 306（中山大学）	中山大学标本馆，广州
<i>Michelia alba</i>	T. C82（中山大学）	中山大学标本馆，广州
<i>Michelia figo</i>	T. C83（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Michelia foveolata</i>	S. Shi147（中山大学）	黑石顶自然保护区，广东
<i>Paramichelia bailanii</i>	J. P. 269（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Tsoongiodendron ardurum</i>	J. P. 259（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Manglietia moto</i>	S. Shi144（中山大学）	黑石顶自然保护区，广东
<i>Manglietia hainanensis</i>	S. Shi74（华南植物所）	华南植物园，广州
<i>Altingia gracilipes</i>	Haol 55（中山大学）	中山植物园，南京

1.2 方 法

- 1.2.1 植物 DNA 的提取与纯化 采用 CTAB 法^[9] 提取植物总 DNA，并用玻璃粉进行纯化。
- 1.2.2 *matK* 基因片段的扩增 用 2 套引物扩 MG15、*trank*-3914 与 *trank*-2R 增出 *matK* 基因片段 MG1 与（表 2）。PCR 程序为 94 ℃变性 4 min，然后 94 ℃1 min，50 ℃1 min，72 ℃3 min 循环 25 次，最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物用 Millipore 试剂盒纯化以消除没有结合的引物及核苷酸。
- 1.2.3 双链测序 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，用 T₇ DNA Sequenase Version 2.0 Kit（Amersham），并用 α-³⁵S-dATP 作为放射性探针。测序采用了 3 个引物：MS3R，MS2F，*matK*-1470R（见表 2）。测序反应产物用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，序列胶于 50 ℃烘箱干燥 3 h，放射自显影。

表 2 PCR 扩增引物及测序引物

Tah 2 Primers used for PCR and sequencing

引 物	序 列	用途	设计者
<i>Trank</i> -3914F	5' TGGGTTGCTAACTCAATGG 3'	PCR 扩增	Learn Jerry
<i>Trank</i> -2R	5' AACTAGTCGGATGGAGTAG 3'	PCR 扩增	Kely Steele
MG15	5' ATCTGGGTTCGCTAACTCAATG 3'	PCR 扩增	Liang and Hilu
MG1	5' CTACTGCAGAACTAGTCGGATGCAGTAGAT 3'	PCR 扩增	Liang and Hilu
MS3R	5' TA (T/ C) TGAATGAATAGATCGTA 3'	测序	施苏华
<i>matK</i> -1470R	5' AAGATGTTGAT (T/ C) GTAAATGA 3'	测序	Johnson/ Soltis
MS2F	5' CTATATAATTCTCATGTAT 3'	测序	施苏华

- 1.2.4 数据处理 利用 PAUP 3.1.1 软件包^[10] 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^[11] 的公式对核

核苷酸差异数进行校正。根据核苷酸差异数及 K_{mc} 值建立差异矩阵，构建分子系统进化树。用穷举法对 135 000 棵树进行比较，最终得出 15 棵可能的系统树，并由此运算得到计算机自展树（图 1）。

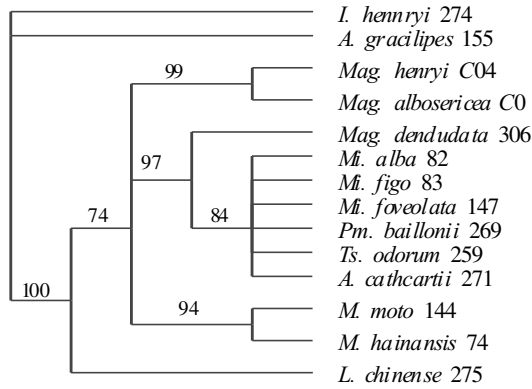


图 1 计算机自展树

Fig 1 Bootstrap tree of the most parsimonious trees

2 结果与讨论

共测得 1 039 碱基对的 *matK* 基因序列。整个序列显示所测得的 *matK* 基因片段 5' 端较为保守，而 3' 端相对而言没那么保守。差异矩阵的结果表明：① 含笑属 3 种 (*Michelia alba*, *M. figo*, *M. foveolata*)、合果木 (*Paramichelia baillonii*)、观光木 (*Tsoongiodendron odorum*) 及长蕊木兰 (*Alcimandra cathcartii*) 之间的核苷酸数差异极小，介于 0~7 之间；② 以上 6 个种与木兰亚属 (*Subgenus Magnolia*) 2 种的木兰 (*Magnolia albosericea*,

M. henryi) 之间的核苷酸差异介于 12~18 之间，约占所测序列的 1%，与鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*) 的差别最高也仅 21，约为 2%；③ 玉兰 (*Magnolia denudata*) 与含笑属有较近的亲缘关系，它们之间有 5~8 个核苷酸的差异。而玉兰亚属 (*Subgenus Yulania*) 的种与木兰亚属的种，其差异是 13~16 个核苷酸，与前者比较，玉兰亚属与木兰亚属的关系较远。计算机自展值（图 1）再现了以上的结果。从图中可以看出 12 种木兰科植物与红茴香 (*Illicium henryi*)、齿叶阿丁枫 (*Altingia gracilipes*) 之间的分子差异很大，形成 1 个独立的单元并得到了 100% 的计算机自展值的支持。图中还显示木兰属、木莲属及含笑属等与鹅掌楸属形成姐妹类群，并得到 74% 的计算机自展值的支持。分子数据分析的结果基本同意把木兰科分为 2 个亚科木兰亚科 (*Magnolioideae*) 及鹅掌楸亚科 (*Liriodendroideae*) 的观点。不支持鹅掌楸属作为 1 个独立科的意见。图中显示木兰亚科分为 3 支，第 1 支为木兰亚属，第 2 支为玉兰亚属、含笑属、合果木属、观光木属及长蕊木兰属，第 3 支为木莲属。它们的计算机自展值分别为 99%，97% 及 94%。在第 2 支中，玉兰亚属与木兰科植物其余 4 个类群形成姐妹类群，而其中支持含笑属等所在的分支的计算机自展值高达 84%。此结果表明含笑属、合果木属、观光木属和长蕊木兰属在 *matK* 基因分子水平上的差异极小，反映它们之间亲缘关系非常密切。

与前人所得的结果相比，*matK* 基因序列分析所得的结果显示：含笑属等木兰科植物系统发育关系在观光木、合果木、长蕊木兰的归属问题上有不同的地方。Dandy 认为观光木应单独成为一属，与含笑属、木兰属等并列归入木兰族。而 Nooteboom 即将观光木作为含笑族内含含笑属的一个组。而本研究的结果显示观光木与含笑属 3 个种的绝对核苷酸差异为 2~4，系统发育关系较近。而观光木与木兰亚属的绝对核苷酸差异数达到了 16~20，与前者比较而言，这两者的关系要远些。含笑属 3 种之间的绝对核苷酸差异为 0~4，与木兰亚属的绝对差异为 12~18。所以建议把观光木属与含笑属列入同一类群。Paglowski 认为在花粉形态上没有足够的证据把合果木列为独立的属。Dandy 和 Nooteboom 则把合果木放

在木兰属内. 刘玉壶^[8]认为合果木的花粉粒的大小、形状和雕纹与含笑属及木兰属中具小粒花粉的种类相类似, 而幼叶卷折式、花、聚合果形态等较进化特征及地理分布等与含笑族其他属有明显区别, 所以将其放在含笑亚族内位于含笑属之后. 本研究的结果显示合果木与含笑属 3 个种的核苷酸绝对差异数为 2~4, 而与木兰亚属的绝对差异数为 14~18, 显然合果木与含笑属的关系, 比合果木与木兰亚属的关系近, 因此支持把合果木放在含笑的同一类群的论点. 长蕊木兰最早为 Dandy 定名, 他把长蕊木兰属与木兰属并列归入木兰族, 且认为长蕊木兰属比较原始. Nooteboom 把它归在木兰亚属内作为 1 个组. 刘玉壶^[8]认为该属既保存着木兰族外部形态的原始特征, 也显示着含笑族中含笑属外部形态与内部结构的进化特征, 因此将本属排列在木兰族内各属之后而与含笑族紧接. 本研究的结果显示, 长蕊木兰与含笑族各属的绝对核苷酸差异为 3~5, 与观光木的差异为 3, 而与木兰属的差异为 14. 因此建议长蕊木兰有可能可以与含笑属归为同一类群.

前人关于木兰科含笑属等类群的研究结果主要基于形态学上的特征^[6~8]. 由于木兰科植物除鹅掌楸属外, 其余各属无论在内部结构与外部形态都有重叠现象, 所以给形态学上的分类带来诸多不确定因素. 基因序列分析在木兰科植物分类上的应用从定量的角度来说, 从另一侧面部分解决了以上问题. 进化速率不同的基因可以用来进行不同水平上的系统发育分析. 整个 *matK* 基因可以用来进行多个水平的系统发育分析^[9]. 对于科间水平的分析来说, *matK* 基因的 3' 端能提供足够的信息, 而科内水平则 5' 端能提供足够的信息. 但木兰科植物的 *matK* 基因序列相当保守, 1 039 碱基对的片段中木兰亚科间的绝对核苷酸差异不到 20 个, 所提供的信息量不够充分. 进一步的工作可以考虑用进化速率更快的基因或结合多个基因的序列进行分析.

参考文献:

- [1] HILLIS D M, MORTIZ C, MABLE B K. Molecular systematics. Sinauer Associates Inc, 1996. 17~29, 321~385
- [2] BALDWIN B G, SANDERSON M J, PORTER J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*, 1995, 82: 247~277
- [3] QIU Y L, CHASE M W, LES D H, et al. Molecular phylogenetics of the Magnoliidae: cladistic analyses of nucleotide sequences of the plastid gene *rtxL*. *Ann Missouri Bot Gard*, 1993, 80: 587~606
- [4] STEEL K P, VILGALYS R. Phylogenetic analyses of Polemoniaceae using nucleotide Sequences of the plastid gene *matK*. *Systematic Botany*, 1994, 19 (1): 126~142
- [5] HILU K W, LIANG H P. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *Ame J Bot*, 1997, 84 (6): 830~839
- [6] DANDY J E. World pollen and spore flora 3. In: DANDY J E. Magnoliaceae taxonomy, 1974. 1~5
- [7] CHEN B L, NOOTEBOOM H P. Notes on Magnoliaceae III: the Magnoliaceae of China. *Ann Missouri Bot Gard*, 1993, 80: 999~1104
- [8] 刘玉壶. 木兰科分类系统的初步研究. *植物分类学报*, 1984, 22 (2): 89~109
- [9] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11~15
- [10] SWOFFORD D L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Champaign: Illinois Natural

History Survey, 1993

- [11] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions. J Molecular Evolution, 1980, 16: 111 ~ 120

Phylogenetic Relationships between *Michelia* (Magnoliaceae) and Its Related Genera Based on the *matK* Gene Sequence

JIN Hong^{*}, SHI Suhua, PAN Hengchang, HUANG Yelin, ZHANG Hongda

Abstract: The sequences of a segment of the *matK* gene from 14 species of the Subtribe Micheliinae and the related groups of Magnoliaceae were analyzed in this study. The phylogenetic trees based on the maximum homological analysis suggested: ① Consistent with the former systems, the three species within the genera *Michelia* were extremely homologous. ② *Paramichelia* and *Tsoongiodendron* were also highly conservative to *Michelia* which suggested they would be treated as the same subtribe, or even as the same genera. ③ Contrast to former classifications, *Alaimandra* was much closer to *Michelia* than to *Magnolia*, and it could be classified in the subtribe Micheliinae.

Keywords: phylogenetic relationship, Magnoliaceae, *Michelia*, *matK* gene, Micheliinae

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