

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0016-19

“活化石”植物银杏形态与分子进化 (I) *

陈月琴, 庄 丽, 屈良鹄, 张宏达

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 测定了银杏雌株核糖体 rRNA 基因转录间隔区 rDNA ITS 区全序列共 1 172 碱基对, 其中 ITS1 长 788 碱基对, ITS2 226 碱基对, 5.8S rRNA 基因 158 碱基对. 采用计算机分析软件对所获得序列进行比较分析. 结果表明: 形态上仅有很少变化的银杏, 其个体之间有明显的分子差异, 不同产地栽培株 rDNA ITS 区序列的核苷酸差异值高达 25%, 这一差异远远大于一般意义上种间的距离, 表明了该类植物形态上的变化与分子进化的不一致. 造成形态与分子进化不一致的原因有待进一步探讨.

关键词: 银杏, 形态演化, 分子进化

分类号: Q 949.64, Q 751 **文献标识码:** A

银杏是一种古老的孑遗植物, 也是我国著名的活化石植物之一. 其令人最不可思议是, 现代生活的个体, 植物体所具有的形态结构与 2 亿年前生存的类群非常相似^[1], 该类群在中生代时曾遍布全球, 经过漫长的时期, 同时代的许多动、植物都已灭绝, 银杏不仅仍保存下来, 而且形态上仅有很少变化. 尽管现今仅存 1 属 1 种, 但是银杏以其巨大的形体和漫长的生命, 以及不断产生有限成活的幼株的方式而繁衍. 目前银杏在世界各地广泛栽培, 已成为名贵树种之一. 由于银杏所具有的这些独特性, 长期以来, 关于银杏的发生、发育、形态解剖、化石记录等都是人们感兴趣的课题, 吸引植物学家们从不同层次、不同角度对其进行研究, 获得许多有意义结论^[2~4]. 但是, 有关银杏形态与分子进化的相关性研究尚未见有报道. 本文通过对银杏核糖体 rRNA 基因转录间隔区 rDNA ITS 的序列测定与分析, 从分子水平阐明银杏不同个体或不同种群间的遗传差异, 继而进一步探讨形态与分子进化的相关性.

1 材料与方法

1.1 材 料

研究所用材料为银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 雌株, 株系名为 C3-13, 采自广东省林业科学研究所. 由华南农业大学苏志尧采集并鉴定.

* 基金项目: 国家杰出青年基金 (39525007)

收稿日期: 1998-05-18 第一作者简介: 陈月琴, 女, 33 岁, 博士后

1.2 模板 DNA 的制备及 rDNA ITS 的 PCR 扩增

采用 CTAB 法^[5]提取植物总 DNA, 所提取的总 DNA 以 DPS 纯化系统 (包括玻璃粉, NaI) 纯化再用于 PCR 扩增. PCR 引物, LH2: 5' GTCGAATTCTGTAGGTGAACCTGCGGAAGGA TCA 3', D1a: 5' TTCCCTGTTCACTCGCGGTTACT 3', 分别对应于 18S rDNA 3' 末端 (forward) 和 25S rDNA 5' 端第 60~83 核苷酸序列 (reverse), PCR 反应程序为: 94 °C 2 min, 然后 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环. 扩增完成后, 产物用 DPS 系统纯化, 沉淀晾干后加适量 TE 溶解. 取 2 μ L 于 $\rho=1\%$ 的琼脂糖凝胶上电泳检查, 其余 -20 °C 保存备用.

1.3 rDNA PCR 扩增产物的克隆及序列测定

PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统纯化后, 与质粒载体连接, 质粒载体为 pTZ19, 按文 [6] 操作. 采用美国 Life Science Sequenase Version 2.0 (USB) 测序试剂盒直接测定重组质粒的 DNA 序列.

2 结果与讨论

2.1 rDNA ITS 的 PCR 扩增及序列测定结果

银杏 rDNA ITS 的 PCR 扩增结果表明: PCR 产物长度约 1 200 碱基对 (包括 18S 3' 末端和 25S 5' 末端 rDNA 部分序列). PCR 产物以 DPS 系统纯化, 并连接到 pTZ19 的 *Sma* I 位点上, 通过 PCR 和限制性内切酶等方法检查转化子, 采用末端终止法测定重组质粒的 DNA 序列, 获得了银杏 rDNA ITS 区全序列共 1 172 碱基对, 其中 ITS1 长 788 碱基对, ITS2 226 碱基对, 5.8S rRNA 基因 158 碱基对.

2.2 银杏等裸子植物 rDNA ITS 区的结构特征

早在 90 年代初期, 屈良鸽等^[7]研究裸子植物核糖体 rRNA 基因间转录间隔区的结构, 通过 PCR 扩增, 意外发现裸子植物的 ITS 区较其它植物, 如苔藓、蕨类、被子植物的 ITS 区长几百到上千个核苷酸. 之后, 不同学者分别展开了对苏铁、买麻藤、松柏类 ITS 区的研究, 以阐明裸子植物的 ITS 区较其它植物长的原因. 研究得出裸子植物的 ITS1 是该类群 rDNA ITS 区较特殊的区域, 比 ITS2 长 3~4 倍, 对银杏 ITS 区测定结果也得到相同的结论, 说明 rDNA ITS 区长度变化可以作为鉴别裸子植物的很好的分子指标. 从裸子植物 ITS 区的一致性与独特性, 可以说明该类群起源与发生上的共同性.

2.3 银杏不同个体间 rDNA ITS 的序列比较以及形态与分子进化相关性

从 Genbank 中获取栽培于意大利的银杏 rDNA ITS 的序列, 并采用计算机分析软件包进行序列的排列与分析 (图 1, GinkgoI 为本实验室测定), 发现银杏同 1 个种不同个体间 rDNA ITS 区有较大的差异, 2 个个体间序列的核苷酸差异可达 25%, 甚至在 5.8S rRNA 基因内两者之间也有 17% 的不同. 5.8S rDNA 为高度保守的核糖体基因, 在被子植物科以下类群都有较大的同源性^[8~10], 同种不同个体间可达 17% 的差异, 这种情况在植物是非常少见的, 对于银杏更为特殊. 因为根据化石纪录和文献报道, 银杏从中生代发展到现代, 形态上仅有很少变化. 尽管由于栽培产地不同, 形态上有些差异, 但这些形态上的差异还未能达到种或变种的水平, 有时为了方便起见, 也仅仅将不同产地的银杏划分为不同的栽培品种. 但是, 从 rDNA ITS 的序列比较结果来看, 银杏个体之间的分子差异已远远大于一般意义上种间的差异, 表明了该类植物形态上的变化与分子进化的不一致. 这一结果与

动物中非洲爪蟾的结论非常相似。银杏不同个体间分子水平上的差异是雌雄株差异还是长期演化的结果？银杏形态上的少变化、而基因水平上的较大变化这一特性与其生存策略是否相关？这一性状为银杏所特有，还是裸子植物的共性？这些都是有待于进一步探讨的问题，我们也将给予进一步的报道。

Ginkgo1	ATGATCCCGT	CGTCCGTAA*	*AGGAACGGG	GCGTGGCGAA	CTG*TGAGGT	ACGTGGGTAG	60
Ginkgo2	---G-----A	-A---A---G	A-----T---	--AC-A----	---G--G--C	-TAA----*-C	
Ginkgo1	GACCCCCGTC	CGTCGTCGG*	CCGTCGTTGC	CCTCCGCTCG	CGAATAGCTA	CGCGGCGGTG	120
Ginkgo2	A----A-***	A-G----T-T	--A--TCCA-	-----A---	-C-----***-	-A-----***-	
Ginkgo1	ATTGGCAGCG	CGGTCGTGCG	GCGGATAAGG	CCTATCCTTC	TGACCCGCCC	AGGATCGTGG	180
Ginkgo2	-----T-	TA---A-C--	ATT-G-----	ATGCA--C-T	--T---AT**	-----T----	
Ginkgo1	GATGGACCCC	GCCCGTCGTG	TCCGGCCGTC	GTTGCCCTCC	GTTCCGGAAT	AGTACGCGC	240
Ginkgo2	-----	AA--CG-*--	--TA-----	-C-A-----	-----A----	-----GAG--	
Ginkgo1	GTGGATGGGC	AGCGCGT**G	TCCGC**GGT	AAGCCC*ATC	TCTCGACCCG	AGTCCCGGAT	300
Ginkgo2	-G---T- T	-A- T-ATC-	---AGAG---	---GT-T---	CT--A-----	-----	
Ginkgo1	GCCAAAGGTCG	CCGACCGTC	GTCGTCGTG	CCCCGCCCCC	TGCGTTGCGT	GCGCAGAGGC	360
Ginkgo2	-TG-----	-T-----A--	-----A-	-----T-	-AT---AGCA	-----	
Ginkgo1	TCGGGCGGGC	GCGTGGCGGG	CGGTCGGGAA	GG*TG TGCC	CATGCCCCGG	AGTCC*AAAT	420
Ginkgo2	-----T---	*-----	**--A----	--A-----	G-A--T-T--	--CTAT----	
Ginkgo1	CGAGTTGTTC	GGGTTTCGCTT	CGGCCTGACC	CGTCTCTCCC	GTACGGCGTC	CGGCACGCGT	480
Ginkgo2	-----T	-----T--A	*---TA-C-T	GT--C-C---	--T-----	-AA-----A-	
Ginkgo1	TGAGCTTAAG	CAACCGGATG	TGGCCGGCGG	GCAGGCGGAC	GGTA*CGGCT	TGCACGTGCT	520
Ginkgo2	CT-----	-----A----	---TA-TG--	TAG-----G-	-G--G-T--G	-A-T-C----	
Ginkgo1	TCTCGCATTT	CCCCTCGG*G	CATCGGTGAC	GCGGCGAGTC	TCGTTGCGTC	TCCGCTCGAC	580
Ginkgo2	-----	--T--T--C-	G---ACA--	-G-AA-----	AT---T-C--	---T-----	
Ginkgo1	GGTCGCCCCG	TGGCACGGGG	AGAAGGCTCT	TCTGTCGTGA	CGGTGTCGTT	CGAGCC*GTC	640
Ginkgo2	---A--T-	-----T----	--TGT-----	-TCA---AG	-----T---	-----GTT--	
Ginkgo1	GTGCGCCGGC	CCGCCGCGGG	GAAATGGTTA	CCCCTTTTTT	TCCCCCTTCT	*CT*TTCTTA	700
Ginkgo2	-CA-AT---T	*---AT---	-----G--	A-----	-T---TCC--	T--A-----	
Ginkgo1	TCTCTTTTTT	TCTGATTCCC	CCATGGCCGG	AGGCACCAAG	ATAAGAAAGT	CATGCGGACT	760
Ginkgo2	-----	*--T-----	-----*-	-----	T-----	-G-A-A----	
Ginkgo1	CCCCGCACAC	ACTGCGCGTG	CGGTGGGGGA	CACGCGGCAC	CAAAGACCCT	CACGACTCTC	820
Ginkgo2	--T*****	*-----A-	-----A----	-----	-----	-----	
Ginkgo1	GGCAACGGAT	ATGTCGG*TC	TCGCCACGAT	GAAGAACGTA	GCGAAATGCG	ATACTTAGTG	880
Ginkgo2	-----	--C-TG-C-	-TA-----	-----	A-----	-----T----	
Ginkgo1	TGAATTGCAG	AATCCCCTGA	ATCATCGAGT	CTTTGAACAC	AAGTTGCGCC	CGAGGCCTCG	940
Ginkgo2	-----T--	-----A----	-----A----	-----G-	-----T-G-	-----TGGT	
Ginkgo1	GCCGACAGGC	GTCTGCCTGG	GCGTCGCACA	ACCTATCGCC	CCCCGCCCTC	CGGTGTGCGG	1 000
Ginkgo2	-AG-G---**	A---A-T-T-	--A-T--T-	--TA---A--	-----A---*	***---*---C	
Ginkgo1	GGGCGCGGAG	TTGGCCGTCC	GTA*CCCCCA	GCGGCG*CGG	TCGGCTGAAA	ACCACGCGGT	1 060
Ginkgo2	---A---*-	C---T-A-T-	--*G-----	-----ATG-	--AT--A---	-----T---	
Ginkgo1	CGTCGTCTCT	CTGCGCCGGC	GAACGGTGTC	CGGGTTGCGC	GATGCTCG**	**ATCGGCGC	1 120
Ginkgo2	-----	-GT-ATTA--	--GT---T--	-A--TT----	-G-A-A--GT	TG-----T-T	
Ginkgo1	CCCCGGCTGG	GAGCATCGGG	CGAGCGTCTC	CGCGAACAAC	TTCGACTCCG	GCCTCGCGCA	1 160
Ginkgo2	-----	T-----T--	AA-T-----	-AA---T---	---AA-----	--G---GT-	
Ginkgo1	CGC*GCACG	CGGGGCGGCC	GTCGGGACGC	TGCG	1194		
Ginkgo2	---ACAT-A-	A---T-A--	A-----T--	---T			

图 2 银杏不同栽培株 rDNA ITS 序列比较

Fig 2 Sequence alignment of rDNA ITS between the culture strains of *Ginkgo biloba*

参考文献:

- [1] SEWARD A C. The story of the maidenhair tree. *Sci Prog*, 1938, 32: 420 ~ 440
- [2] HAGER K B, BRAUN H, CZIHAI A, et al. Evolution of seed storage protein genes: legumin genes of *Ginkgo biloba*. *J Mol Evol*, 1995, 41: 457 ~ 466
- [3] 周志炎. 银杏型胚株器官的异时发育起源. *古生物学报*, 1994, 33 (2): 131 ~ 140
- [4] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11 ~ 15
- [5] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996
- [6] QU L H, XI B Q, SHI S H, et al. A characteristic size of the ITS in gymnosperm rDNA. X V International botanical congress. Tokyo, 1993
- [7] SHI S H, CHANG H T, CHEN Y Q, et al. Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Biochem System Ecology*, 1998, 26: 55 ~ 69
- [8] SUH Y, THIEN L B, REEVE H E, et al. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Amer J Bot*, 1993, 80 (9): 1042 ~ 1055
- [9] FURLONG J C, MADEN B E H. Patterns of major divergence between the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in *Xenopus borealis* and *Xenopus laevis*, and of minimal divergence within ribosomal coding regions. *The J EMBO*, 1983, 2 (3): 443 ~ 448

Relationship Between the Morphology and Molecular Evolution of “Living Fossil” *Ginkgo biloba*: Evidences from the Sequence Analyses of rDNA ITS

CHEN Yueqin^{*}, ZHUANG Li, QU Lianghu, ZHANG Hongda (Chang Hungta)

Abstract: A remarkable feature of *Ginkgo biloba* is that the species evolved so slowly that the morphological and anatomical structures of its fossils 200 million years ago and the present-day representatives were almost identical. The sequence of internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) was determined for *Ginkgo biloba* to understand the link between molecular and morphological evolution. The entire ITS and 5.8S regions of *Ginkgo biloba* (female strain) from a plantation in Guangzhou, China, are 1 172 bases long with an ITS1 of 788 bp, an ITS2 of 226 bp and a 5.8S of 158 bp. The numerous copies of the ITS sequences within an individual showed a high level of sequence homogeneity. Sequence comparison using computer program showed that high sequence divergence between the strains we studied and that from Italy with the variation up to 25%, indicating that the low evolution rate of morphology in *Ginkgo biloba* does not reflect the rates of molecular evolution. The relationship between the molecular characteristics and relic situation of this species needs to be further explored.

Keywords *Ginkgo biloba*, morphology evolution, molecular evolution

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