

## 叶绿体基因组变异性的植物系统学意义(综述)

王 艇 苏应娟 张 力

(中山大学生命科学学院, 广州 510275) (中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

### CHLOROPLAST DNA VARIATION IN THE STUDY OF PHYLOGENETICS

Wang Ting Su Yingjuan

(School of Life Sciences, Zhangshan University, Guangzhou 510275)

Zhang Li

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

现代分子生物学技术的不断进步和革新极大地提高了人们分析和比较大片段 DNA 分子的能力。这种趋势对系统学研究所产生的影响之一, 就是近年来通过比较 DNA 性状来探讨系统发育问题业已发展成为一门专门的学科—分子系统学。在植物分子系统学领域, 目前采用的分子数据主要来自两个方面: 一是叶绿体基因组, 另一是核编码的核糖体 DNA 重复区。本文就叶绿体基因组变异性在植物系统发育研究方面的应用状况作一综述。

## 1 叶绿体基因组

### 1.1 基因组的发现

叶绿体是绿色植物进行光合作用的重要细胞器。在 1909 年, 根据高等植物叶片花斑性状的非孟德尔遗传现象, 有人推测叶绿体内存在遗传物质。1954 年以后, Sager 等人以藻类为材料, 初步揭示了叶绿体母系遗传规律。1962 年, Ris 等在衣藻、玉米等植物的叶绿体内用电镜观察到 DNA 纤维, 证明了叶绿体 DNA(cpDNA) 分子的存在<sup>[1]</sup>。1963 年 Sager 和 Ishida 从衣藻叶绿体, Gibor 和 Izawa 从伞藻叶绿体中分离出 DNA<sup>[2]</sup>。这样, 叶绿体中存在 DNA 的事实得到承认。

### 1.2 结构

**大小和形状** 对 200 多种被子植物、其他陆生植物和一些主要藻类的代表的研究表明, 几乎所有叶绿体 DNA 的大小都在 120 kb 到 160 kb 之间这个狭窄的范围内。单子叶植物 cpDNA 的大小在 111 kb 至 182 kb 变动, 双子叶植物的 cpDNA 在 117 kb 至 165 kb 间。目前知道仅有 3 种被子植物的 cpDNA 不在此范围, 另外少数藻类 cpDNA 大小变动范围也很大<sup>[3]</sup>。

电镜观察和限制图谱的研究结果显示, 完整的 cpDNA 是共价闭合环状的双链分子, 即

cccDNA。伞藻的 cpDNA 有可能例外，它以线性分子的形式存在并且构成复杂的网状结构。在体内 cpDNA 保持超螺旋的构型。cpDNA 大多以单环形式存在，但也有少数以双环甚至多环相套的形式存在，它们聚集在一定区域形成一种拟核结构。

**特点** 高等植物 cpDNA 的最显著特征是具有一对反向重复序列。位于重复序列之间的单拷贝区大小不等，因而 cpDNA 可分为四个区域：(1) 两个反向重复区 (IR, Inverted repeat)，大多数被子植物 cpDNA 的 IR 区长约 22–28 kb；(2) 大单拷贝区 (LSC, Large single copy)，长约 81–87 kb；(3) 小单拷贝区 (SSC, Small single copy)，18–20 kb。某些豆科植物，如蚕豆、豌豆不具反向重复区，其中的一个重复区可能丢失。在少数藻类中存在一些大的同向重复或随机取向的重复区而不具反向重复区<sup>[3]</sup>。

### 1.3 编码基因

从地钱、烟草和水稻的全序列结构及其他许多植物 cpDNA 的基因图谱知道，叶绿体基因组一般编码 120–150 个基因。对这些基因及其产物的分析表明，叶绿体基因组虽然编码了自身使用的全部 rRNA 和 tRNA，但是仅编码了叶绿体内数百种蛋白和多肽的一小部分。叶绿体中绝大多数蛋白复合体是由核基因组和叶绿体基因组共同编码的<sup>[4–6]</sup>。

叶绿体 DNA 两条链都会活跃地表达，许多叶绿体基因成簇排列为多顺反子型操纵元 (Polycistronic operon)，编码核糖体 RNA 的四个基因就是如此。这些操纵元的基因排列顺序和表达方式与原核生物的基因具高度相似性<sup>[7]</sup>。

### 1.4 进化特点

陆生植物 cpDNA 各方面的进化速率都是较慢的，这主要表现在：(1) 所有陆生植物叶绿体基因组的大小、编码基因的数目和基因的排列顺序是相似的；(2) 叶绿体的编码基因是高度保守的。

如前所述，被子植物和其他陆生植物 cpDNA 的大小均在 120–160 kb 之间。其中只有尖叶烟草 (*Nicotiana accuminata*) 171 kb、少根紫萍 (*Spirodela oligorrhiza*) 180 kb 和天竺葵 (*Pelargonium hortorum*) 217 kb 例外<sup>[3,8,9]</sup>。由此可见陆生植物叶绿体基因组在大小上的差异不足 2 倍。cpDNA 编码基因的数目也高度保守。地钱和烟草约在 4 亿年前分歧，但是两者的叶绿体基因在数目和构成上却非常相似，地钱 cpDNA 约有 136 个基因，其中 9 个是重复的；烟草 cpDNA 约有 150 个基因，25 个为重复的，它们的非重复基因的数目极其接近。另外，叶绿体基因的排列顺序也很保守。大多数被子植物、至少一种蕨类植物和一种裸子植物，它们都具有烟草型的基因排列顺序。烟草同地钱叶绿体基因的排列顺序也仅有一个倒位 (Inversion) 的差别。

总体上，陆生植物 cpDNA 的核苷酸替换率较低。叶绿体基因的沉默替换率 (Rate of silent substitution) 平均比核基因低 2 至 3 倍，比动物线粒体基因低 20 倍<sup>[7]</sup>。

### 1.5 遗传方式

就已研究的所有陆生植物而言，叶绿体基因组的遗传方式属单亲遗传。大多数被子植物的 cpDNA 由母本遗传。叶绿体的双亲遗传 (Biparental inheritance) 现象罕见，估计在被子植物的

属中只占14%<sup>[10]</sup>。在裸子植物中, 叶绿体由父本传递。例如落叶松属(*Larix*)的cpDNA按父性遗传方式遗传<sup>[11]</sup>。在双亲都将叶绿体传递给子代的植物中, 两种叶绿体及其基因组不会发生融合和重组; 在体细胞的发育过程中, 来自一方的叶绿体最终将被排斥掉。

## 2 叶绿体基因组的变异

**大小的变异** 被子植物叶绿体基因组大小的变异幅度是97 kb, 其中2/3的长度是因为反向重复区的伸长或缩短引起的, 而整个基因组的复杂性并不发生变化。陆生植物cpDNA的序列复杂性仅为110–150 kb。天竺葵cpDNA为217 kb, 它的反向重复区长达76 kb, 几乎是其他被子植物反向重复区长度的3倍<sup>[12,13]</sup>。包括蚕豆和豌豆在内的一些豆科植物, 它们的反向重复区缺失, 结果cpDNA只有120 kb, 比具有最短反向重复区的被子植物的cpDNA还小15 kb<sup>[14,15]</sup>。叶绿体基因组大小的变异主要是由反向重复区的伸缩决定的。

**排列顺序的变异** 在陆生植物的cpDNA中, 可以改变基因排列顺序的倒位和其它突变发生的频率极低。检查30个科的被子植物后发现其中24个科的叶绿体基因组具有同样的基因排列顺序<sup>[16,17]</sup>。在呈现出差异的叶绿体基因组间, 基因排列顺序的不同是由1或2次大的倒位引起的。天竺葵、桔梗科(*Campanulaceae*)和一些豆科植物, 它们叶绿体基因的重排现象较频繁。天竺葵cpDNA在它的大单拷贝区有2次倒位, 在反向重复区最少有2次倒位。桔梗科植物cpDNA中发生过数次重排, 但是倒位的大小和位置还未确定。豆科植物的cpDNA不具反向重复区, 在这类植物中至少存在三种互相独立的重排方式。蚕豆的cpDNA至少发生过两次大的倒位; 豌豆cpDNA约发生过12次倒位; 红花草cpDNA的重排更为复杂, 倒位数目不详。反向重复区的大小变化可能会对重排发生的频率产生影响。总之, 倒位是引起叶绿体基因排列顺序变异的主要原因。

**序列复杂性的变异** 被子植物cpDNA序列复杂性的变异多是一些非常小的长度突变(Length mutation)的结果。序列分析表明最常见的此类突变是1至10 bp的缺失和插入<sup>[18,19]</sup>, 主要发生在非编码区, 总是靠近或带有短的同向重复侧翼。50–1200 bp大的长度突变发生的频率极低。长度突变集中发生在一些“热点(hotspot)”附近<sup>[20]</sup>, 尤其是位于大单拷贝区的两端<sup>[21]</sup>。

## 3 叶绿体DNA数据在植物系统学研究中的应用

以B. A. Atchison等和F. Vedel等人的研究工作和发表的论文作为标志, 叶绿体DNA系统学(Chloroplast DNA systematics)的出现已有20年的历史。1976年7月, 澳大利亚科学家Atchison等以菠菜等8种植物叶片为材料, 通过差速离心(Differential centrifugation)分离到叶绿体, 然后用限制酶EcoRI直接去消化叶绿体。破裂叶绿体膜后, 乙醇沉淀得到核酸。他们将提取到的核酸样品用1%的水平琼脂糖凝胶电泳分离后, 观察发现cpDNA电泳结果的相似程度与植物间亲缘关系的远近相关<sup>[22]</sup>。同年8月, 法国科学家Vedel等人也从豌豆、菠菜和烟草等植物的叶片中分离出cpDNA, 使用直径8 mm、长度35 cm的圆柱状琼脂糖凝胶电泳分析了cpDNA的EcoRI消化产物; 并且首次提出这种方法对讨论一些重要属内的系统发育非常有用<sup>[23]</sup>。此后, cpDNA限制图谱、叶绿体基因序列等数据也不断引入系统学研究, 叶绿体分子系统学开始迅速兴起。

### 3.1 叶绿体分子系统学的特点

叶绿体分子系统学通过对叶绿体中所含的遗传物质进行分析来探讨植物的系统发育关系。它具有如下特点: (1) cpDNA 序列和基因排列顺序的高度保守性为获取数据提供了便利条件, 使得 cpDNA 的分子数据积累很快; 按目前的技术条件, 2 至 3 个月之内就可得到构建一种植物 cpDNA 限制图谱所需的整套分子杂交资料; (2) 叶绿体的 *rbcL* 基因序列很适合于探测植物间的系统关系; 迄今已有 1500 余种植物的 *rbcL* 基因序列得以测定, 而且新的数据还在日益增多, 这就允许在大范围内讨论植物的系统学问题; 另外, 此基因长达 1.4 kb, 能为分析提供充足的分子性状; (3) 当用限制位点突变进行分析时, 每个位点可以作为一个简单的二态性状处理; 当分析核苷酸序列数据时, 每个核苷酸位置可以作为四态性状处理, 构建数据矩阵相当方便; (4) cpDNA 数据中的同型异源性 (Homoplasy) 的总体水平只有 3.9%, 趋同演化 (Convergence) 和平行演化 (Parallelism) 很少发生<sup>[24-26]</sup>。

### 3.2 叶绿体分子系统学的一些研究进展

通过比较叶绿体基因组可以在各种分类等级上探讨植物系统学问题。

**种内关系** 种内 cpDNA 的差异甚微。对取自 63 个种群 153 个扭松 (*Pinus contorta*) 个体和取自 68 个种群 115 个北美短叶松 (*P. banksiana*) 个体的 cpDNA 检测后发现, 扭松和北美短叶松 cpDNA 的 *SalI* 带型没有种内差异; 对于 cpDNA 的 *SstI* 带型, 也有 68% 的扭松个体和 74% 的北美短叶松个体的带型是相同的<sup>[27]</sup>。对羽扇豆 (*Lupinus texensis*) 21 个种群 100 个个体的检测, 以及其他植物的研究也都表明同种植物的 cpDNA 间差异不大<sup>[28,29]</sup>。

在研究一些作物如芸苔属 (*Brassica*) 植物、大麦或玉米的起源时, 找到 cpDNA 的种间差异对研究具有重要意义。此时可以使用更多的酶, 尤其是切割频率高的酶去处理 cpDNA。

**种间关系** 根据 cpDNA 限制位点变异性判断植物种间水平上的植物系统关系, 这方面的工作已有不少报道。其中比较典型的成果是对芸苔属的研究。结果表明, *B. carinata* 这个双二倍体是由黑苔菜 (*B. nigra*) 和甘蓝 (*B. oleracea*) 这两个二倍体分别作母本和父本杂交而来的; 芥菜 (*B. juncea*) 是由芸苔 (*B. campestris*) 作母本黑苔菜作父本杂交而来。另外还发现应该把萝卜 (*Raphanus sativus*) 置于芸苔属内的两组植物之间<sup>[16]</sup>。

对春再来属 (*Clarkia*) 和 *Heterogaura* 属的研究认为应该重新考虑这两个属的界限。尽管 *Heterogaura heterandra* 和春再来属的形态特征很不相同, 但分子水平的研究却显示它是由春再来属衍生而来的<sup>[30]</sup>。

比较亚麻属 (*Linum*) 一些种之间 cpDNA 的限制酶切图谱发现 8 种亚麻属植物可以分为两个分支: 亚麻 (*L. usitatissimum*)、*L. bienne*、大花亚麻 (*L. grandiflorum*) 和 *L. marbonense* 之间的关系密切; 而宿根亚麻 (*L. perenne*)、*L. boreale*、高山亚麻 (*L. alpinum*) 和刘易斯亚麻 (*L. lewisii*) 之间的关系更为密切。此结果与传统分类上把它们分为 (1) 和 *L. perenne* 相关的类群, (2) 和 *L. perenne* 无关的类群的处理方式相一致<sup>[31]</sup>。

根据 cpDNA 限制位点变异性对金鸡菊属 (*Coreopsis*) 金鸡菊组 (Section *Copropsis*) 的 9 种植物进行了研究<sup>[32]</sup>, 认为此组应分成两个类群: 多年生的 *C. auriculata* 和 *C. pubescens* 组成一个类群; 其余的 7 种植物组成一个类群而且可以划分为三个分支: (1) 3 个多年生种大花金鸡草 (*C.*

*grandiflora*)、*C. intermedia* 和剑叶金鸡菊 (*C. lanceolata*) 为一个分支, (2) 3 个一年生种 *C. basalis*、*C. nuecensoides* 和 *C. nuecensis* 为一个分支, (3) 另外一个一年生种 *C. wrightii* 为一个分支。此结果与以往的推测有较大不同。

此外, 胡萝卜属 (*Daucus*)、番茄属 (*Lycopersicon*)、草棉属 (*Gossypium*)、*Viguiera* 属和大麦属 (*Hordeum*) 这些属的叶绿体分子系统学研究均有报道<sup>[33,34]</sup>。

**科的关系** 与同属植物相比, 我们对属间及其以上分类阶层之间的系统关系更加缺乏了解。所以属以上水平的叶绿体分子系统学较早就引起研究者重视。

(1) 菊科 (*Asteraceae*) 按照 Cronquist 的意见<sup>[35]</sup>, 菊科是植物的科中最大、花结构进化得最成功的科之一; 它含 12-17 个族, 约 1100 个属, 2000 种。其特化的花的形状组合支持这个科是一个单系类群 (Monophyletic group)。在 Thorne 系统<sup>[36]</sup>中, 特别强调这个科的特化性状, 将其单独建立菊超目放置在双子叶植物亚纲中最为进化的位置。化石和生物地理的研究认为菊科起源于中至上渐新世 (Oligocene) (3000 万年以前), 然后迅速分化。在过去的 30 年中, 有关这个科中亚科和族之间的系统关系提出有 6 种不同意见。大多数近期的分类意见都主张承认菊亚科 (*Asteroideae*) 和菊苣亚科 (*Cichorioideae*) 这两个亚科。但是, 在亚科的界限、单系族的数目和族间关系的问题上却一直都没有达成共识<sup>[37]</sup>。为了帮助理清这个复杂科的科内关系, 通过研究叶绿体基因的排列方式、比较限制位点图谱和 *rbcL* 基因序列获得所需数据, 分析菊科及其相关科的 cpDNA 变异性<sup>[38,39]</sup>。结果显示, 在菊科中由于一个倒位的差别, 叶绿体基因可以分为两种不同的排列方式。帚菊木族 (*Mutisieae*) 的 *Barnadesiinae* 亚族同其他十个估计与菊科相关的科具有相同的叶绿体基因排列顺序; 菊科中其他被检测的成员 (取自 16 个族 56 个属) 叶绿体基因组都存在一个 22 kb 的倒位。这反映出: 第一, 帚菊木族是个并系类群; 第二, *Barnadesiinae* 亚族是菊科其余成员的姐妹群。而第二点是菊科内最具争议的系统学问题。限制图谱的研究也认为 *Barnadesiinae* 亚族是以二分式分歧 (*Dichotomy*) 同菊科其余成员分离开来; 帚菊木族是一个并系类群, 这个族中 *Barnadesiinae* 亚族、帚菊木亚族和 *Nassauviinae* 亚族三个亚族是单系群。cpDNA 系统学进一步研究还为菊科内族、亚科的范围和族之间的关系提供了证据, 认为菊亚科 (*Asteroideae*) 是个单系群, 包括万寿菊族 (*Tageteae*)、向日葵族 (*Heliantheae*)、泽兰族 (*Eupatorieae*)、金盏花族 (*Calenduleae*)、千里光族 (*Senecioneae*)、旋覆花族 (*Inuleae*)、春黄菊族 (*Anthemideae*) 和菊族 (*Astereae*) 这 8 个族。其余的族组成一个并系类群, 表明菊苣亚科不是个自然群。分子系统学还同时明确了族之间的系统学关系。

(2) 兰科 (*Orchidaceae*) 兰科的瘤瓣兰亚族 (*Oncidiinae*) 包括 75 个属, 1500 种。其花和营养器官的形态以及染色体数目等性状都极为分化。这个亚族长期以来都认为是“自然的”, 并且同西半球的其他兰亚族独立存在。其中两个最大的属, 瘤瓣兰属 (*Oncidium*) (450 种) 和齿瓣兰属 (*Odontoglossum*) (250 种), 自从 19 世纪 40 年代就被认为是存有疑问的。cpDNA 分子系统学研究显示这两个属不是单系属<sup>[7]</sup>。特别是瘤瓣兰属不是基于近裔共性 (*Synapomorphy*) 建立的, 它是一个并系类群。传统理论认为, 瘤瓣兰亚族是一个孤立的亚族, 然而分子系统学却显示它同双柄兰亚族 (*Bifrenariinae*)、长粉柄兰亚族 (*Lycastinae*)、鳃兰亚族 (*Maxilariinae*)、树生兰亚族 (*Xylobiinae*)、特别是洛克兰亚族 (*Lockhartiinae*) 和乌头兰亚族 (*Ornithocophalinae*) 这些亚族都有关系。另外, 对瘤瓣兰亚族中染色体数目的进化也进行了分

子系统学探讨。这个亚族内不同种间染色体的数目  $n = 5 - 30$ 。过去的假设认为这个范围是由于染色体数目较少的种间相互杂交的结果。cpDNA 的分析结果表明此类群中染色体数目较少的种是由几个染色体数目较多的谱系平行退化 (Parallel reduction) 的结果。上述 cpDNA 系统学的研究结果也与一些其他研究得到的结果相似。

(3) 豆科 (Fabaceae) 豆科植物中有些 cpDNA 重排现象对系统发育的研究较为有用<sup>[40]</sup>。对豆科三个亚科的植物进行检测, 发现所有成员的叶绿体基因组中存在 2 个重排, 即一个 50 kb 的倒位和一个 rp122 基因的缺失。这两次重排可以认为是豆科植物特有的标记<sup>[7]</sup>。对具蝶形花的 50 个属 (主要取自菜豆族 (Phaseoleae) 的研究证实, 它们的叶绿体基因组中都发生一次几乎包括所有大单拷贝区在内的长达 78 kb 的倒位<sup>[41]</sup>。这个倒位性状为所有菜豆亚族 (Phaseolinae) 的成员共有。因此, 蝶豆属 (*Clitoria*) 和距瓣豆属 (*Centrosema*) 由于不具这个性状应该从此亚族中分出; 而硬皮豆属 (*Macrotyloma*) 应归属哪个亚族一直存有争议, 因具有这个倒位性状所以应放置于菜豆亚族。有些豆科植物缺乏反向重复区。这个反向重复区是陆生植物的标记。在已检测的近 1 000 种陆生植物 cpDNA 中, 反向重复的缺失只发生过两次。松科内至少有两属不具反向重复区, 此外就是在豆科的几个亚族内也发现这种情况<sup>[40,42]</sup>。豆科植物的三个亚科的大部分成员都具有反向重复区。但是对取自山羊豆族 (Galegeae)、蚕豆族 (Vicieae)、鹰咀豆族 (Cicereae)、车轴草族 (Triglieae)、Carmichaelieae 族和岩黄芪族 (Hedysareae) 的植物进行分析后发现, 它们 cpDNA 的反向重复区均缺失<sup>[7]</sup>。此结果与经典的系统学研究结果相一致, 它们均属温带草本, 具有相同的形态学和细胞学特征。cpDNA 分子系统学的研究结果也有两处与经典分类学不一致。一是紫藤属 (*Wisteria*) 不具反向重复区, 应从鸡血藤族 (Milletieae) 分出放入山羊豆族; 二是百脉根族 (Loteae) 和小冠花豆族 (Coronilleae) 具有反向重复区, 不应把它们和温带分布的草本族放在一起。这两个观点也得到其它证据的支持。

(4) 茄科 (Solanaceae) 因有了对烟草 cpDNA 全序列的测定, 可以认为茄科植物的叶绿体基因组在分子水平上已经认识得相当清楚。利用 cpDNA 限制片段变异性探讨了番茄属 (*Lycopersicon*)、茄属 (*Solanum*) 和烟草属 (*Nicotiana*) 内的种间关系, 有关更高分类阶层间系统关系的研究也已展开<sup>[43,44]</sup>。传统的分类系统把烟草属和碧冬茄属 (*Petunia*) 放置在同一个族烟草族 (Nicotianeae) 内, 把番茄属放置在另一个不同的茄亚科 (Solanoideae) 内。几个核基因的序列数据和染色体数目也都支持这种处理方式<sup>[45]</sup>。rbcL 基因提供的一些数据却显示出烟草属和番茄属之间的关系比它们两者中任一属与碧冬茄属的关系更近。然而, 这个结果是非常初步的, 它是仅根据 rbcL 基因序列之间核苷酸差异的百分比得到的, 还需借助分支分析 (Cladistic analysis) 和更加精密的表型分析 (Phenetic analysis) 进一步研究。

(5) 禾本科 (Poaceae) 禾本科 (特别是谷类植物) 是利用 cpDNA 探讨种间关系研究得最多的科。对玉蜀黍属 (*Zea*) 四个种和三个亚种之间的分类关系、大麦属 (*Hordeum*) 37 个分类群或细胞型 (Cytotype) 之间的分类关系都根据 cpDNA 限制位点变异予以详细研究。研究羊茅族 (Festuceae) cpDNA 的变异性发现多花毒麦 (*Lolium multiflorum*) 同羊茅 (*Festuca pratensis*) 和竹叶羊茅 (*F. arundinaceae*) 有密切的亲缘关系, 超过了红羊茅 (*F. rubra*) 同后两者的密切程度<sup>[46]</sup>。由 cpDNA 限制性内切酶分析得出的小麦族 (Triticeae)、剪股颖族 (Ahrosteae)、虎尾草

族 (Chlorideae)、黍族 (Paniceae)、须芒草族 (Andropogoneae)、Maydeae 族和 水稻族 (Oryzaceae) 之间的系统关系与传统系统学的研究结果非常吻合<sup>[47]</sup>。禾本科也是 *rbcL* 基因序列被测定得最多的科。根据 *rbcL* 基因序列得到的表型图 (Phenogram) 与根据细胞核核糖体 RNA 序列建立的分支图 (Cladogram) 极为相符。两个结果都表明叶绿体基因的母亲遗传和细胞核基因的双亲遗传由于可能造成网状进化 (Reticulate evolution) 而影响系统发育建立的可能性很小<sup>[48,49]</sup>。分子系统学的研究结果还显示小麦 (*Triticum aestivum*) 同厚叶山羊草 (*Aegilops crassa*) 的关系比同乌拉图小麦 (*T. urartu*) 的关系更加紧密<sup>[50]</sup>。另外, 通过对禾本科 cpDNA 中倒位的分析来阐明禾本科进化上的主要分支的研究也正在进行<sup>[51,52]</sup>。

**高级分类阶层** 根据 DNA 序列数据、限制位点变异数据和重排可以探索科间和更高分类阶层上的系统关系问题。对单子叶植物、古老的水生植物、木兰亚纲 (Magnoliidae)、维管植物的早期演化、石竹亚纲 (Caryophyllidae)、石南科 (Ericaceae)、岩高兰科 (Empetraceae)、南石南科 (Epacridaceae) 及其相关类群、菊亚纲 (Asteridae) 及其主要谱系、虎耳草科 (Saxifragaceae)、牻牛儿苗科 (Geraniaceae) 和牻牛儿苗目 (Geraniales)、石竹目 (Caryophyllales)、姜目 (Zingiberales) 和含芥子油植物的系统发育都在分子水平上进行了研究。

以木兰亚纲 *rbcL* 基因序列的分支分析结果<sup>[53]</sup> 为例, 介绍叶绿体分子系统学在这方面的研究进展。*rbcL* 基因分支图中的各个分支基本上与现代分类系统所承认的木兰目 (Magnoliales)、樟目 (Laurales)、胡椒目 (Piperales)、睡莲目 (Nymphaeales) 和毛茛目 (Ranunculales) 五个主要谱系对应。除金鱼藻属 (*Ceratophyllum*) 外, 被子植物被分为两个分支: 具单沟花粉的植物; 真双子叶植物 (Eudicots), 即除八角目 (Illiciales) 外具三沟和三沟衍生型花粉的双子叶植物。木兰亚纲属并系类群, 在 *rbcL* 分支图中, 毛茛目同木兰亚纲的其余成员分离开来, 单独归入真双子叶植物分支。*rbcL* 基因序列不支持把睡莲目从木兰亚纲中分离出来成立一个单独的分类单元与木兰亚纲中的其余成员并列或与木兰亚纲中所有具单沟花粉的成员并列; 认为睡莲目属于木兰亚纲中具单沟花粉植物的一个主要谱系, 它同 Amborellaceae、Austrobaileyaceae、八角目的关系密切。它支持如下观点: 金鱼藻属是古老被子植物的子遗, 并早就同发展成现代大多数分类群的进化路线分离。*rbcL* 序列分析认为 Winteraceae 和 Canellaceae 这两个科具一定亲缘关系, 支持番荔枝科、单心木兰科 (Degeneriaceae)、Eupomatiaceae、Himantandraceae、木兰科和肉豆蔻科这个“核心”木兰目类群的存在, 并且认为 Winteraceae 不属其成员, 肉豆蔻科可能是木兰目中比较原始的而不是进化型成员。*rbcL* 基因分子系统学支持把鹅掌楸属放入木兰科内的观点。*rbcL* 分支图显示莲叶桐属和圆果属 (*Gyrocarpus*) 的关系密切, 不应提升为两个无关的莲叶桐科和圆果科 (Gyrocarpaceae), 并且认为这两个属与樟科的关系较远, 也不同意把它们归入樟科。*rbcL* 基因序列的分支分析表明马兜铃科、胡椒科、三白草科的关系密切, 同意 Takhtajan 和 Cronquist 系统的看法, Lactoridaceae 与胡椒目关系密切; 睡莲目同 Amborellaceae、Austrobaileyaceae、八角目联合在一起。*rbcL* 序列的分支分析结果发现八角目虽具三沟花粉却被放置在具单沟花粉的被子植物中; 支持八角目的三沟花粉与真双子叶植物的三沟花粉属于两种不同类型的观点, 这两种类型的三沟花粉按照两条各自独立的路线进化而来; Austrobaileyaceae 应放入八角目内。*rbcL* 分支图中金粟兰科与 Austrobaileyaceae、八角目、Amborellaceae、睡莲目联合在一起。其结果不同意

Cronquist 把清风藤科放入毛茛目, 这个科属于原始的真双子叶植物; 莲科也属原始的真双子叶植物, 与具单沟花粉的木兰类关系较远。

国际上叶绿体分子系统学在近年来已取得长足进步, 这门新兴的学科无疑将会对整个植物学产生越来越大的影响。然而我国在此领域的研究现状却同国外先进水平之间存在巨大差距, 这种状况亟待改变。鉴于我国在此领域的研究还只是处于起步阶段, 因此充分利用资源优势, 积极开展学科间合作就显得极为迫切。

### 参考文献

- 1 Ris H, Plaut W. Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol*, 1962, 13:383-391
- 2 Ciferri O (奥·西费利)等. 叶绿体分子遗传学. 长沙: 湖南科学出版社, 1987, 13-14
- 3 Palmer J D. Comparative organization of chloroplast genomes. *Ann Rev Genet*, 1985, 19:325-354
- 4 Ohyama K et al. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature*, 1986, 322:572-574
- 5 Shinozaki K et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J*, 1986, 5:2043-2049
- 6 Hiratsuka J et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet*, 1989, 217:185-194
- 7 Palmer J D et al. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*. 1988, 75:1180-1206
- 8 Shen G F et al. *Nicotiana* chloroplast genome. IV. *N. accuminata* has larger inverted repeats and genome size. *Mol Gen Genet*, 1982, 187:12-18
- 9 Van Ee J H et al. Mapping of genes on the chloroplast DNA of *Spirodela oligorhiza*. *Pl Mol Biol*, 1982, 1: 117-131
- 10 Corriveau J L et al. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Amer J Bot*, 1988, 75:1443-1458
- 11 Szmjdt A E et al. Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix*. *Pl Mol Biol*, 1987, 9:59-64
- 12 Bohnert H J et al. Chloroplast genome organization and RNA synthesis. *Encycl Plant Physiol*, 1982, 14B:475-530
- 13 Crouse E J et al. Chloroplast and cyanobacterial genomes, genes and RNAs: a compilation. *Pl Mol Biol*, 1985, 3:43-89
- 14 Chu N M et al. Arrangement of the ribosomal RNA genes in chloroplast DNA of Leguminosae. *Mol Gen Genet*, 1982, 186:23-32
- 15 Palmer J D et al. Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat is lost. *Cell*, 1982, 29:537-550
- 16 Palmer J D et al. Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 1983, 65:181-189
- 17 Palmer J D et al. Structure and sequence evolution of three legume chloroplast DNAs. *Mol Gen Genet*, 1983, 190:13-19
- 18 Zurawski G et al. The nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. *Genetics*, 1984, 106:735-749
- 19 Curtis S E et al. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Mol Biol Evol*, 1984, 1:291-301
- 20 Palmer J D et al. Chloroplast DNA variation and evolution in *Pisum*: Patterns of change and phylogenetic analysis. *Genetics*, 1985, 109:195-213



- 21 Salts Y et al. Physical mapping of plastid DNA variation among eleven *Nicotiana* species. *Theor Appl Genet*, 1984, 69:1-14
- 22 Atchison B A et al. Comparison of chloroplast DNAs by specific fragmentation with EcoRI endonuclease. *Mol Gen Genet*, 1976, 148:263-269
- 23 Vedel F et al. Specific cleavage of chloroplast DNA from higher plants by EcoRI restriction nuclease. *Nature*, 1976, 263:440-441
- 24 Doebley J et al. Restriction site variation in the zea chloroplast genome. *Genetics*, 1987, 117:139-147
- 25 Systama K J et al. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Clarkia* sect. *Peripetasma* (Onagraceae). *Evolution*, 1986, 40:1248-1261
- 26 Perl-Treves R et al. The *Cucumis* plastome: physical map, intrageneric variation and phylogenetic relationships. *Theor Appl Genet*, 1985, 71:417-429
- 27 Wagner D B et al. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84:2097-2100
- 28 Banks J A et al. Chloroplast DNA diversity is low in a wild plant, *Lupinus texensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82:6950-6954
- 29 Palmer J D. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Amer Naturalist*, 1987, 130:S6-S29
- 30 Systama K J et al. Chloroplast DNA evidence for the origin of the genus *Heterogaura* from a species of *Clarkia* (Onagraceae). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83:5554-5557
- 31 Coates D et al. Chloroplast DNA variability among *Linum* species. *Amer J Bot*, 1987, 74:260-268
- 32 Crawford D J et al. Chloroplast DNA restriction site variation and the phylogeny of *Coreopsis* section *Coreopsis* (Asteraceae). *Amer J Bot*, 1990, 77:552-584
- 33 Doebley J et al. Chloroplast DNA variation and the phylogeny of *Hordeum* (Poaceae). *Amer J Bot*, 1992, 79:576-584
- 34 Schilling E E et al. Restriction fragment analysis of chloroplast DNA and the systematics of *Viguiera* and related genera (Asteraceae:Heliantheae). *Amer J Bot*, 1989, 76:1769-1778
- 35 Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia Univ. Press, 1981
- 36 Thorne R. Proposed new realignments in the angiosperms. *Nordic J Bot*, 1983, 3:85-117
- 37 Bremer K. Tribal interrelationships of the Asteraceae. *Cladistics*, 1987, 3:210-253
- 38 Jansen R K et al. Chloroplast DNA from *Lactuca* and *Barnadesia* (Asteraceae): Structure gene localization and characterization of a large inversion. *Curr Genet*, 1987, 11:553-564
- 39 Jansen R K et al. Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site variation in the Mutisieae (Asteraceae). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:5818-5822
- 40 Palmer J D et al. Chloroplast DNA evolution among legumes: loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Curr Genet*, 1987, 11:275-286
- 41 Bruneau A et al. A chloroplast DNA inversion as a subtribal character in the tribe Phaseoleae (Leguminosae: Pailionoideae). *Amer J Bot*, 1988, 75:162
- 42 Strauss S H et al. Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:3893-3902
- 43 Palmer J D et al. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79:5006-5010
- 44 Hosaka K. Who is the mother of the potato?— Restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA of cultivated potatoes. *Theor Appl Genet*, 1986, 72:606-618
- 45 Pichersky E et al. Evidence for selection as a mechanism in the concerted evolution of *Lycopersicon esculentum*

- (tomato) genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:3880-3884
- 46 Lehtvaslaihio H et al. Chloroplast DNA variation in the grass tribe Festuceae. Theor Appl Genet, 1987, 74: 298-302
- 47 Enomoto S et al. Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA. I. Phylogenetic relationships among ten cereals revealed by the restriction fragment patterns of chloroplast DNA. Jap J Genet, 1985, 60:411-424
- 48 Watson L et al. The classification of Poaceae: subfamilies and supertribes. Austral J Bot, 1985, 33:433-484
- 49 Hamby R K et al. Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family (Poaceae). Plant Syst Evol, 1988, 160:27-37
- 50 Kerby K et al. The phylogeny of polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). Genome, 1987, 29:722-737
- 51 Quigley F et al. Organization and sequence of five tRNA gene and of an unidentified reading frame in the wheat chloroplasts genome: evidence for gene rearrangements during the evolution of chloroplast genomes. Curr Genet, 1985, 9:495-503
- 52 Hirai A et al. Rice chloroplast DNA: a physical map and the location of the genes for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and the 32 KD photosystem II reaction center protein. Theor Appl Genet, 1985, 70:117-122
- 53 Qiu Y L et al. Molecular phylogenetics of the Magnoliidae: cladistic analyses of nucleotide sequences of the plastid gene *rbcl*. Ann Missouri Bot Gard, 1993, 80:587-606