木兰属植物分子生物学研究进展

芮冬梅^{1,2} 胡光万² 龙波² 张雪梅² 龙春林^{2,3*}

(1 云南农业大学园林园艺学院, 云南昆明 650201; 2 中国科学院昆明植物研究所; 3 中央民族大学生命与环境科学学院)

摘要 木兰属是木兰科最具代表性的属,几乎包括了木兰科各属的共同特征,有必要开展更多的研究。对运用分子标记解决木兰属植物系统进化以及遗传多样性等方面的研究进展进行了总结,并指出应通过分子辅助育种为木兰属植物的选择育种和开发利用开创一条途径,以及应加强对木兰属植物进行遗传图谱构建相关方面的研究。

关键词 木兰属;遗传多样性;分子生物学;研究进展

中图分类号 S685.99;Q75 文献标识码 A 文章编号 1007-5739(2010)11-0195-03

Study Advances on Molecular Biology of *Magnolia*RUI Dong-mei^{1,2} HU Guang-wan² LONG Bo² ZHANG Xue-mei² LONG Chun-lin^{2,3*}

(1 College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201; 2 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences; 3 College of Life and Environmental Science, Minzu University of China)

Abstract *Magnolia* is the most typical genus of Magnoliaceae, which nearly includes all the characteristics of other genera, more related studies should be carried out. Therefore, in this paper, the advances on plant phylogeny evolution, genetic diversity of *Magnolia* were summarized. It is also pointed out that molecular-assisted breeding should be applied for the selective of *Magnolia* breeding and utilization to create a chortcut, and study on the genetic map of *Magnolia* relevant aspects should be strengthened.

Key words *Magnolia* L.; genetic diversity; molecular biology; study advances

木兰属(*Magnolia* L.)为木兰科(Magnoliaceae)种类最多的属,全属大约有90种,占全科总数的1/3。本属植物分布范围广,亚洲、美洲的亚热带和温带均有分布,在热带地区也有少量分布^[1]。木兰科植物是被子植物中最原始的类群之一,为我国南方阔叶林的重要组成部分,是世界公认的多用途树种,也是被子植物中受到严重威胁种类较多的一个科,因此历来受国内外学者所瞩目^[2]。木兰属植物种类经济价值高,木材上等,为常绿阔叶林的重要树种,花大而美丽,并有芳香,因此也是重要的园林树种。本属植物有些种类的树皮作为重要的中药厚朴或代厚朴药用,花蕾作辛夷药用,是我国具有2000多年历史的传统中药^[3]。

在经典分类系统中^[1,4],木兰属包括木兰亚属和玉兰亚属2个类群,其中木兰亚属分8个组,玉兰亚属分2个组。但是,现行的系统分类仍存在争议或矛盾。采用分子生物学方法探讨各类群的系统发育,是当前系统学研究的趋势。近几年来运用分子标记手段解决本属的系统进化问题,以及对木兰属植物遗传多样性等方面进行的研究进展很大,现就进行总结。

1 系统进化及分类研究

随着分子生物学的发展,DNA分子序列的测定分析在探讨木兰科的系统演化中也得到应用^[5-6]。应用较多的基因有 $matK$ 、 $trnK$ 、 $rbcL$ 、ITS等。 $matK$ 基因约1500个碱基对,位于叶绿体赖氨酸tRNA基因($trnK$)的内含子内,为单一拷贝编码基因^[7],是已知被子植物中进化速率较快的基因,多用于科下属间系统发育关系的研究。在木兰科系统研究用过的叶绿体DNA序列中, $matK$ 变异率较高。但相对其他被子植物,木兰科 $matK$ 序列的碱基变异位点少得多,表明木兰科植物在约1亿年的演化历程中,cpDNA序列进化得

很慢^[8-13]。在分类系统等级上,分子标记技术可通过遗传差异分析和对居群间、变种间、亚种间、种间乃至近缘属间的系统关系进行研究,为分类学提供可靠的依据。木兰科是现存被子植物中最原始的类群之一,属间在内部结构和外部形态特征上有很多重叠^[14]。不同学者在对木兰属分类系统的认识上存在着分歧,在属的界定上意见不一。因此,研究木兰属的系统进化及分类为探讨木兰科的系统演化提供了有力依据。

王亚玲等^[15]利用 $matK$ 序列分析的结果显示,木兰属为一个多系起源的趋同演化类群;玉兰亚属为一个单系群,与木兰亚属的亲缘关系较远,而与含笑属及华盖木属、拟单性木兰属的亲缘关系较近。玉兰亚属从木兰属中分出来归入含笑族后,可以很好地解决木兰属与其他属间的形态交叉问题。研究结果支持木兰属、玉兰属(*Yulania* Spach)、木莲属(*Manglietia* Bl.)、盖裂木属(*Talauma* Juss)、含笑属(*Michelia* L.)成立。 $trnL$ 和 $trnL-trnF$ 序列分析结果表明,木兰亚属与玉兰亚属的序列无共衍位点,玉兰亚属是一个相对一致的单系类群,说明木兰属是个来源于不同祖先的多系类群^[13]。

龚洵等^[16]的常规人工杂交试验证明:排除地理隔离和花期不遇这2个隔离因素,木兰亚属与玉兰亚属之间具生殖隔离,而木兰科的其他属内不具生殖隔离,只有属间才有生殖隔离。而且傅大立^[17]建议将2个亚属分开,并恢复玉兰属(*Yulania* Spach)的系统地位。Qiu等^[18]用叶绿体DNA的RFLP标记研究结果显示玉兰亚属的6个种与含笑(*Michelia* figo)、*Talauma ovata*形成一个单系类群,而与木兰亚属的几个种为姊妹类群。Azuma等^[19]的cpDNA序列分析也得出了相似的结果,显示出木兰亚属与玉兰亚属之间的关系较远。木兰属内具有性状趋同演化特征^[20-21]。

金虹等^[22]测定了木兰科等14种植物的叶绿体 $matK$ 基因的一段长1039bp的序列。异矩阵的结果表明,含笑属3个种(*Michelia alba*, *M. figo*, *M. foveolata*)、合果木(*Paramichelia*

作者简介 芮冬梅(1984-),女,云南昆明人,在读硕士。研究方向:山玉兰遗传多样性。

* 通讯作者

收稿日期 2010-05-12

baillonii)、观光木(*Tsoongiodendron odorum*)及长蕊木兰(*Alcimandra cathcartii*)与木兰亚属的2个种(*M. alboseicea*, *M. henryi*)之间的核苷酸数差异介于12~18个,约占所测序列的1%;玉兰(*Magnolia denudate*)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。而玉兰亚属的种与木兰亚属的种,其差异是13~16个核苷酸数。基于以上结果,金虹等人建议: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,故有可能将其归入含笑亚族。Azuma等^[9]的分子系统学分析也支持金虹的以上观点。

潘恒超等^[21]测定了木兰科拟单性木兰属(*Parakmeria*)等10个种(11个样品)植物的叶绿体DNA的*matK*基因序列,分析结果后认为:拟单性木兰属与单性木兰属(*Kmeria*)有极近的同源关系;木兰属的玉兰亚属与拟单性木兰属和单性木兰属关系很近,并形成一个小系分支;木兰亚属、木莲属以及玉兰亚属、拟单性木兰属和单性木兰属所组成的分支形成一个小系分支;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。

2 亲缘关系分析

应用分子标记对植物种类及品种间进行亲缘关系分析,可以在分子水平上阐明生物系统演化及分类关系,直接关系到育种亲本的选择和种质资源的合理利用。木兰科各属植物之间在内部结构和外部形态特征上有很多重叠,以致长期以来不同学者对木兰科植物的分类系统及亲缘关系的认识上存在很大分歧,在属的界定上得不到统一^[14]。

Qiu等^[23]利用cpDNA对亚洲和美洲北部这一带的皱种木兰组(*Sect. Rytidospermum*)6个种7个品种进行了亲缘鉴别。分析结果认为美洲三瓣木兰(*Magnolia tripetala*)是美洲皱种木兰组的唯一种,皱种木兰组与木兰亚科其他种不是同源群,而是姊妹类群。Kim等^[24]再次用*ndhF*基因进行序列分析证实了该结果。

Saneyoshi等^[25]采用nSSR和cpSSR技术分析了日本东海地区的11个日本毛玉兰(*Magnolia stellata*)种群的遗传多样性。将11个种群划分为A、B、C3个类群,其中B类群有最丰富的基因多样性,C类群有最丰富的叶绿体单膜类型,通过2种方法的分析比较得出,B群落跟A和C有很高的相似性。为了维持基因漂移,B群落应该消除。在优先保护问题上,应该优先考虑C群落。

王亚玲等^[26]以玉兰亚属的20个材料(含种和品种)为研究对象,用RAPD技术对其亲缘关系进行分析。从55个随机引物中筛选15个对所有供试材料进行扩增。共获得274条DNA谱带,其中262条为多态性带。建立的基于RAPD结果的亲缘关系树形图显示,玉兰亚属的基因背景非常复杂,类群划分较为困难。说明中国的玉兰亚属种质资源非常丰富。

贺随超等^[27]用AFLP分子标记技术对红花玉兰与玉兰亚属几个种之间的亲缘关系,以及红花玉兰的分类地位进行了分析。其分析结果表明:各玉兰种间,红花玉兰与白玉兰、武当木兰的遗传相似度较高;玉兰亚属种间基于AFLP分析的聚类结果与形态学对种的划分基本吻合。红花玉兰

不仅形态上与其他玉兰种有明显区别,AFLP分子标记也支持红花玉兰为一个独立的新种,多瓣红花玉兰变种与红花玉兰原变种为一个种。

3 群体遗传结构及遗传多样性研究

植物居群的遗传变异水平和居群遗传结构是其进化历史、分布状况、生活型、繁育方式和种子散布机制等各种不同因素综合作用的结果,与其适应性和进化潜力密切相关,故检测植物的遗传变异水平及其空间结构,是探讨上述各种进化因素的前提,同时关系到物种保护和复壮策略的制定和措施。利用分子标记技术来研究物种的遗传变异,对深入探讨物种致濒机理以及保护和延续物种多样性具有重要的理论意义和实际价值。

Setsuko等^[28]利用SSR技术分析了175个星花木兰(*Magnolia tomentosa*)母本无性繁殖出的1044个个体样本的遗传结构和分布尺度,建立了保护濒危物种星花木兰的基准线。该研究将样本分成一个小群体和一个大群体。这2个群体的空间自相关系数揭示了小群体的过量的纯合子是由它的遗传基础和近亲交配造成的,纯合子频率从小群体到大群体逐渐降低是由于它们的遗传结构减弱或者近亲杂交强度减弱了。Kikuchi等^[29]对分布于日本西部的*Magnolia sieboldii* ssp. *japonica*进行SSR分析。应用4个SSR位点分析6个区域的19个群落进行遗传变异分析,结果显示:与同科的其他种类以及其他特有植物相比,*M. sieboldii* ssp. *japonica*的遗传变异非常低。

刘登义等^[30]运用随机扩增多态DNA(RAPD)技术对天目木兰(*Magnolia amoena*)居群的遗传多样性进行了研究。结果显示相同产地居群内个体间的遗传距离较小,遗传多样性水平很低;不同产地居群个体间的遗传距离较大,遗传多样性水平较前者高。即天目木兰个体间遗传多样性水平与其地理分布有关。天目木兰总体较低的遗传多样性是导致它濒危的原因之一。

贺随超等^[31]采用AFLP分子标记对目前仅发现于湖北五峰狭域分布的红花玉兰种质资源的遗传多样性进行了研究。用10对引物对6个居群的43个个体进行了选择性扩增,共检测到623个有效位点,其中多态位点595个。其结果表明:在物种水平上,红花玉兰的遗传多样性水平很高,多态位点百分率达95.51%,*Nei's*基因多样性(*Hr*)为0.211±0.0286;红花玉兰的遗传变异主要存在于居群内,居群间的遗传分化较小。

4 种质的评价与鉴定

由于不同种质在基因组上存在差异,加上分子标记的无限性,所以利用分子标记理论上可以鉴别任何种质。郭宝林等^[32]利用RAPD技术讨论了厚朴的种类亲缘关系:从分子水平区别了“川朴”和“温朴”的差异;将原有2个种划分为3个,以及建议建DNA指纹图库辨别厚朴。王艇等^[33]利用核酸扩增指纹法(DAF)扩增了中药材厚朴获得清晰可靠的DNA指纹图谱。根据琼脂糖凝胶上显示的DNA带型差异可准确区分出厚朴及其伪品和混淆品。刘文生等^[34]采用随机引物扩增多态性DNA(RAPD)技术对厚朴进行扩增获得了很清晰的DNA带型,说明DNA指纹图谱是木兰科植物品种

评价鉴定中较好的遗传工具。

5 展望

由于人类过度的开发利用,木兰科植物的生存环境遭到严重破坏,而且它们自身繁殖能力低下,许多种类处于濒危状态。木兰科植物在《中国植物红皮书》中被列为国家重点保护的种类有 39 种,其中木兰属中就有 6 种是国家重点保护的珍稀濒危物种^[35]。在木兰科珍稀濒危物种研究中,遗传资源的保护是非常重要的课题。要从根本上保护濒危物种,除加强就地保护措施以及开展迁地保护外,还需从林木本身的遗传性变异、种群间遗传变异以及物种水平遗传变异之间的关系出发,实现对种质资源和基因库进行有目的的保护。

分子标记辅助育种或叫间接选择育种,是利用与目标基因紧密连锁的分子标记来判断目标基因是否存在的选择育种方法。该方法不受环境因素的影响,可对其杂交后代进行早期选择与预测,从而提高选择效率,加快育种的进程。木兰属植物用途广泛,在材用、城镇庭园绿化、香料、药用等方面具有很大的发展潜力。通过分子辅助育种可以实现早期选择,为木兰属植物的选择育种和开发利用开辟一条捷径。

遗传图谱构建是当今研究的前沿科学,也是基础课题。分子标记连锁图为进行植物基因组的结构分析和比较提供了有力工具,可利用它进行数量性状基因位点的研究,生物体主要性状的早期测定以及快速有效地定位可克隆目的基因,是改良林木遗传品质的有效手段和希望所在。目前,国内外还未见有对木兰属植物进行遗传图谱构建的报道,应加强相关方面的研究,为木兰属植物的数量性状基因位点、目的基因克隆和分子标记辅助育种奠定基础。

6 参考文献

[1] 刘玉壶.木兰科分类学的初步研究[J].植物分类学报,1984(22):89-109.

[2] 王景祥.浙江植物志:第二卷[M].浙江:浙江科学技术出版社,1982.

[3] 刘玉壶.木兰科[M]//刘玉壶,罗献瑞,吴容芬.中国植物志:第30卷第1分册.北京:科学出版社,1996:112-113.

[4] 郑万钧.中国树木志:第1卷[M].北京:中国林业出版社,1983:419-517.

[5] AZUMA H, THIEN L B, KAWANO S. Molecular phylogeny of *Magnolia* based on chloroplast DNA sequence data (*trnK* intron, *psbA-trnH* and *atpB-rbcL* intergenic spacer regions) and floral scent chemistry[A]. Proc. Internat. Symp. Fam. Magnoliaceae [C]. Beijing: Science Press, 2000: 219-227.

[6] KUNIHICO U. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae [A]. In: Liu Y H eds. Proc. Internat. Symp. Fam. Magnoliaceae [C]. Beijing: Science Press, 2000: 205-209.

[7] HILU K W, LIANG H P. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics[J]. American Journal of Botany, 1997(84): 830-839.

[8] AZUMA H, THIEN L B, KAWANO S. Molecular phylogeny of *Magnolia* (Magnoliaceae) inferred from cpDNA sequences and evolutionary divergence of the floral scents[J]. Journal of Plant Research, 1999(112): 291-306.

[9] AZUMA H, THIEN L B, KAWANO S. Molecular phylogeny of *Magnolia* based on chloroplast DNA sequence data (*trnK* intron, *psbA-trnH* and *atpB-rbcL* intergenic spacer regions) and floral scent chemistry. In: Liu Y-H, Fan H-M eds. Proceedings of the International Symposium on the Family Magnoliaceae [M]. Beijing: Science Press, 2000: 219-227.

[10] AZUMA H, GARCIA-FRANCO J G, RICO-GRAY V, et al. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: the biogeography of tropical and tem-

perate disjunctions[J]. American Journal of Botany, 2001(88): 2275-2285.

[11] UEDA K, YAMASHITA J, TAMURA M N. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae. In: Liu Y-H, Fan H-M eds. Proceedings of the International Symposium on the Family Magnoliaceae [M]. Beijing: Science Press, 2000: 205-209.

[12] KIM S, PARK C W, KIM Y D, et al. Phylogenetic relationships in family Magnoliaceae inferred from *ndhF* sequences[J]. American Journal of Botany, 2001(88): 717-728.

[13] 王亚玲, 张寿洲, 崔铁成. *trnL* 内含子及 *trnL-trnF* 间隔区序列在木兰科系统发育研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 247-252.

[14] 刘玉壶, 夏念和, 杨慧秋. 木兰科 (Magnoliaceae) 的起源、进化和地理分布[J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(4): 1-12.

[15] 王亚玲, 李勇, 张寿洲, 等. 用 *matK* 序列分析探讨木兰属植物的系统发育关系[J]. 植物分类学报, 2006, 44(2): 135-147.

[16] 龚洵, 潘跃芝, 杨志云. 木兰科植物的杂交亲和性[J]. 云南植物研究, 2001, 23(3): 339-344.

[17] 傅大立. 玉兰属研究[J]. 武汉植物研究, 2001, 19(3): 191-198.

[18] QIU Y L, CHASE M W, PARKS C R. A chloroplast DNA phylogenetic study of the eastern Asia-eastern North America Disjunct section *Rytidospermum* of *Magnolia* (Magnoliaceae) [J]. American Journal of Botany, 1995(82): 1582-1588.

[19] AZUMA H, THIEN L B, KAWANO S. Molecular phylogeny of *Magnolia* based on chloroplast DNA sequence data (*trnK* intron, *psbA-tonH* and *atpB-rbcL* intergenic space regions) and floral scent chemistry [A]. In: Liu Y H. Proceedings of the international symposium on the family Magoliaceae [C]. Beijing: Science Press, 2000: 219-227.

[20] KUNIHICO U, JUN Y, MINORU N T. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae [A]. In Liu Y H. Proceedings of the international symposium on the family Magnoliaceae [C]. Beijing: Science Press, 2000: 205-209.

[21] 潘恒昶, 施苏华, 金虹, 等. 拟单行木兰属近缘植物 *matK* 基因的序列分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(3): 63-67.

[22] 金虹, 施苏华, 潘恒昶, 等. 含笑亚族及其近缘植物 *matK* 基因序列分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(1): 93-97.

[23] QIU Q, YIN L. Molecular divergence between Asian and North American species of *Magnolia* sect. *Rytidospermum* (Magnoliaceae) [D]. The University of North Carolina at Chapel Hill, Supervisor: Parks C.R., 1993: 1-5.

[24] KIM S, AND PARK C W. Phylogenetic relationships in family Magnoliaceae inferred from *ndhF* sequences [J]. Amer J Bot, 2001, 88(4): 717-728.

[25] SANEYOSHI U, SUZUKI S, TAKAYUKI K, et al. Genetic diversity and differentiation of the endangered Japanese endemic tree *Magnolia stelata* using nuclear and nuclear and chloroplast microsatellite marker [J]. Conservation Genet, 2005(4): 563-574.

[26] 王亚玲, 李勇, 张寿洲, 等. 几种玉兰亚属植物的 RAPD 亲缘关系分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 299-302.

[27] 贺随超, 马履一. 红花玉兰与玉兰亚属几个种亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 植物研究, 2008, 28(3): 288-292.

[28] SETSUKO S, ISHIDA K, TOMARU N. Size distribution and genetic structure in relation to clonal growth within apopulation of *Magnolia tomeatosa* Thunb (Magnoliaceae) [J]. Mol Ecol, 2004, 13(9): 2645-2653.

[29] KIKUCHI S, ISAGI Y. Microsatellite genetic variation in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* ssp. *Japanica* [J]. Heredity, 2002, 88(4): 313-321.

[30] 刘登义, 储玲, 杨月红. 珍稀濒危植物天目木兰 (*Magnolia amoena*) 遗传多样性的 RAPD 分析应用[J]. 生态学报, 2004, 15(7): 1139-1142.

[31] 贺随超, 马履一, 陈发菊. 红花玉兰种质资源遗传多样性初探[J]. 西北植物学报, 2007, 27(12): 2421-2428.

[32] 郭宝林, 吴勳, 斯金平, 等. 厚朴 DNA 分子标记的研究——正品的 RAPD 研究[J]. 药学报, 2001, 36(5): 386-389.

[33] 王艇, 苏应娟, 朱建明, 等. 中药材厚朴的 DNA 扩增产物指纹分析研究[J]. 中药材, 2001, 24(10): 710-715.

[34] 刘文生, 朱建明, 何斌, 等. 中药材厚朴的随机扩增多态性 DNA 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2004, 27(3): 164-169.

[35] 贺善安. 中国珍稀植物 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.