

红树科 6 属 cpDNA 和 nrDNA 序列相对速率 检验及分歧时间估计

钟扬^{①*} 施苏华^{②*} 唐先华^① 黄椰林^② 谈凤笑^② 张晓艳^{①③}

(^①中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074; ^②中山大学生命科学学院, 广州 510275; ^③Plant Breeding and Genetics Program, Michigan State University, MI 48824, USA. *联系人, Email: aquatic@rose.whiob.ac.cn)

摘要 基于红树科 6 属 10 种及外类群的 cpDNA *matK* 基因和 *rbcL* 基因序列以及 nrDNA ITS 区序列, 分别构建了分子系统发育树. 对不同系统发育树中有关分支间的核苷酸序列置换速率进行了差异显著性检验. 根据相对速率检验结果, 结合现有分子进化资料, 推算这些属间的首次分歧时间为 132.25 Ma 前, 分布于内陆的竹节树族(除竹节树外)与分布于海岸的红树族间的平均分歧时间为 64.13 Ma 前, 而陆生的大叶竹节树和旁杞木间的平均分歧时间为 19.92 Ma 前.

关键词 红树科 cpDNA nrDNA *matK* *rbcL* ITS 相对速率检验 分歧时间

红树科(Rhizophoraceae)约有 16~18 属 120 余种, 分布于热带、亚热带海岸和内陆^[1, 2], 其中我国产 6 属(含作为红树林主要成分的红树族 Rhizophoreae 4 属及陆生的竹节树族 Legnotideae 2 属), 共 13 种 1 变种^[3]. 由于其生境及与之相适应的形态结构上的特殊性, 红树科植物一直是生态学和众多相关学科研究中的一个典型类群. 然而, 长期以来在该科植物的系统发育关系与进化形式方面存在颇多争议.

目前, 叶绿体 DNA(cpDNA) *matK* 基因和 *rbcL* 基因序列以及核糖体 DNA(nrDNA) ITS 区序列已作为重要的分子性状被广泛用于不同分类阶元上的植物分子进化与系统学研究, 其核苷酸置换速率及物种分歧时间的估计对研究特定类群的起源与演化亦具有重要意义^[4~6]. 最近, 我们^{[7, 1)}测定了国产红树科若干种的 *matK* 基因和 ITS 区序列, 并初步进行了分子系统发育分析. 本文进一步选取中国红树科所有 6 属的代表种, 分别构建了 *matK*, *rbcL* 和 ITS 系统发育树. 在此基础上, 进行了系统发育树分支间的相对速率检验, 进而结合现有分子进化资料, 推算出相对速率衡定的分支间的分歧时间.

1 材料与方法

红树科 6 属 10 种代表植物与外类群的名称、缩写、凭证标本号、采集地以及 GenBank 序列收录号, 见表 1.

应用 CLUSTAL X 软件对各序列集分别进行排序^[8]; 应用 PAUP 3. 1. 1 软件包构建系统发育树^[9], 其中序列数据自展 100 次, 选取 50%多数一致树^[10]; 应用 Kimura 两参数模型和 MEGA 1. 03 软件包计算序列分歧度 K ^[11, 12]; 应用 Li 等人^[13]提出的相对速率检验方法, 检验各系统发育树有关分支间核苷酸置换速率的差异显著性; 分歧时间用 $K/(2r)$ 估计, 其中 r 为序列在特定类群中的平均置换速率.

1) Shi S, Zhong Y, Huang Y, et al. Phylogenetic relationships of the Rhizophoraceae in China based on sequences of the chloroplast gene *matK* and ITS regions of nuclear ribosomal DNA and combined data set. J Mol Evol, 2000 (待发表)

表 1 红树科和外类群的 cpDNA 序列^{a)}

种名	缩写	凭证标本号	采集地	GenBank 收录号		
				matK ^{b)}	ITS ^{b)}	rbcL ^{c)}
木榄 <i>Bruguiera gymnorhiza</i>	BG	Shi044/Qiu974305	深圳福田自然保护区	AF105088	AF105084	AF006754
竹节树 <i>Carallia brachiata</i>	CB	Shi045/Shi9704115	广东黑石顶自然保护区	AF105086	AF105080	AF127371 ^{b)}
大叶竹节树 <i>Carallia garciniaefolia</i>	CG	H98121202/98121201	云南西双版纳植物园	AF126370	AF126368	AF127373 ^{b)}
旁杞木 <i>Carallia pectinifolia</i>	CP	Shi057/Shi9704112	广东黑石顶自然保护区	AF105087	AF105079	AF127372 ^{b)}
角果木 <i>Ceriops tagal</i>	CT	Zhang9711902	海南东寨港自然保护区	AF105089	AF105083	AF006756
秋茄 <i>Kandelia candel</i>	KC	Shi046/Qiu974303	深圳福田自然保护区	AF105090	AF105081	AF006755
山红树 <i>Pellacalyx yunnanensis</i>	PY	H98121203/98121204	云南西双版纳植物园	AF126371	AF126369	-
红海榄 <i>Rhizophora stylosa</i>	RS	Qiu974306	深圳福田自然保护区	AF105092	AF105082	-
<i>Rhizophora mangle</i>	RM	-	-	-	-	U26335
<i>Pellacalyx saccardians</i>	PS	-	-	-	-	AF006758
壳菜果 <i>Mytilaria laosensis</i> ^{d)}	ML	Shi9703054	中国科学院华南植物园	AF128828	AF127501	AF062001
桃金娘 <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> ^{d)}	RT	Shi9704113	广东黑石顶自然保护区	AF105093	AF105085	-
<i>Myrcianthes fragrans</i> ^{d)}	MF	-	-	-	-	U26328

a) 排序后的 matK 序列长度 1 159 bp, ITS 序列长度 690 bp, rbcL 序列长度 1 335 bp; b) 自测序列; c) 下载自 GenBank;

d) 外类群

2 结果与分析

2.1 matK, ITS 和 rbcL 系统发育树

基于 matK, ITS 和 rbcL 序列构建的红树科系统发育树见图 1. 3 个系统发育树的分支形式存在较大差别, 而一致部分为: (1) 所有 6 属的代表种组成单系类群; (2) 竹节树属的两个种 (大叶竹节树 *Carallia garciniaefolia* 和旁杞木 *C. pectinifolia*) 在 3 个树中均构成姐妹群, 但与另一个种 (竹节树 *C. brachiata*) 组成并系类群.

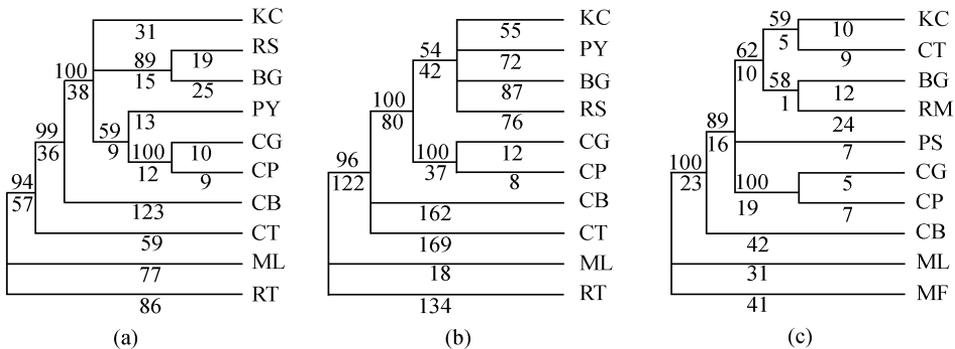


图 1 红树科 6 属的 matK(a)、ITS(b)和 rbcL(c)系统发育树

分类群缩写见表 1. 树枝上端数值为自展数据支持率(%), 下端数值为枝长. matK 树: 树长=619, CI=0. 845, HI=0. 155, RI=0. 664, RC=0. 561; ITS 树: 树长=1 237, CI=0. 736, HI=0. 264, RI=0. 410, RC=0. 302; rbcL 树: 树长=262, CI=0. 821, HI=0. 179, RI=0. 638, RC=0. 524

2.2 相对速率检验

对各系统发育树中分支间的总核苷酸置换速率进行差异显著性检验, 结果见表 2. 从表中可以发现: (1) 3 种序列在 CG-CP 分支间均能通过相对速率检验, 即速率都是衡定的; (2) matK 和 rbcL 序列在竹节树族 (除竹节树外) 与红树族主要代表种构成的分支间通过了相对速率检验, ITS 序列则不能通过; (3) 只有 rbcL 树中首次分歧事件产生的分支间能通过相对速率检验, matK 和 ITS 序列均不能通过. 对不同外类群 (参照类群), 上述结果是一致的.

表2 红树科 cpDNA 和 nrDNA 序列的相对速率检验

序列	分支 1	分支 2	参数类群	比较位点(n)	$\Delta K \pm SE^a)$
matK	CT	(KC,RS,GB,PY,CG,CP,CB)	RT	666	-0.027 0±0.017 4*
	CT	(CG,RS,BG,PY,CG,CP,CB)	ML	658	-0.018 4±0.009 6*
	CB	(CG,CP)	RT	952	0.071 1±0.017 6**
	CB	(CG,CP)	ML	956	0.074 6±0.017 9**
	KC	(PY,CG,CP)	RT	949	0.013 0±0.010 8
	KC	(PY,CG,CP)	ML	969	0.012 0±0.010 7
	(RS,BG)	(PY,CG,CP)	RT	954	0.009 5±0.036 5
	(RS,BG)	(PY,CG,CP)	ML	941	0.003 0±0.037 9
	CG	CP	RT	1 048	-0.002 3±0.003 7
	CG	CP	ML	1 042	-0.002 2±0.003 6
ITS	CT	(KC,PY,BG,RS,CG,CP)	RT	518	0.071 6±0.028 9***
	CT	(KC,PY,BG,RS,CG,CP)	ML	517	0.066 7±0.033 6*
	CB	(CG,CP)	RT	596	0.073 1±0.038 2*
	CB	(CG,CP)	ML	601	0.061 8±0.046 3*
	CG	CP	RT	618	-0.002 9±0.009 6
	CG	CP	ML	613	-0.011 0±0.010 9
rbcL	CB	(KC,CT,BG,RM,PS,CG,CP)	MF	1 135	0.004 9±0.006 5
	CB	(KC,CT,BG,RM,PS,CG,CP)	ML	1 135	0.004 4±0.006 5
	CB	(CG,CP)	MF	1 210	0.000 9±0.006 8
	CB	(CG,CP)	ML	1 210	0.004 4±0.006 8
	(CG,CP)	(KC,CT,BG,RM)	MF	1 141	0.008 4±0.038 0
	(CG,CP)	(KC,CT,BG,RM)	ML	1 141	0.001 7±0.038 3
	PS	(KC,CT,BG,RM)	MF	1 229	-0.003 1±0.030 6
	PS	(KC,CT,BG,RM)	ML	1 229	-0.006 6±0.030 8
	CG	CP	MF	1 219	0.001 0±0.003 1
	CG	CP	ML	1 219	0.001 0±0.003 1

a) t 检验, *: p < 5%, **: p < 0.1%, ***: p < 1%

2.3 分歧时间估计

根据分子钟假设, 可以通过序列间的分歧度及序列的平均置换速率来估计速率恒定分支间的分歧时间. 在高等植物中, cpDNA *matK* 基因和 *rbcL* 基因序列的平均置换速率分别为 4×10^{-10} (每年每位点碱基数) 与 2×10^{-10} [14,15], nrDNA ITS 序列的平均置换速率为 4.5×10^{-10} [16]. 尽管这些速率在不同类群间可能存在一定变化范围, 但因其相对稳定而被不少类群的研究工作采用[14~16]. 据此, 我们用上述 3 种序列分别估计了通过相对速率检验的分支间的分歧时间, 然后获得平均分歧时间(表3). 结果表明, 红树科 6 属间的首次分歧时间为 132.25 Ma 前, 分布于内陆的竹节树族(除竹节树外)与分布于海岸的红树族间的平均分歧时间为 64.13 Ma 前, 而陆生的大叶竹节树和旁杞木最后的平均分歧时间为 19.92 Ma 前.

表3 红树科若干分支间的分歧时间 (单位: Ma)

分支	<i>matK</i>		ITS		<i>rbcL</i>		平均分歧时间
	K	T	K	T	K	T	
首次分歧	-	-	-	-	0.052 9 ^{b)}	132.25	132.25
竹节树族-红树族	0.046 8 ^{b)}	58.50	-	-	0.027 9 ^{c)}	69.75	64.13
CG-CP	0.008 2	10.25	0.022 3	24.77	0.009 9	24.75	19.92

a) CB-(KC,CT,BG,RM,PS,CG,CP)的估计值

b) KC-(PY,CG,CP)估计值与(RS,BG)-(PY,CG,CP)估计值的平均值

c) PS-(KC, CT, BG, RM)估计值与(CG,CP)-(KC,CT,BG,RM)估计值的平均值

3 讨论

利用多种分子序列来估计类群间的分歧时间,有助于减少单一基因的估计所产生的统计误差^[17]。然而,不同序列通常适用于不同的分类阶元。例如,ITS 序列一般用于植物种间和部分属间的分子系统学研究。本研究的结果表明,即使在同一属(*Carallia*)的 3 个种间,*matK* 和 ITS 序列的置换速率也存在着显著差异。在这种情形下,不能用已知的平均速率来估计它们之间的分歧时间。换言之,欲利用序列间的分歧度及平均置换速率来估计分歧时间,相对速率检验是一个不可缺少的步骤。

最早发现的红树科植物化石在美国东部上白垩纪西若曼尼期的 Raritan 植物群中,约为 91~95 Ma 前^[18]。Muller 等人^[19]根据化石资料估计,东南亚地区的红树科陆生种类(如竹节树属和 *Anisophylla* 属)应起源于始新世约 54 Ma 前。我们应用 cpDNA 和 nrDNA 序列推算红树科部分类群间的分歧时间,为研究该科起源与演化提供了新的途径。值得注意的是,在大部分已报道的研究中,利用分子数据估计的分歧时间一般早于化石资料估计,本文的结果也是如此。由于不同分子序列估计值间的差异较大,因而进一步的研究工作至少需要从两个方面深入,即获得并应用更多的分子资料来减少统计误差,以及尽可能多地利用化石记录和年代地层学数据来校正局部分子钟。

致谢 感谢日本文部省数理统计研究所所长谷川政美,美国 Michigan 州立大学桑涛、Colorado 州立大学文军,和中山大学金建华等博士提供宝贵的资料和建议。本工作为国家杰出青年基金(批准号:39825104)、国家自然科学基金(批准号:39570052, 39970057)和中国科学院留学回国择优支持基金资助项目。

参 考 文 献

- 1 Hou D. Rhizophoraceae. Flora of Malesiana, 1958, (5):429~493
- 2 van Vliet G J C M. Wood anatomy of the Rhizophoraceae. Leiden Bot Series, 1976, 3:20~75
- 3 高蕴璋. 中国植物志. 第 52 卷, 第 2 分册. 北京: 科学出版社, 1983. 125~143
- 4 Hilu K W, Liang H. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. Am J Bot, 1997, 84:830~839
- 5 Chase M W, Soltis D E, Olmstead R G, et al. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. Ann Missouri Bot Gard, 1993, 80:528~580
- 6 Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard, 1995, 82: 247~277
- 7 黄椰林, 邱小忠, 施苏华, 等. 中国主要红树科植物的分子系统发育. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1):39~42
- 8 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(24):4876~4882
- 9 Swofford D L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Champaign: Illinois Natural History Survey, 1993
- 10 钟 扬, 李 伟, 黄德世. 分支分类的理论与方法. 北京: 科学出版社, 1994
- 11 Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol, 1980, 16:111~120
- 12 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis. University Park: Pennsylvania State University, 1993
- 13 Li P, Bousquet J. Relative-rate test for nucleotide substitutions between two lineages. Mol Biol Evol, 1992, 9:1185~1189
- 14 Steele K P, Vilgalys R. Phylogenetic analyses of polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene *matK*. Syst Bot, 1994, 19:126~142
- 15 Albert V A, Backlund A, Bremer K, et al. Functional constraints and *rbcL* evidence for land plant phylogeny. Ann Missouri

Bot Gard, 1994, 81:534~567

16 Suh Y L, Thien B, Reeve H E, et al. Molecular evolution and phylogenetic implication of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. Amer J Bot, 1993, 80:1042~1055

17 Kumar S, Hedges S B. A molecular timescale for vertebrate evolution. Nature, 1998, 392: 917~920

18 王开发, 张玉兰, 王永元. 我国红树植物花粉形态研究及其在海洋地质勘探中的意义. 科学通报, 1975, 20(11): 518~524

19 Muller J, Caratini C. Pollen of *Rhizophora* (Rhizophoraceae) as a guide fossil. Pollen et Spores, 1977, 19: 361~389

(1999-04-21 收稿, 1999-10-10 收修改稿)