

47323)

从 *rbcL* 序列探讨单室茱萸属的亲缘关系*李耀利¹, 朱华¹, 杨俊波²

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部, 云南 昆明 650223)

(2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要 为了探讨单室茱萸属 *Mastixia* 的亲缘关系, 本文对八蕊单室茱萸 (*Mastixia euonymoides*)、云南单室茱萸 (*M. pentandra* subsp. *chinensis*) 及近缘物种云南紫树 (*Nyssa yunnanensis*) 和毛八角枫 (*Alangium kurzii*) 的 cpDNA 中的编码 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶大亚基的 *rbcL* 基因序列进行了双脱氧测定。通过对这些序列与相关的一些近缘物种的 *rbcL* 序列进行 PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 分析, 得到 4 棵最简约的分支树图。PAUP 分析表明单室茱萸属与大果五加属 *Diplopanax*、紫树属 *Nyssa*、喜树属 *Camptotheca* 和珙桐属 *Davidia* 的亲缘关系最近, 并由分支图支持确立单室茱萸科 Mastixiaceae。

关键词 单室茱萸属 *Mastixia* *rbcL* 序列 系统学

1 引言

单室茱萸属 (*Mastixia*) 自建立以来系统位置经常变动。Blume 最初把单室茱萸属 *Mastixia* 放入忍冬科 Caprifoliaceae, 后来又把它归入紫树科 Nyssaceae。Wight 建立 *Bursinopetalum* (*Mastixia* 的异名), 放入 Olacaceae。Miers 据果实形态把它归入冬青科 Aquifoliaceae。又因该属植物的花相似于常春藤属 *Hedera*, Thwaites 把它归入五加科 Araliaceae, 后来他又把它移入茶茱萸科 Icacinaceae。Baillon 先将 *Bursinopetalum* 并入 *Mastixia*, 后又将它放入五加科 Araliaceae (Matthew, 1976)。*Mastixia* 被归入这么多类群, 说明 *Mastixia* 与这些类群或多或少相象。

20 世纪以来, *Mastixia* 一般作为属或亚科被归入山茱萸科 Cornaceae (Xiang 等, 1993)。例如, Cronquist (1981) 把 *Mastixia* 跟 *Aralidium*、桃叶珊瑚属 *Aucuba*、梣木属 *Cornus*、*Corokia*、*Curtisia*、*Griselinia*、青菜叶属 *Helwingia*、*Kaliphora*、*Melanophylla* 和鞘柄木属 *Toricellia* 一起归入 Cornaceae, 并且 Cornaceae 跟八角枫科 Alangiaceae、Nyssaceae (*Nyssa*、*Camptotheca* 和 *Davidia*) 和 Garryaceae 一起组成山茱萸目 Cornales。Harms (1898)、Wangerin (1910)、Takhtajan (1980) 和 Eyde (1988) 把此属上升为 Cornaceae 单室茱萸亚科 Mastixioideae。但是, 也有人如 Bullock (1958)、Takhtajan (1987, 1997) 和朱伟华等主张将此属独立为或放入单室茱萸科 Mastixiaceae (Matthew, 1976; 朱伟华等, 1999; 汤彦承等, 1998)。

马蹄参属 (*Diplopanax*, 仅大果五加 *D. stachyanthus* Hand - Mazz 一种) 最初被置于 Araliaceae, 后来渐被归入 Cornaceae 或 Mastixiaceae。朱伟华等 (1998a, 1998b, 1999) 和

* 基金项目: 云南省基金 98C096M, 中科院百人计划, 中科院 KSCX2-1-06B 课题支持项目。

向其柏 (1988) 对 *Diplopanax* 进行了形态解剖学、木材解剖学、生物化学和孢粉学方面的研究, 支持 *Diplopanax* 不适合置于 Araliaceae 的观点, 并基于 5 点提出将单室茱萸类群 (包括 *Mastixia* 和 *Diplopanax*) 作为 Cornales 中的一个科——Mastixiaceae。

以上对 *Mastixia* 的研究是基于形态学和古植物学等非分子的分类方法。向秋云等 (Xiang 等, 1998, 1996, 1993) 根据基因序列 (rbcL, matK, rbcL - matK,) 研究了 Cornaceae 各属之间及 *Cornus* 属下物种之间的亲缘关系, 由他们的研究看出 *Aucuba*、*Corokia*、*Griselinia*、*Helwingia*、*Kaliphora*、*Melanophylla* 和 *Toricellia* 等与 *Mastixia* 亲缘关系比较远, 而其它属如 *Cornus*、*Alangium*、*Curtisia*、*Nyssa*、*Camptotheca* 和 *Davidia* 与 *Mastixia* 关系较近。在以上研究的基础上, 本研究进一步探讨 *Mastixia* 与上述几个近缘属哪个关系更相近, 并依据结果分析 *Mastixia* 属的系统位置。此研究为进一步研究 *Mastixia* 属 (科) 植物的系统进化和生物地理研究提供基础。

本研究共选类群 10 个, 除了在网上可查到的类群外, 其它物种由作者亲自采自云南南部, 它们的 rbcL 基因序列也由作者亲自测得。本研究所采用的方法是基于 rbcL 基因片段的 PAUP 分析法。

2 材料和方法

2.1 研究类群

依据前人的研究资料 (Xiang 等, 1993; 1998; Chase 等, 1993), 选择的研究类群共有 10 个。物种珙桐 *Davidia involucrata*、大果五加 *Diplopanax stachyanthus*、喜树 *Camptotheca acuminata*、*Curtisia dentata*、八角枫 *Alangium chinensis* 和长圆叶柞木 *Cornus oblonga* 的 rbcL 序列来自 GenBank 数据库 (网址: www. ncbi. nlm. nih. gov)。它们的 accession number 分别是 L11223、L11224、L11211、L11222、L11209 和 L11218。云南紫树 *Nyssa yunnanensis*、长毛八角枫 *Alangium kurzii*、八蕊单室茱萸 *Mastixia euonymoides* 和云南单室茱萸 *M. pentandra subsp. chinensis* 的叶片采自云南南部勐宋和勐腊县勐仑。

2.2 方法

本研究中的分子实验部分和数据分析部分是在中国科学院昆明植物研究所分子生物地理学实验室进行的。

2.2.1 总 DNA 的提取

从硅胶干燥过的叶片提取总 DNA, 提取方法为改良的 CTAB 法 (Doyle 等, 1987)。

2.2.2 PCR 扩增反应

以 rbcL1F (5'ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT 3') 和 1496R (5'GAT TGG GCC GAG TTT AAT TAC 3') 为扩增引物 (棒宇星等, 1998), 在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上扩增 rbcL 片段。PCR 反应在 20 μ l 体积中进行, 内含 14 μ l ddH₂O, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ l, 引物各约 0.5 μ l, dNTP 2 μ l, 聚合酶 (Taq E) 0.5 μ l 和总 DNA 0.1 μ l。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1min, 52 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 冰箱

贮存。扩增产物用华舜公司 Watson's Purification Kit PCR 纯化试剂盒进行纯化以除去未参加反应的引物及核苷酸后直接用于测序。

2. 2. 3 DNA 序列的测定

测序反应在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上进行, 反应体积为 5 μ l, 内含引物 (分别为 rbcL1F, rbcL991R (5' CGG TAC CAG CGT GAA TAT GAT 3'), rbcL1496R, 来源同上) 0.5 μ l, 模板 1.0 μ l, dd H₂O 1.5 μ l, 2 μ l mix (PE 公司的 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction DNA Sequencing Kit)。测序反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 10s, 50 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 4min, 30 个循环, 最后置于 4 $^{\circ}$ C 保存。测序产物在 PE 公司的 ABI 310 自动测序仪上进行电泳检测。

2. 2. 4 序列分析

用 Clustal X (Toby Gibson et al., EMBL, Heidelberg, Germany) 软件对所测序列进行排序后, 用 PAUP4.0 8b (Swofford, 2001) 软件构建分支树图。Paup 分析采用启发式搜索 (Heuristic search) 的方法。启发式搜索的主要选项为: SIMPLE 数据加入顺序, MULTREES ON, TBR 分支交换算法, 序列空位 Gap 当作缺失 missing。为了评估各个分支的可信性, 还进行了靴带分析 (Bootstrap analysis)。靴带分析的主要选项为: 重复次数 1000, Gap = missing, SIMPLE 数据加入顺序, TBR 等。在本步分析中, 依向秋云等 (Xiang 等, 1998, 1993) 和 Chase (1993) 等的工作, 选长圆叶柃木 (*Cornus oblonga*)、毛八角枫 (*Alangium kurzii*) 和八角枫 (*Alangium chinensis*) 为外类群。

3 结果

DNA 测序得到 4 个物种的 rbcL 序列, 长 1338 - 1396bp。这几个序列已存于 GenBank 数据库中 (accession numbers 为 AF384106 - AF384109)。排序后的 rbcL 序列长 1416bp, Gap 作缺失 missing 处理时, 变异位点 65bp, 信息位点 57bp。各类群间的遗传距离见表 1。

表 1 各类群间的遗传距离

Table 1 Pairwise distances between taxa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	0.024	0.017	0.028	0.006	0.033	0.030	0.020	0.024	0.034
2	33	-	0.013	0.027	0.020	0.032	0.034	0.014	0.019	0.039
3	22	17	-	0.030	0.013	0.035	0.030	0.014	0.014	0.036
4	38	38	40	-	0.026	0.038	0.036	0.030	0.039	0.042
5	8	28	18	36	-	0.029	0.029	0.016	0.022	0.034
6	46	45	47	53	41	-	0.036	0.032	0.041	0.041
7	41	48	40	51	41	50	-	0.031	0.037	0.008
8	27	19	19	42	22	45	43	-	0.020	0.037
9	32	26	19	52	30	55	50	27	-	0.041
10	47	54	49	59	47	57	11	52	55	-

注: 右上角为平均遗传距离, 左下角为绝对遗传距离。类群有 (OUTs): 1. 云南单室茱萸 *M. pentandra* subsp. *chinensis*; 2. 喜树 *Camptotheca acuminata*; 3. 大果五加 *Diplopanax stachyanthus*; 4. *Curtisia dentata*; 5. 八蕊

单室茱萸 *Mastixia euonymoides*; 6. 长圆叶柞木 *Cornus oblonga*; 7. 毛八角枫 *Alangium kurzii*; 8. 珙桐 *Davidia involucrata*; 9. 云南紫树 *Nyssa yunnanensis*; 10. 八角枫 *Alangium chinensis*。

* Below diagonal are absolute distances while above diagonal are mean distances.

以 *Alangium kurzii*、*Alangium chinensis* 和 *Cornus oblonga* 为外类群，Gap 作缺失 (missing) 处理，用启发式搜索法 (heuristic search) 找到 4 棵最简约系统树。图 1 为其中之一，此分支树图步长为 167 步，一致性指数 CI 为 0.7844，保持性指数 RI 为 0.6436。其它 3 棵简约树与图 1 分支结构相同，只是 *Davidia involucrata*、*Nyssa yunnanensis* 和 *Diplopanax stachyanthus* 位置互换。

图 2 为 4 棵简约树的严格一致树，靴带分析 (bootstrap) 值位于分支的上方。在内类群中，*Curtisia* 位于最基部，是 *Diplopanax*、*Nyssa*、*Camptotheca*、*Davidia* 和 *Mastixia* 的姐妹群。*Mastixia*、*Diplopanax*、*Nyssa*、*Camptotheca* 和 *Davidia* 组成一个单系支，靴带值为 69%。其中两个 *Mastixia* 聚在一起 (靴带值为 97%)，是其它属各种的姐妹群。*Camptotheca*、*Davidia*、*Diplopanax* 和 *Nyssa* 组成多歧分支 (靴带值为 79%)。

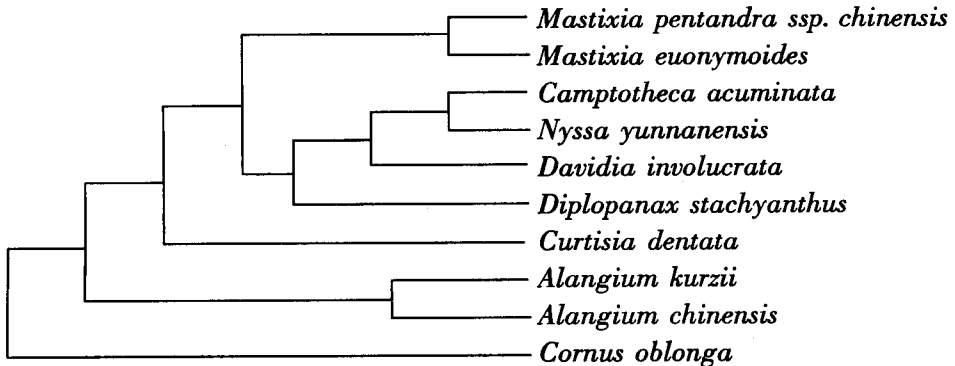


图 1 Paup 分析 rbcL 序列所得的 4 棵最简约分支树图 (分支图步长 = 167 步, CI = 0.7844, RI = 0.6436) 之一。Alangium kurzii、Alangium chinensis 和 Cornus oblonga 为外类群。

Fig. 1 One of the four most parsimonious trees resulting from Paup analysis of rbcL sequences of *Mastixia* and its relatives, using *Alangium* and *Cornus* as outgroups. The tree has 167 steps with CI = 0.7844, RI = 0.6436.

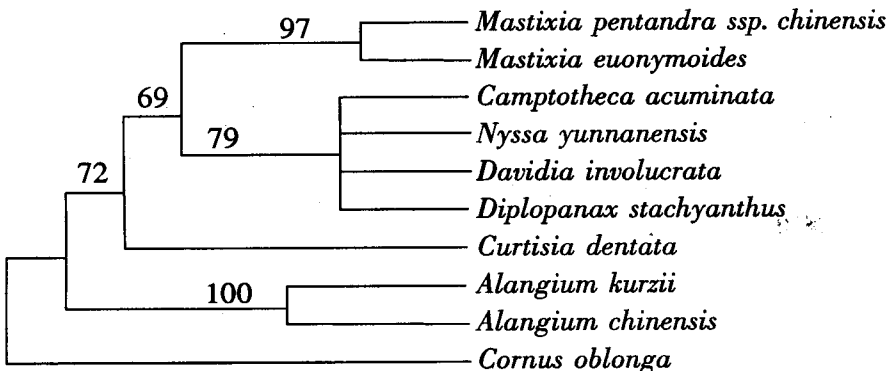


图 2 4 棵最简约树的严格一致树。靴带分析的支持率位于分支的上方。

Fig. 2 the strict consensus tree of four most parsimonious trees. Bootstrap values (%) are indicated above branches.

4 讨论

Mastixia 作为属的等级及其系统位置争议较多。正如前文所述, *Mastixia* 曾放入 Caprifoliaceae、Nyssaceae、Olacaceae、Aquifoliaceae、Araliaceae 和 Icacinaceae 等 (Matthew, 1976)。20 世纪随着研究的深入, 越来越多的学者发现它与 *Nyssa*、*Camptotheca*、*Diplopanax*、*Cornus* 和 *Davidia* 等关系较近。形态解剖学上, *Mastixia* 与 *Diplopanax* 子房 1 室 1 胚珠, 胚弯曲, 果实开裂方式相同等 (朱伟华等, 1998b; Eyde 等, 1990); 植物化学上 *Mastixia* 与 *Camptotheca*、*Diplopanax*、*Nyssa* 和 *Davidia* 均属于富含亚油酸系列的植物 (朱伟华等, 1998b); 从古植物学 (向其柏, 1988) 和木材解剖学 (朱伟华等, 1998a) 上看, *Mastixia* 和 *Camptotheca*、*Diplopanax*、*Nyssa* 和 *Davidia* 也相近。本文的 rbcL 序列分析得到的分支图显示 *Mastixia* 与 *Camptotheca*、*Diplopanax*、*Nyssa* 和 *Davidia* 组成一个单系支, *Mastixia* 确为它们的姐妹群。这跟向秋云等 (Xiang 等, 1998) 的分子生物学研究结果相似。由遗传距离表可看出, 两个单室茱萸之间的距离为 8, *Mastixia* 与 *Camptotheca*、*Diplopanax*、*Nyssa* 和 *Davidia* 之间的距离为 18 - 33, *Mastixia* 与 *Cornus*、*Alangium* 和 *Curtisia* 的距离为 36 - 47。遗传距离表也显示 *Mastixia* 与 *Camptotheca*、*Diplopanax*、*Nyssa* 和 *Davidia* 关系较近。

分支图中, *Mastixia* 分支为 *Camptotheca*、*Diplopanax*、*Nyssa* 和 *Davidia* 组成分支的姐妹群。所以, 作者认为将 *Mastixia* 提升为单室茱萸科 Mastixiaceae, 跟 Nyssaceae 一起置于 Cornales 较合理。

Diplopanax 最初被放入 Araliaceae。如上所述, 越来越多的证据支持将它归入广义 Cornaceae, 跟 *Mastixia* 关系最近 (武素功, 1997; 曾沧江, 1983; Eyde 等, 1990)。本文的序列分析和向秋云等 (Xiang 等, 1998) 的序列分析也都支持将它放入广义 Cornaceae。可是, 在向秋云等的序列分析结果中, *Diplopanax* 与 *Camptotheca* 或 *Davidia* 最近 (靴带值小于 60%); 在本研究所得的分支图中, *Diplopanax* 与 *Nyssa*、*Camptotheca* 和 *Davidia* 聚合在一起组成多歧支 (靴带值为 79%)。从分子生物学证据看, *Diplopanax* 并不与 *Mastixia* 的关系最近。所以, 本文中所提的 Mastixiaceae 不包括 *Diplopanax*。

总之, 本研究表明 *Mastixia* 与 *Camptotheca*、*Diplopanax*、*Nyssa* 和 *Davidia* 有较为密切的关系。*Mastixia* 提升为山茱萸目 Cornales 单室茱萸科 Mastixiaceae 的等级较为合理。

致谢: 昆明植物所分子生物地理学实验室的李德铨研究员, 刘爱忠, 王峰, 孟少武, 陈永燕, 尹廷双, 田欣和郭振华等老师和同事给予了很大帮助, 西双版纳热植园王洪老师和彭国婉同事帮助采集样品, 在此深表感谢!

参考文献

[1] 向其柏, 1988. 中国五加科花粉形态研究 [J]. 植物研究, 8 (1): 13 - 48

- [2] 朱伟华, 向其柏, 1999. 马蹄参属的解剖学特征及其系统学意义 [J]. 植物研究, 19 (3): 286 ~ 291
- [3] 朱伟华, 向其柏, 甘习华等, 1998a. 马蹄参属木材解剖特征及其系统学意义 [J]. 四川农业大学学报, (1): 106 ~ 109
- [4] 朱伟华, 向其柏, 鸥惠英, 1998b. 马蹄参属种子油脂脂肪酸的特征及分类学意义 [J]. 植物资源与环境, 7 (1): 27 ~ 30
- [5] 汤彦承, 路安民, 1998. A. 塔赫他间著《有花植物多样性与分类》读后记述 [J]. 植物分类学报, 36 (2): 178 ~ 192
- [6] 武素功, 1997. 活化石植物 - 马蹄参 [J]. 植物杂志, 97 (1): 23
- [7] 棒宇星, 汪小全, 潘开玉等, 1998. rbcL 基因序列分析对连香树科和交让木科系统位置的重新评价 - 兼论低等金缕梅类的关系 [J]. 植物分类学报, 36 (5): 411 ~ 422
- [8] 曾沧江, 1983. 马蹄参属 *Diplopanax* Hand - Mazz 的系统位置 [J]. 植物分类学报, 21 (2): 151 ~ 152
- [9] Chase M W, Soltis D E, Olmstead R G, *et al*, 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 80: 528 ~ 580
- [10] Doyle J J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 ~ 15
- [11] Eyde R H, Xiang Q Y, 1990. Fossil Mastixioid (Cornaceae) alive in eastern Asia [J]. *Amer J Bot*, 77 (5): 689 ~ 692
- [12] Matthew K M, 1976. A revision of the genus *Mastixia* (Cornaceae) [J]. *Blumea*, 23: 51 ~ 93
- [13] Xiang Q Y, Soltis D E, Soltis P S, 1998. Phylogenetic Relationships of *Cornaceae* and close relatives inferred from matK and rbcL sequences [J]. *Amer J Bot*, 85 (2): 285 ~ 297
- [14] Xiang Q Y, Soltis D E, Morgan D R, *et al*, 1993. Phylogenetic relationships of *Cornus* L. *sesnu lato* and putative relatives inferred from rbcL sequence data [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 80: 723 ~ 734
- [15] Xiang Q Y, Brunnsfld S J, Soltis D E, *et al*, 1996. Phylogenetic relationships in *Cornus* Based on chloroplast DNA restriction sites: implications for biogeography and character evolution [J]. *Syst Bot*, 21: 515 ~ 534

The phylogenetic relationships of the genus *Mastixia* : Evidence from rbcL sequence analysis

Li Yaoli^[1], Zhu Hua^[1], Yang Junbo^[2]

(1 Kunming Division of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, CAS, Kunming 650223, China;

2 Kunming Institute of Botany, CAS, Kunming 650204, China)

Abstract: In order to reveal the phylogenetic relationships of *Mastixia*, the rbcL sequences of two species of *Mastixia* (*M. pentandra* ssp. *chinensis* and *M. euonymoides*) and other two possible close affinities *Nyssa yunnanensis* and *Alangium kurii* were sequenced. Paup analysis was made based on our sequences and some other rbcL sequences of close taxa from GenBank database. Four most parsimonious trees were obtained. It is revealed that the genus *Diplopanax* and the family Nyssaceae (*Nyssa*, *Camptotheca*, *Davidia*) have the closest affinities to *Mastixia* from the trees. Our results support that the genus *Mastixia* should be given a family state in Cornales.

Key words: *Mastixia*; rbcL sequences; phylogeny.