

# 三尖杉科植物 RAPD 分析及其系统学意义<sup>\*</sup>

王 艇<sup>1</sup> 苏应娟<sup>1</sup> 黄 超<sup>2</sup> 朱建明<sup>1</sup>

(1 中山大学生命科学学院 广州 510275) (2 湖北中医学院药理学系 武汉 430061)

**提 要** 利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术分析了三尖杉科 (Cephalotaxaceae) 植物三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* Hook. f.、粗榧 *Cephalotaxus sinensis* (Rehd. et Wils.) Li、海南粗榧 *Cephalotaxus hainanensis* Li 和篦子三尖杉 *Cephalotaxus oliveri* Mast., 经筛选 Operon 公司的 4 组 80 个引物, 其中 14 个引物的谱带清晰呈多态性。采用 UPGMA 法对各样本之间的遗传距离进行聚类分析, 结果显示: 在三尖杉科内建立篦子三尖杉组 (Sect. *Pectinatae*) 和三尖杉组 (Sect. *Cephalotaxus*) 是合理的。

**关键词** 三尖杉科, RAPD, 系统发育关系

一般认为三尖杉科 (Cephalotaxaceae) 仅包括三尖杉属 (*Cephalotaxus*) 一属, 分布于东亚及中南半岛北部, 主产中国。郑万钧和傅立国在《中国植物志》第七卷中主张全属宜分为 8 ~ 9 种和 4 变种<sup>[1]</sup>。

三尖杉属是 Siebold 和 Zuccarini 命名的, 最早由 Endlicher 记入《植物属志补编》(Genera Plantarum Supplementum), Eichler 把此属置于红豆杉科。早期把三尖杉属作为红豆杉类处理, 可能是由于和所有红豆杉类一样它们的木质部也具次生螺纹增厚, 以及对雌、雄球果的了解不足。Neger 认为三尖杉属的雌球花极为特殊, 与红豆杉科区别显著, 首次建立三尖杉科, 只包括三尖杉属。

目前对三尖杉科的比较形态学、木材显微结构、花粉形态及其外壁超微结构、配子体发育、胚胎发生、细胞学及植物化学研究发现, 篦子三尖杉 (*Cephalotaxus oliveri*) 和三尖杉属的其余种类相比, 特征独特<sup>[2~8]</sup>, 建议三尖杉属分为三尖杉组 (Sect. *Cephalotaxus*) 和篦子三尖杉组 (Sect. *Pectinatae*)。但有关三尖杉科植物的分子系统学和进化遗传学研究的报道却非常有限。

笔者采用 RAPD 技术研究了三尖杉科植物三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* Hook. f.、粗榧 *Cephalotaxus sinensis* (Rehd. et Wils.) Li、海南粗榧 *Cephalotaxus hainanensis* Li 和篦子三尖杉, 在分子水平上对三尖杉科植物的系统发育进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

4 种植物材料来源见表 1, 凭证标本藏于广州中国科学院华南植物园。

### 1.2 植物 DNA 提取

分别选择每种植物 3 个个体的叶片, 混合。取植物新鲜叶片 0.5 g, 在液氮中迅速研磨成粉末, 分装于 4 个 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 每管加 -20℃ 丙酮 1 mL 轻轻振荡 1 min, 5 000 r/min 离心 10 min,

收稿日: 1998-09-29, 修回日: 1998-12-23。第一作者: 男, 1969 年出生, 副教授 (博士), 从事植物分子生物学研究。

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金 (39500013, 39700117) 和广东省自然科学基金 (950099, 970176) 资助项目。

弃上清,重复 1 次。每管加入 60  $\mu\text{L}$  预热 CTAB 提取液 1 mL,充分混匀,60  $^{\circ}\text{C}$  保温 4 h。500  $\mu\text{L}$  氯仿 异戊醇(24 :1)抽提 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,重复 1 次。取水相,加入 2/3 体积冷异丙醇,轻轻混合,可见絮状沉淀,2 000~3 000 r/min 离心 3 min,弃上清液取沉淀。每管加入 800  $\mu\text{L}$  清洗液,室温下作用 20 min,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,自然晾干。用 70  $\mu\text{L}$  TE 溶解。1.4% 琼脂糖凝胶(加溴乙锭至 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),100V 电泳 0.5 h,紫外灯下观察照相。752 型分光光度计上波长 260 nm 及 280 nm 处测定吸光度值,根据  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值判断 DNA 样品的纯度,由  $\text{OD}_{260}$  的值估算浓度。采用原平皓生物技术公司的 glass-milk 纯化试剂盒纯化 DNA。

1.3 DNA 扩增

扩增反应在 ERICOMP 公司 PCR 仪上进行。反应体积 25  $\mu\text{L}$ ,包括  $\text{H}_2\text{O}$  16.5  $\mu\text{L}$ ,PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ ,dNTP 1  $\mu\text{L}$ ,引物 1  $\mu\text{L}$ ,模板 2  $\mu\text{L}$ (50~160  $\mu\text{g}$ ),Taq 酶 2  $\mu\text{L}$ (1.5U),反应混合物用 20  $\mu\text{L}$  石蜡油覆盖。扩增条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 200 s;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,36  $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。每次扩增反应均设置不含 DNA 模板的空白对照。RAPD 产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳(加溴乙锭至 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )分离,于紫外灯下观察照相。10 碱基寡核苷酸随机引物购自 Operon 公司(A 组、C 组、D 组、E 组)。RAPD 试剂盒购自北京通康生物技术有限公司。分子量标记购自中山大学生物工程研究中心真核分子生物学实验室。其余试剂为国产分析纯试剂。

1.4 数据处理

任意 2 个样本间的遗传距离( $D$ )根据以下公式计算:

$$D = 1 - F,$$
$$F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y),$$

其中  $N_X$ 、 $N_Y$  分别是样本 X、样本 Y 扩增出的 DNA 片段总数, $N_{XY}$ 是样本 X 和样本 Y 共有的 DNA 片段数, $F$  为任意两样本之间的相似性系数。

根据遗传距离采用 UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)法进行聚类分析,构建树系图。

2 结果

对 Operon 公司的 4 组 80 个引物(A1~20,C1~20,D1~20,E1~20)进行筛选,其中 15 个引物(表 2)的

表 2 引物及其序列

Table 2 The primers and their sequences

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
OPA-07	GAAACGGGTG	OPC-11	AAAGCTGCGG	OPE-11	GAGTCTCAGG
OPA-14	TCTGTGCTGG	OPD-11	AGCGCCATTG	OPE-12	TTATCGCCCC
OPA-17	GACCGCTTGT	OPE-04	GTGACATGCC	OPE-14	TGCGGTGAG
OPC-06	GAACGGACTC	OPE-07	AGATGCAGCC	OPE-16	GGTGACTGTG
OPC-08	TGGACCGGTG	OPE-08	TCACCACGGT	OPE-18	GGACTGCAGA

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳能得到分离良好的带型, 其中 14 个引物扩增谱带呈多态性(图 1)。三尖杉科产生 94 条不同分子量的谱带, 其中 60 条带表现多态性(占 77. 5%); 4 种植物材料中, 除引物 C-11 扩增带型完全相同外, 其余各引物几乎均有 1~2 条较明显的主扩增带。计算 4 种植物材料间的遗传距离(表 3), 采用 UPGMA 法进行聚类分析, 构建树系图(图 2)。结果表明, 三尖杉科中篦子三尖杉与该科其他植物的亲缘关系较远。在树系图上, 篦子三尖杉独自聚为一类。

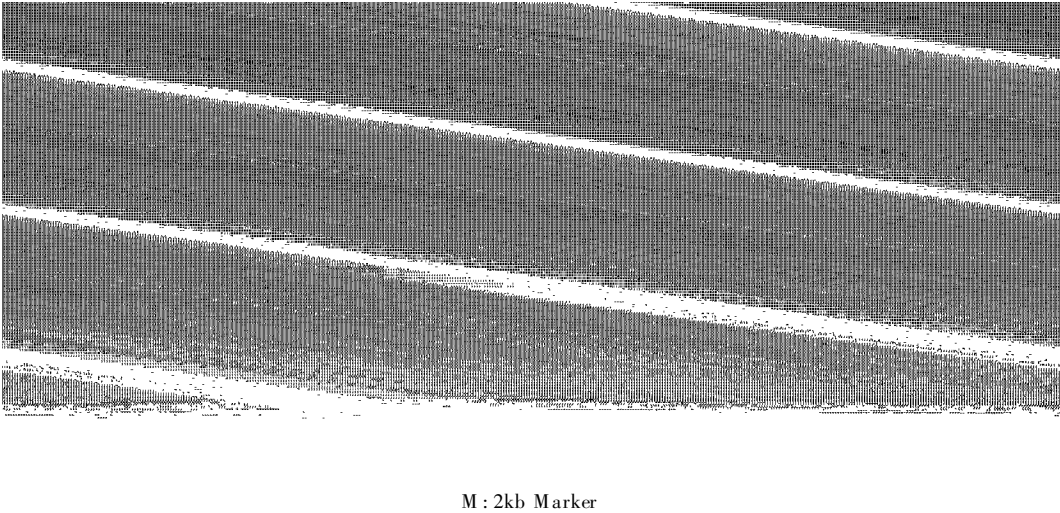


图 1 由引物 OPC-06(a), OPE-08(b), OPE-12(c), OPA-17(d) 扩增产生的 RAPD 带型  
(图上面的数字代表的种见表 1)  
Fig. 1 RAPD profiles generated by primers OPC-06(a), OPE-08(b), OPE-12(c), OPA-17(d)  
(The number on top refers to the species listed in Table 1)

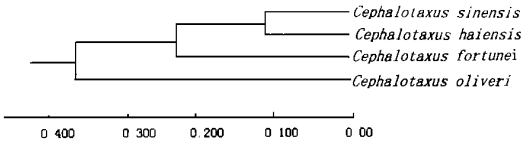


图 2 根据 RAPD 数据, 应用 UPGMA 法构建的树系图  
Fig. 2 Denrogram generated using UPGMA algorithm to cluster RAPD data

表 3 任意两种植物间的遗传距离, RAPD 图谱中共有的片段数和扩增片段总数

Table 3 Genetic distances between any two species(above diagonal), the numbers of the shared fragments and the total numbers of fragments amplified in RAPD patterns(below diagonal)

植物编号 No.	遗传距离 Genetic distances				片段数/ 片段总数 Numbers of shared fragments/ Total numbers of fragments			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1		0. 225	0. 245	0. 457		55/ 142	55/ 143	36/ 133
2			0. 102	0. 350			57/ 127	38/ 117
3				0. 340				39/ 118
4								

1. 三尖杉 *C. fortunei* Hook. f.; 2. 粗榧 *C. sinensis*(Rehd. et Wils.) Li; 3. 海南粗榧 *C. hainensis* Li; 4. 篦子三尖杉 *C. oliveri* Mast.

3 讨论

一般认为三尖杉科仅包括三尖杉属一属。

胡玉熹<sup>[2]</sup>在光镜与扫描电镜下比较观察了三尖杉属植物叶片构造与叶表面角质层的特征,发现篦子三尖杉和三尖杉属的其余种类相比特征独特,建议三尖杉属分为三尖杉组。傅立国<sup>[8,9]</sup>对三尖杉属的分类作了订正,认为三尖杉属宜分为篦子三尖杉组和三尖杉组及9个种。对篦子三尖杉的胚胎学研究发现它与三尖杉属的其它种相比有不少共性,但是也存在明显差异,赞同将篦子三尖杉在本属中另立一组<sup>[8]</sup>。

席以珍<sup>[8]</sup>对三尖杉科的花粉形态及其外壁超微结构进行了研究。三尖杉属各种间花粉的基本特征大体一致。但是篦子三尖杉花粉某些特征和三尖杉属的其余种相比非常特殊,支持在该属中分别成立篦子三尖杉组和三尖杉组的意见。RAPD分析表明,篦子三尖杉与三尖杉科其他植物的亲缘关系较远,支持篦子三尖杉独立成组的观点。

参 考 文 献

1 郑万钧,傅立国.中国植物志.第七卷.北京:科学出版社,1978.

2 胡玉熹.三尖杉属植物叶片结构的比较观察.植物分类学报,1984,22(4):289~296

3 傅立国.三尖杉属的研究.植物分类学报,1984,22(4):277~288

4 周奎<sup>山</sup>,姜笑梅.木材构造特征在裸子植物系统学中的意义.植物分类学报,1992,30(5):405~414

5 李莹,王伏雄,陈祖铿.篦子三尖杉的胚胎学研究及其系统位置探讨.植物分类学报,1986,24(6):411~422

6 朱太平.三尖杉属植物的生物碱研究及其化学分类问题.植物分类学报,1979,17(4):7~20

7 顾志建,周其兴,岳中枢.三尖杉科的核形态学研究.植物分类学报,1998,36(1):47~52

8 席以珍.三尖杉科的花粉形态及其外壁超微结构研究.植物分类学报,1993,31(5):425~431

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF  
CEPHALOTAXACEAE BASED  
ON RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

Wang Ting<sup>1</sup> Su Yingjuan<sup>1</sup> Huang Chao<sup>2</sup> Zhu Jianming<sup>1</sup>

(1 School of Life Sciences, Zhongshan University Guangzhou 510275)

(2 Department of Pharmacy, Hubei Chinese Traditional Medicine College Wuhan 430061)

**Abstract** Four species of Cephalotaxaceae were analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Eighty primers from 4 Operon kits were screened by RAPD, while 14 selected primers were able to produce clear polymorphic patterns. The results generated by using UPGMA algorithm to cluster genetic distance calculated from RAPD data imply that it is reasonable to establish the Sect. *Cephalotaxus* and Sect. *Pectinatae* in Cephalotaxaceae.

**Key words** Cephalotaxaceae, RAPD, Phylogenetic relationship