

苏铁在种子植物进化中的位置

——分子生物学的证据

屈良鹄 余小强

施苏华 张宏达

(生物工程研究中心)

(生物学系)

摘 要

用大分子rRNA快速测序法测定了苏铁(*Cycas revoluta* Thunb.)、水松(*Glyptostrobus pensilis*(Staunt.)Koch)和南方红豆杉(*Taxus mairei*(Lemee et Levl)S.Y.Hu)三种裸子植物Ls-rRNA 5'端区108个核苷酸的序列。用这些数据构建的rRNA系统树揭示了苏铁与水松和南方红豆杉构成一个关系密切的姐妹群,而所分析被子植物都为另一自然类群。另以绿藻作为种子植物群外参照物种,表明苏铁这一位置并不是由于一个特异的进化速度所造成的。这一结果支持了苏铁与松杉类为一自然群类,它们的分歧发生在裸子植物与被子植物分歧之后的假说。

关键词 苏铁, 裸子植物, 系统演化, rRNA, 核苷酸序列

苏铁曾繁盛于中生代, 现仅存苏铁科, 故有活化石之称。苏铁类不仅对古气候、地理和古植被研究有很大价值, 而且是研究种子植物起源和进化过程的关键植物类群之一。许多植物分类学家在形态结构和生理特征上对苏铁类及其化石已作了大量的研究工作。但是, 由于化石记录的不完整, 根据现存植物的表型特征来重建系统进化树的困难很大, 所以苏铁在种子植物进化中的位置一直存在争论^[1~3]。因此, 提供新的、尤其是分子生物学方面的证据是非常必要的。本文报导了对苏铁(*Cycas revoluta*)和2种针叶树即水松(*Glyptostrobus pensilis*)、南方红豆杉(*Taxus mairei*)核糖体大亚基(Ls-rRNA)部份核苷酸序列的测定以及比较分析的结果, 并对苏铁在种子植物进化中的位置进行了讨论。

1 材料与方法

苏铁(*Cycas revoluta*)、水松(*Glyptostrobus pensilis*)和南方红豆杉(*Taxus mairei*)树叶采自中山大学校园和华南植物园。 γ -³²P ATP购自Amersham, 多核苷酸激酶和逆转录酶购自华美公司。

1.1 植物大分子RNA制备

新鲜嫩叶用蒸馏水洗净, 吸干, 放入研钵中加入液氮冷冻, 研磨成粉末。每克树叶加入3ml抽提缓冲液(0.1mol/L LiCl, 0.1mol/L Tris-HCl pH8.0, 10mmol/L EDEA,

• 国家自然科学基金资助项目

本文1990年6月4日收到

1% SDS)及等体积酚 (80°C), 剧烈震荡 3~5 min, 加入与酚等量的氯仿, 震荡。以 13000rpm 高速离心 15min 后取水相。再用酚-氯仿 (1:1) 溶液抽提 2 次。以氯化锂 (终浓度 2 mol/L) 沉淀大分子 RNA。大分子 RNA 粗品再以酚-氯仿抽提 2 次后, 以 2.5 倍乙醇沉淀 RNA, 于 -20°C 冰箱保存。

1.2 rRNA 序列测定

大分子 rRNA 的直接序列测定基本上按照我们过去的方法进行^[4,5]。测序用的 DNA 引物 D_{1c} 对应于水稻 (*Oryza sativa* L.) 25s rRNA 5' 端 370~392 这段序列^[6]。由于这一序列在真核生物 Ls-rRNA 分子中具有很高的同源性, 所以我们可以用 D_{1c} 引物来测定不同植物的 Ls-rRNA 序列。即用逆转录酶延伸与植物 Ls-rRNA 专一性杂交的 DNA 引物 (5' 端以磷 32 放射性同位素标记), 在双脱氧核糖核苷酸存在下, 直接测定 RNA 序列。

1.3 rRNA 序列的比较及系统树的绘制

按照最大同源性的原则, 将苏铁的核苷酸序列与水松、南方红豆杉和几种被子植物即水稻 (*Oryza sativa* L.)、玉米 (*Zea mays* L.)^[5] 和茄科的烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)^[5]、西红柿 (*Lycopersicum esculentum* Mill.)^[7] 以及一种绿藻 (*Pyramimonas Parkeae*)^[8] 的 Ls-rRNA 同源序列进行排列比较, 用 Kimura 公式^[9] 对核苷酸差异数进行校正, 并以简单成聚法 (UPGMA)^[10] 构建系统进化树。

2 结果和讨论

苏铁的 Ls-rRNA 5' 端区 108 个核苷酸序列已被准确测定。由于裸子植物迄今尚未有 Ls-rRNA 的序列报道, 因此我们同时还测定了公认的典型裸子植物松柏类的水松以及另一种针叶树南方红豆杉的同源序列, 并将这些序列与被子植物及一种绿藻的同源序列进行了比较分析, 结果见图 1。比较所得到的差异矩阵列于表 1。从图 1 和表 1 可以

●C. revoluta	UCUCGCGAGUC GGGUUGUUG GGAALGCAGC CCAAACGGG UGUAAAUU UGUCAAAGG
●G. pensilis	--G-----
●T. mairei	--G-----
Z. mays	--AA-----
O. sativa	--AA-----
L. esculentum	--A-----
N. tabacum	--A-----
P. parkeae	--GAA-----
●C. revoluta	UAAAUUGGG CGAGAGACCG AUAGCGAACA AGUACCGCGA GGGAAAGA
●G. pensilis	-----C-----
●T. mairei	-----C-----
Z. mays	-----CA-----
O. sativa	-----CA-----
L. esculentum	-----CU-----
N. tabacum	-----C-----
P. parkeae	-----CU-----

图 1 核糖体大亚基 RNA 5' 端保守区的核苷酸序列排列 (本研究测定的植物序列用圆点表明, 排列中仅标明与顶部序列不同的核苷酸, 而相同的核苷酸则以短划代表)

Fig.1 Sequences alignments for the evolutionary conserved segment of large subunit rRNA 5' terminal region (The species that we sequenced in this study are indicated by full circle; only the nucleotides that differ from the top sequence are showed, identities are denoted by hyphens)

看出,这是一段相当保守的核苷酸序列,但其已能够提供足够的分子差异来研究种子植物各大群类之间的关系。

表1 rRNA序列比较(表右上方为不同生物之间的核苷酸序列差异数,表左下方是经过校正后的K_{nuc}值。)

Tab. 1 Pairwise comparison of rRNA sequences. (The numbers of nucleotides differences between all the species analyzed in Fig. 1 are given in the upper right half of the table, and corresponding K_{nuc} values in the lower left half of the table)

	C.r.	G.p.	T.m.	Z.m.	O.s.	L.e.	N.t.	P.p.
<i>C. revoluta</i>		3	3	8	7	6	6	11
<i>G. pensilis</i>	0.028		0	6	5	5	5	8
<i>T. mairei</i>	0.028	0		6	5	5	5	8
<i>Z. mays</i>	0.079	0.058	0.058		1	5	4	11
<i>O. sativa</i>	0.079	0.059	0.059	0.009		4	5	10
<i>L. esculentum</i>	0.069	0.048	0.048	0.048	0.039		2	9
<i>N. tabacum</i>	0.058	0.048	0.048	0.039	0.048	0.019		11
<i>P. parkeae</i>	0.122	0.063	0.063	0.110	0.100	0.089	0.110	

根据表1的数据,我们得到了一个种子植物的rRNA系统树(图2)。从树图中可以十分清楚地看到,传统植物分类学中的裸子植物与被子植物之间具有较大的分子差异,明显地分为两个自然类群(monophyletic group):苏铁与裸子植物水松、南方红豆杉显然构成一个进化关系较为密切的姐妹群,而所有其它被子植物则形成另一大植物类群。可以推测苏铁与松杉类的分歧是在它们的共同祖先与被子植物的祖先分歧一段时间后才发生的。以绿藻作为种子植物群外参照物种,苏铁对绿藻的K_{nuc}值为0.122,被子植物对绿藻的平均K_{nuc}值为0.102,说明它们的分子进化速度无明显差异,苏铁这一进化位置并不是由于一个异常的进化速度所造成的。

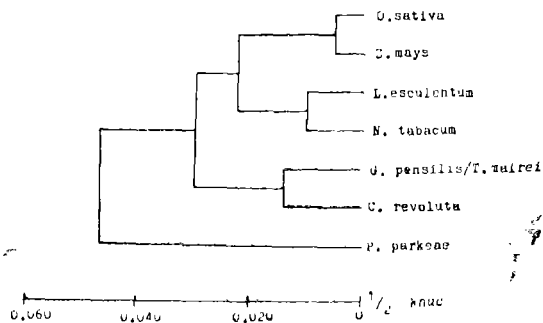


图2 种子植物的rRNA系统树(用表1中的K_{nuc}值和简单成聚法(UPGMA)构建。两个物种间的距离仅仅与它们在X轴(K_{nuc})上的总长度成正比,而Y轴上的距离是任意的)

Fig. 2 Phylogenetic tree of rRNA from the seed plants (The tree was constructed by using UPGMA method with the knuc values from the table 1. In this representation, the distance between two species is proportional to the sum of the projections on the X axis (K_{nuc}) of the branch lengths, while distance on the Y axis is arbitrary)

关于苏铁在种子植物进化中的位置,有三个主要的假说:①种子植物的祖先在与蕨类分歧以后,进化成两大分支,一支包含银杏、松杉类等裸子植物;另一支则包含苏铁类和被子植物,它们有一个直接的共同祖先称为种子蕨(Pteridospermas)^[1]。②苏

铁类与其它裸子植物特别是松杉类关系较近, 为一自然类群, 它们的分歧发生在其共同祖先与被子植物分歧之后^[2]。③裸子植物本身不是一个自然类群, 苏铁与松杉类等其它裸子植物关系较远, 它们沿着不同的路线演化发展^[11,12]。我们的研究结果支持了苏铁类、松杉类等裸子植物作为一个自然类群与被子植物在种子植物进化早期就已分歧的假说^[2], 对苏铁Ls-rRNA部分核苷酸序列研究的结果则与Hori等^[3]对苏铁5s rRNA研究所得到的结论是一致的。研究不同的分子数据, 对于准确地揭示苏铁类分子进化的特征和阐明它在种子植物进化中的位置是十分重要的。同时, 随着获得更多的核苷酸序列数据之后, 我们将可以对苏铁类与松杉类分歧的年代进行较为精确的计算。

此外, 从图2还可以看出, 被子植物某些科属之间的差异已有足够的分辨率(如禾本科、茄科), 但是, 在我们分析的这一段核苷酸的序列中, 没有发现南方红豆杉和水松之间存在差异, 这表明它们之间的分子差异小于一些被子植物科属之间的差异, 所以, 这两种裸子植物的进化关系应该是非常密切的, 我们这一结果显然与Florin把红豆杉科从松柏目分立的观点^[13]相异, 而与Harris的古生物学研究^[14]及王伏雄等从胚胎发育和解剖学研究所得到的结论^[15]一致, 即红豆杉类应该属于松柏目之下。

参 考 文 献

- [1] Margulis L et al., *Five kingdoms*, W. H. Freeman, San Francisco, 1982
- [2] Bold H C, *The plant kingdom*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1970
- [3] Hori H et al., *Mol. Biol. Evol.*, 4(1987), 5, 445~472
- [4] Qu L H et al., *Nucleic Acids Res.*, 11 (1983), 5903~5920
- [5] Qu L H et al., *J. Mol. Evol.*, 28 (1988), 113~124
- [6] F Takaiwa et al., *Gene*, 37 (1985), 255~259
- [7] Kiss T et al., *Nucleic Acids Res.*, 17 (1989), 796
- [8] Perasso R et al., *Nature*, 339 (1989), 142~144
- [9] Kimura M et al., *J. Mol. Evol.*, 16 (1980), 111~120
- [10] Snerth F H A et al., *Humerical taxonomy*, W. H. Freeman and company, San Francisco, 1973
- [11] Chamberlain C J, *Gymnosperms, Structure and Evolution*, University of Chicago Press, Chicago, 1935
- [12] A.S 福斯特等(李正理译), *维管植物比较形态学*, 科学出版社, 1974, 313~314
- [13] Florin R et al., *Bot. Gaz.*, 110 (1948), 31~39
- [14] Harris T M, *The mesozoic gymnosperms.*, Review of Palaeobotany and Palynology 21(1976), 1, 119~134
- [15] 王伏雄等, *植物分类学报*, 17(1979), 3, 1~7

Molecular Evidence for the Status of the Cycad *Cycas revoluta* in Seed-plant Evolution

Qu Lianghu* Yu Xiaoqiang
Shi Suhua Zhang Hongda

Abstract

More than 100 nucleotides of the 5' terminal region of Ls-rRNA from *Cycas revoluta* Thunb., *Glyptostrobus pensilis* (Staunt.) Koch and *Taxus mairei* (Lévl) S.Y. Hu were determined by the rapid rRNA sequencing method. The phylogenetic tree of rRNA constructed with these data reveal that the Cycad and coniferous trees constitute a closely related sister group, whereas the angiosperms form another monophyletic group. This position of the Cycad is not the result of an aberrant rate in molecular evolution, indicated by *Pyramimonas parkeae* as an outgroup reference. Our result support the hypothesis that the Cycad and coniferous trees were a monophylatic group and the seperation of these species occured after their seperation from the ancestor of flowering plants.

Keywords: *Cycas revoluta*, gymnosperma, phylogenetic evolution, rRNA, nucleotide sequence

* Biotechnology Research Center