

用叶绿体和核糖体 DNA 序列探讨中国特有植物 斑孑麻黄的系统位置

王庆彪* 王莉* 周仁超 赵晓敏 施苏华 杨永† 钟扬†

(复旦大学生命科学学院生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433; 中山大学生命科学学院基因工程教育部重点实验室, 广州 510275; 中国科学院植物研究所系统与进化植物学重点实验室, 北京 100093; 上海生物信息技术研究中心, 上海 201203. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: ephedra@ibcas.ac.cn; yangzhong@fudan.edu.cn)

摘要 测定了我国特有植物斑孑麻黄的叶绿体 *matK* 和 *rbcL* 基因以及核糖体 18S 基因和 ITS 区的序列, 选取麻黄属 15 个物种的 16 个类群(含旧大陆 8 种和新大陆 7 种)进行分子系统发育分析, 探讨斑孑麻黄的系统位置. 基于最大简约法(MP)、邻接法(NJ)、最小进化法(ME)和最大似然法(ML)的独立与联合分析均表明斑孑麻黄与木贼麻黄关系最近. 根据相对速率检验结果, 结合前人所建立的麻黄属 *rbcL* 基因进化速率估计斑孑麻黄与木贼麻黄的分歧时间约为 10.85 ± 2.44 Ma.

关键词 麻黄属 斑孑麻黄 cpDNA *matK* 基因 *rbcL* 基因 rDNA 18S 基因 nrDNA ITS 区 系统发育分析

买麻藤纲(Gnetopsida)与被子植物共有某些重要性状(如双受精和导管分子等)^[1,2], 因而在植物系统发育研究中占有特殊地位. 近年来, 形态与分子证据已表明买麻藤目(Gnetales)、百岁兰目(Welwitschiales)和麻黄目(Ephedrales)为一个单系类群, 其中麻黄目(单科单属)处于基出位置^[3,4]. 然而, 由于麻黄类植物间的亲缘关系错综复杂, 加之材料取样方面的困难, 目前有关该类植物的系统分类与进化研究中仍存在许多疑难问题, 而寻找其原始类群一直被认为是了解麻黄进化的关键性工作^[5-8].

化石记录对研究植物起源和演化具有十分重要的意义. 麻黄类植物在地层中的孢粉记录较多, 但大化石十分罕见, 已报道的大化石大多保存状态较差, 无法与现存类型比较^[9,10]. 直到最近, 在我国辽西地区的早白垩纪地层中发现了距今约 1.25 亿年的麻黄类大化石^[11-13]. 其中, 古斑孑麻黄(*Ephedra archaeorhynchoides*)被认为是最早的、性状与现存麻黄类最相近的生殖器官大化石^[13]. 该化石标本因与我国特有植物斑孑麻黄(*E. rhytidospema*)形态相近而得名, 这是迄今发现的保存完好且惟一可明确归入麻黄属的大化石. 尽管这一发现对确定麻黄类的起源与演化具有重要意义, 但作者并未肯定斑孑麻黄就是现存麻黄属植物中最原始的物种. 鉴于国际上麻黄的分子系统发育研究尚未涉及斑孑麻黄^[7,8,14-16], 我们首次利用叶绿体 *matK* 和 *rbcL* 基因以及核糖体 18S 基因和 ITS 区序列来探讨斑孑麻黄的系统位置, 并粗略估

计该种的起源时间.

我们从宁夏回族自治区贺兰山地区不同斑孑麻黄居群中采集新鲜叶片(凭证标本存中国科学院北京植物所国家植物标本馆), 经硅胶干燥后, 用改进的 CTAB 法提取总 DNA^[17]. *matK* 基因扩增引物为 *trnK*-2R 与 *trnK*-3914F, *rbcL* 和 18S 基因引物参照文献[8], ITS1 和 ITS2 间隔区以及 5.8S 编码区扩增引物为 ITS4 和 ITS5^[18]. 扩增产物用华舜 PCR 产物纯化试剂盒纯化, 用 BigDye 循环测序试剂盒在 ABI 377 自动测序仪上测定 DNA 序列, 分别由中山大学基因工程教育部重点实验室和复旦大学生物多样性与生态工程教育部重点实验室测定. 自测序列和其他 DNA 序列的 GenBank 收录号见表 1, 其中 DQ028779~DQ028782 及 DQ212957~DQ212960 来自于两个不同的斑孑麻黄居群; *Gnetum* 序列分别来自于 *G. hainanense*, *G. urens*, *G. leyboldii* 和 *G. gnemon* 4 个种; *Welwitschia* 序列来自 *W. mirabilis*. 序列对位排列采用 Clustal-X 程序^[19], 并经手工检查和校正.

我们采用最大简约法(MP)^[20]、邻接法(NJ)^[21]、最小进化法(ME)^[22]和最大似然法(ML)^[23]分别对叶绿体 *matK* 和 *rbcL* 基因以及核糖体 18S 基因和 ITS 区序列进行系统发育分析. 外类群为百岁兰属(*Welwitschia*)和买麻藤属(*Gnetum*)^[8]. 为了提高系统发育分析的准确性, 我们进一步选择共有上述 4 种基因和分属 Stapf(1889)系统膜果麻黄组(Sect. *Alatae*)、干苞麻黄组(Sect. *Asarca*)和麻黄组(Sect. *Ephedra*)的 16 个类群

表 1 本研究用代表种及 GenBank 登录号

种名	GenBank 收录号				分布区	组 ^{a)}
	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	18S	ITS		
<i>E. antisiphilitica</i>	AY492031	AY492008	AY755682	AY755757	北美	<i>Alatae</i>
<i>E. aphylla</i>	AY755802	AY492009	AY755695	AY755771	非洲	<i>Ephedra</i>
<i>E. californica</i>	AY492033	AY492011	AY755676	AY755750	北美	<i>Asarca</i>
<i>E. chilensis</i>	AY492036	AY492012	AY755679	AY755754	南美	<i>Alatae</i>
<i>E. distachya</i>	AY492035	AY492013	AY755686	AY755769	亚洲、欧洲	<i>Ephedra</i>
<i>E. equisetina</i>	AY755783	AY492014	AY755666	AY755770	亚洲	<i>Ephedra</i>
<i>E. fragilis</i>	AY755784	AY492015	AY755677	AY755752	非洲、欧洲	<i>Ephedra</i>
<i>E. intermedia</i>	AY056566	AY492016	AY755683	AY755758	亚洲	<i>Ephedra</i>
<i>E. minuta</i>	AY492041	AY492019	AY755681	AY755756	亚洲	<i>Ephedra</i>
<i>E. nevadensis</i>	AY492042	AY492020	AY755688	AY755764	北美	<i>Ephedra</i>
<i>E. rhytidosperma</i>	DQ028779 ^{b)}	DQ028780 ^{b)}	DQ028781 ^{b)}	DQ028782 ^{b)}	亚洲	<i>Ephedra</i>
	DQ212957 ^{b)}	DQ212960 ^{b)}	DQ212959 ^{b)}	DQ212958 ^{b)}		
<i>E. sinica</i>	AY492046	AY492024	AY755675	AY755749	亚洲	<i>Ephedra</i>
<i>E. torreyana</i>	AY492047	AY492025	AY755684	AY755759	北美	<i>Alatae</i>
<i>E. trifurca</i>	AY492048	AY492026	AY755687	AY755762	北美	<i>Alatae</i>
<i>E. tweediana</i>	AY492049	AY492027	AY755692	AY755768	南美	<i>Alatae</i>
<i>Gnetum</i> ^{c)}	AY296546	AY449629	L24045	AY449561		
<i>Welwitschia</i> ^{c)}	AJ235814	AF280996	AF207059	U50740		

a) 按 Stapf(1889)分类系统; b) 本研究所测序列; c) 外类群

(含旧大陆 8 种和新大陆 7 种)构建叶绿体和核糖体序列的联合数据矩阵, 并据此进行 ML 分析. 采用了分划同质性检验(partition homogeneity test)评价联合分析的可靠性^[24]. ML 搜索所用核苷酸置换模型为 HKY 模型^[25]和 Γ 分布, 同时考虑置换速率和核苷酸频率的异质性. ML 系统树各分枝的支持率为自展(bootstrap)百分率(1000 次重复, 启发式搜索). 用相对速率检验(relative-rate test)方法检测每个序列数据集所产生系统树中各分枝进化速率差异的显著性^[26,27], 以进化速率恒定的序列数据集和种子植物分歧时间(290 Ma)以及 Jukes-Cantor 单参数距离作为估计起源时间的依据^[7,28]. 上述所有计算采用 PAUP 4.0 和 MEGA 3.0 软件包以及 RRT 1.1 软件完成^[24,28,29].

上述分子系统发育分析的结果表明: () 分子证据并不支持传统的 Stapf 分类系统, 即膜果麻黄组与麻黄组均不构成单系类群(图 1), 这与 Ickert-Bond 等人^[14]以及 Huang 等人^[15]最近的研究结果一致. 构建的系统树将 15 种麻黄分为南美洲、北美洲、旧大陆 3 组, 与各所属的地理位置相一致, 据此可推断现存麻黄在各大洲的辐射扩散应于冈瓦纳古大陆分裂之后; () 所有系统树均支持斑麻黄与木贼麻黄(*E. equisetina*)构成单系类群, 自展支持率为 74%~100%, 这一结果验证了 Pachomova^[30]和 Mussayev^[31]

基于形态证据所做的推测; () 叶绿体和核糖体序列分别构建的联合数据矩阵可以产生分辨率最高的系统树(叶绿体和核糖体序列的分划同质性检验结果分别为 $P = 0.433$ 和 $P = 0.763$), 而 4 个基因联合构建的系统树在拓扑结构上与各基因独立构建的系统树相似, 但因麻黄存在种间杂交现象^[32], 导致核基因与叶绿体基因联合之后的系统树分辨率降低; () 在种间水平, 只有叶绿体 *rbcL* 基因和核糖体 18S 基因通过了相对速率检验, 即可以用若干已知分歧事件(如种子植物分歧时间)作为分子钟标尺来计算绝对进化速率. 由于用 18S 基因序列构建的麻黄属系统树分辨率太低(不能区分新、旧大陆物种), 我们仅采用了 *rbcL* 基因序列和 Huang & Price 所建立的绝对进化速率($(2.353 \pm 0.205) \times 10^{-10}$ 碱基替换/位点)^[7]估计出斑麻黄与木贼麻黄的分歧时间为 10.85 ± 2.44 Ma. 这一粗略估计结果表明, 我国辽西发现的相关化石物种 *E. archaeorhytidospurma* 与斑麻黄的亲缘关系可能不如化石物种名所预示的那么接近; 化石物种与貌似相近的现生物种的关系有待进一步研究. 总之, 我们的系统发育分析结果确定斑麻黄与木贼麻黄的关系最近, 但仍不能肯定斑麻黄是否为麻黄类的最原始类群, 还需要更多的取样和更多的分

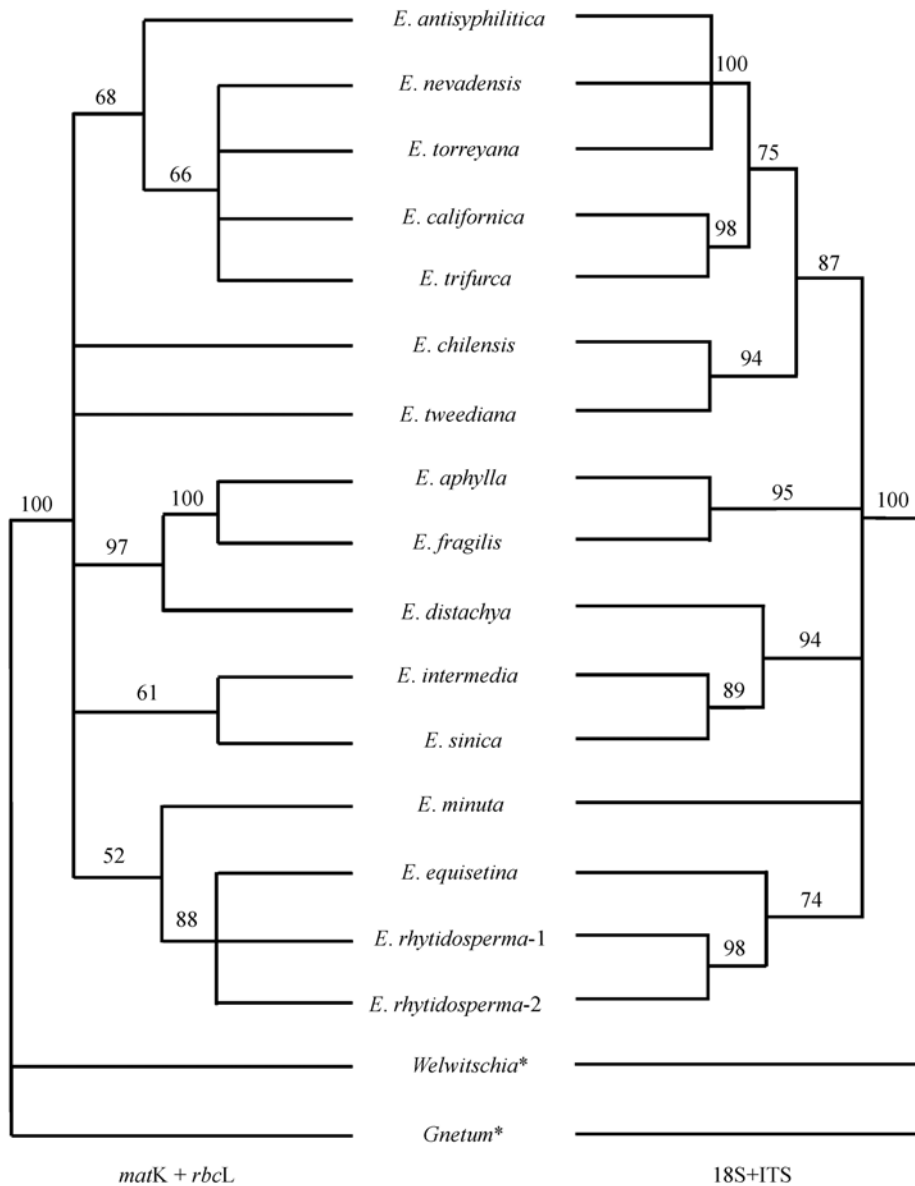


图1 基于叶绿体 *matK* 与 *rbcL* 基因以及核糖体 18S 基因与 ITS 序列联合数据集构建的 ML 系统树
图中数字表示分支自展支持率(%); * 代表外类群

子序列。我们进一步的工作将围绕麻黄碱化合物在麻黄类及裸子植物中的分布与起源研究开展¹⁾。

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: 2003CB715904)和国家自然科学基金(批准号: 30230030, 30370105)资助项目。

参 考 文 献

1 Price R A. Systematics of the Gnetales: A review of morphological and

molecular evidence. Int J Pl Sci, 1996, 157(Suppl): S40~S49[DOI]

2 Friedman W E. Sexual reproduction in *Ephedra nevadensis* (Ephedraceae): Further evidence of double fertilization in a non-flowering seed plant. Am J Bot, 1990, 77: 1582~1598

3 Bove L M, Coat G, Depamphilis C W. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: Extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4092~4097[DOI]

4 Chaw S M, Parkinson C L, Cheng Y, et al. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gym-

1) 王庆彪, 等. 裸子植物中麻黄碱类化合物起源的分子系统发育证据(待发表)

- nosperms and origin of Gnetales from conifers. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4086~4091[DOI]
- 5 Rydin C, Mohr B, Friis E M. *Cratonia* cotyledon gen. et sp nov.: A unique Cretaceous seedling related to *Welwitschia*. Proc Royal Soc London Ser B-Biol Sci, 2003, 270(Suppl): S29~S32[DOI]
- 6 陶君容, 杨永. 吉林延边早白垩世大拉子组植物化石新类型——星学异麻黄. 古生物学报, 2003, 42: 208~215
- 7 Huang J L, Price R A. Estimation of the age of extant *Ephedra* using chloroplast *rbcL* sequence data. Mol Biol Evol, 2003, 20: 435~440[DOI]
- 8 Rydin C, Pedersen K R, Friis E M. On the evolutionary history of *Ephedra*: Cretaceous fossils and extant molecules. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 16571~16576[DOI]
- 9 Wu X W, He Y L, Mei S W. Discovery of ephedrites from the Lower Jurassic Xiaomeigou formation, Qinghai. Acta Palaeobotanica Sin, 1986, 8: 13~21
- 10 Crane P R. The fossil history of the Gnetales. Int J Pl Sci, 1996, 157(Suppl): S50~S57[DOI]
- 11 Guo S X, Wu X W. Ephedrites from Latest Jurassic Yixian formation in western Liaoning, Northeast China. Acta Palaeontol Sin, 2000, 39: 81~91
- 12 Sun G, Zheng S L, Dilcher D L, et al. Early angiosperms and their associated plants from western Liaoning, China. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Education Publishing House, 2001
- 13 Yang Y, Geng B Y, Dilcher D L, et al. Morphology and affinities of an early Cretaceous *Ephedra* (Ephedraceae) from China. Am J Bot, 2005, 92: 231~241
- 14 Ickert-Bond S M, Wojciechowski M E. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Gnetales): Evidence from nuclear and chloroplast DNA sequence data. Syst Bot, 2004, 29: 834~849 [DOI]
- 15 Huang J L, Giannasi D E, Huang J. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Ephedraceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. Mol Phylogenet Evol, 2005, 35: 48~59[DOI]
- 16 Long C, Kakiuchi N, Takahashi A, et al. Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non-coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of *Ephedra* plants in China. Planta Med, 2004, 70: 1080~1084[DOI]
- 17 Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19: 11~15
- 18 Shi S, Huang Y, Zhong Y, et al. Phylogeny of the Altingiaceae based on cpDNA *matK*, PY-IGS and nrDNA ITS sequences. Pl Syst Evol, 2001, 230: 13~24[DOI]
- 19 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4876~4882[DOI]
- 20 Fitch W M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Syst Zool, 1971, 20: 406~416
- 21 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406~425
- 22 Zhetsky A, Nei M. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. Mol Biol Evol, 1993, 10: 1073~1095
- 23 Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. J Mol Evol, 1981, 17: 368~376 [DOI]
- 24 Swofford D L. PAUP* 4.0. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sunderland: Sinauer Associates, 1999
- 25 Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J Mol Evol, 1985, 22: 160~174[DOI]
- 26 Li P, Bousquet J. Relative-rate test for nucleotide substitutions between two lineages. Mol Biol Evol, 1992, 9: 1185~1189
- 27 钟扬, 施苏华, 唐先华, 等. 红树科 6 属 cpDNA 和 nrDNA 序列相对速率检验及分歧时间估计. 科学通报, 2000, 45(1): 40~44[PDF]
- 28 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings Bioinform, 2004, 5: 150~163[DOI]
- 29 Robinson-Rechavi M, Huchon D. RRTree: Relative-rate tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. Bioinformatics, 2000, 16: 296~297[DOI]
- 30 Pachomova M G. Ephedraceae. In: Glubov V I, Matzenko M G, Pachomova M G, eds. Plantae Asiae Centralis. Komarovii, Leningrad: Academia Scientiarum URSS Institutum Botanicum nomine VL, 1971, 6, 25~33
- 31 Mussayev I F. On geography and phylogeny of some representatives of the genus *Ephedra* L. Bot Zhurnal, 1978, 63: 523~543
- 32 Wendt T. A new variety of *Ephedra torreyana* (Ephedraceae) from West Texas and Chihuahua, with notes on hybridization in the *E. torreyana* complex. Phytologia, 1993, 74: 141~150

(2005-09-24 收稿, 2005-11-29 接受)