

## 分子生物学技术在蕨类植物研究中的应用

杜红红<sup>1,2</sup>, 刘红梅<sup>3</sup>, 石雷<sup>2</sup>, 戴绍军<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>东北林业大学生命科学学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>中国科学院植物研究所, 北京 100093; <sup>3</sup>北京大学深圳研究生院, 城市人居环境科学与技术重点实验室, 广东深圳 518055

### Application of Molecular Biology Techniques in Pteridophyte Researches

DU Hong-Hong<sup>1,2</sup>, LIU Hong-Mei<sup>3</sup>, SHI Lei<sup>2</sup>, DAI Shao-Jun<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Forestry Tree Genetics Improvement, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; <sup>2</sup>Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>3</sup>The Key Laboratory for Environmental and Urban Sciences, Shenzhen Graduate School, Peking University, Shenzhen, Guangdong 518055, China

**摘要:**近年来, 分子标记、基因克隆、RNA干扰和基因芯片等分子生物学技术已应用于蕨类植物的系统进化、遗传多样性、孢子萌发以及生理代谢分子机制的研究。本文介绍近年来分子生物学技术在蕨类植物研究中的应用进展。

**关键词:** 蕨类植物; 分子标记; 基因芯片; 分子系统学

蕨类植物是维管植物中一个较为特殊的类群, 其发达的孢子体和退化的配子体均能够独立生活。在对蕨类植物长期的研究过程中, 人们已从形态学、细胞学和生理学的角度认识了蕨类植物的类群划分、生长发育和生理代谢的特点。近年来, 随着分子生物学技术在种子植物中应用的不断完善和成熟, 人们也开始应用这方面的方法和技术探讨蕨类植物生长发育和代谢的分子机制(Sundaram等 2008; Schallau等 2008)。同工酶技术、分子标记技术和分子系统学研究方法的应用, 为深入分析蕨类植物系统进化、种群结构、遗传变异和亲缘关系提供了新的手段(王中仁 1996; 刘红梅等 2009)。同时, 人们还开始以水蕨(*Ceratopteris richardii*)等为模式植物, 采用基因克隆与转化、RNA干扰(或DNA干扰)或基因芯片等技术研究蕨类植物的孢子萌发、配子体发育以及生理代谢过程中对不同环境因子响应的分子调控机制(Banks 1999)。本文就近年来分子生物学技术在蕨类植物研究中的应用研究概况作一介绍。

#### 1 分析蕨类植物遗传多样性的分子标记技术

遗传多样性揭示了种群遗传变异规律和变异机制, 代表了物种对外部环境的适应能力。遗传多样性可以体现在从形态到DNA分子的各个水平上, 目前已经建立在不同水平上的遗传多样性检测方法主要包括: (1)等位酶分析(allozyme analysis)技术; (2)

以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)为基础的DNA分子标记技术, 如限制性内切酶酶切片长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增酶切片长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、随机扩增的多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)和单链构象多态性 PCR (single strand conformation polymorphism-PCR, SSCP-PCR)等; (3)以重复序列为基础的标记技术, 如卫星DNA (satellite DNA)、微卫星 DNA (microsatellite DNA, MS DNA)、简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)、表达序列标签-微卫星(expressed sequence tag-SSR, EST-SSR)和间隔简单重复序列(inter-simple sequence repeats, ISSR)技术等。近年来, 这些研究手段开始逐渐用于蕨类植物遗传多样性的研究, 为全面准确地反映蕨类植物的遗传多样性、群体遗传结构和亲缘关系以及保护和利用蕨类植物提供了有价值的遗传学信息。

**1.1 等位酶分析技术** 等位基因酶(allozyme)是指同一基因位点上等位基因所编码的同种酶的不同分子

收稿 2008-12-08 修定 2009-04-15

资助 教育部新世纪优秀人才支持计划(NECT-06-0327)和国家高技术研究发展计划(“863”计划) (2007AA021405)。

\* 通讯作者(E-mail: daishaojun@hotmail.com; Tel: 0451-82192237)。

形式。与DNA标记技术相比,虽然等位酶标记有信息量少、不能直接检测DNA水平上的遗传变异以及所需新鲜样品量较大等缺点,但是在蕨类植物遗传多样性的早期研究中曾被广泛应用。利用等位酶分析技术,潘丽芹等(2005)在三峡库区特有的荷叶铁线蕨(*Adiantum reniforme* var. *sinense*)中检测到了酯酶(EST)、酸性磷酸酶(ACP)、苹果酸脱氢酶(MDH)、超氧化物歧化酶(SOD)和甲酸脱氢酶(FDH)共5个酶系统的14个酶位点,并根据对等位基因平均数、多态位点百分率、期望杂合度和遗传变异等分析,发现荷叶铁线蕨居群内和居群间的遗传分化均较低。此外,陈媛媛等(2003)在用7种酶系统分析中华水韭(*Isoetes sinensis*)的遗传变异时,共检测出16个位点27个等位基因,其中12个位点表现出多态性,据此认为中华水韭的遗传多样性较低。

**1.2 AFLP技术** Kang等(2005)应用AFLP技术研究了中华水韭现存7个居群的群体遗传结构和遗传分化,用8对引物扩增出的343个条带中有210条表现出多态性(占61.2%),基因分化系数为0.535,不仅表现出高度的群体内遗传多样性,而且群体间也有较高的遗传变异,他们推测这种情况很可能是由于日益缩小的种群规模引起的遗传漂变造成。此外,Nakazato等(2006)将AFLP与RFLP技术结合使用构建了水蕨基因组结构的遗传图谱,初步获得了基因拷贝数以及这些拷贝在基因组中的分布特点。

**1.3 RAPD技术与SSCP-PCR技术** 陈进明等(2004)采用RAPD方法对中华水韭的居群研究显示,所选居群总的多态位点百分率为58.06%,居群间基因分化系数为0.589,即遗传变异中有相当一部分来源于居群间,因此作者认为日益缩小的种群规模而导致的居群内近交和遗传漂变的发生以及居群间有限的基因交流可能是造成中华水韭目前遗传结构的主要成因。Wang等(2004)和Su等(2004)则将RAPD技术与叶绿体*atpB-rbcL* IGS序列分析相结合,探讨了我国华南地区孑遗蕨类植物刺桫欏(*Alsophila spinulosa*)种群的遗传多样性。另外,Noumi等(1984)在F1-ATPase基因的研究中发现,相同长度的DNA小片段,即使仅有一个碱基的差异,经聚丙烯酰胺凝胶电泳后也能明显地被分开,这种由碱基差异引起的DNA片段迁移率不同的现象称为单链构象多态性(single-strand conformation

polymorphism, SSCP)。Ishikawa等(2002)利用此技术对*Dryopteris caudipinna*的*pgiC*基因进行了分析,结果表明*D. caudipinna*两个居群的平均期望杂合度( $H_E$ )分别为0.61和0.39,具有较高的群体杂合度和遗传分化。

**1.4 EST-SSR技术和ISSR技术** Woodhead等(2003, 2005)运用EST-SSR技术对*Athyrium distentifolium*进行了遗传多样性研究。他们从1152个植物体的cDNA克隆中得到165个微卫星,在74个微卫星上设计出引物,随后在6个群体的186个个体中检测到10个SSR的位点,每个位点有2~7个等位基因,统计结果显示,平均期望杂合度的变化范围在0.027~0.809之间,扩增条带表现出丰富的多态性,由此表明EST-SSR技术适合于蕨类植物遗传多样性的研究。Korpelainen等(2005)借助ISSR指纹识别技术分析铁线蕨属(*Adiantum*)的毛叶铁线蕨(*A. hispidulum*)、楔叶铁线蕨(*A. raddianum*)、*A. incisum*和*A. zollingeri*等4个种的遗传变异,发现铁线蕨属表现出丰富的遗传变异,而且71.1%的变异发生在居群内,18.5%的变异发生在种间,10.4%的变异发生在同一物种的不同居群间且遗传分化系数较低(0.089~0.179)。此外,Dong等(2007)利用ISSR分子标记技术研究粗梗水蕨(*C. pteridoides*)的遗传多样性时,13组引物共扩增出125个条带,多态位点(PPB)占44.8%,群体间遗传分化系数为0.297,反映出这种濒危水生蕨类的遗传多样性和群体间遗传分化程度均较低。

## 2 蕨类植物基因表达与功能分析

**2.1 蕨类突变体的获得** 研究和分析突变体形态与代谢特征是解析基因功能的主要手段之一。真蕨类植物配子体能够通过自体受精,形成每个位点均纯合的纯合子,容易分离和获得突变体,同时可以根据基因突变后配子体的形态特征鉴别显性与隐性突变基因的表达,便于进行分子生物学和遗传学研究。水蕨(*C. richardii*)是一种优良的模式植物,其生活史短,孢子萌发后10~12d就能发育成性成熟的配子体并产生精子器和颈卵器,受精卵经3个月就可发育为能产生孢子的孢子体(Banks 1997)。获得水蕨突变体的主要方法是用X-射线或甲基磺酸乙酯(EMS)处理孢子,处理后2周M<sub>1</sub>代的配子体就可以发育成熟,并且表现出与野生型不同的发育和代谢特征。迄今已经获得10余种蕨类突变体,主

要包括以下几种类型: (1)孢子萌发相关突变体。如暗萌发突变体的孢子可以在全黑暗条件下正常萌发,而不同于野生型孢子需要红光诱导才能萌发,而且暗萌发突变体的配子体与野生型也有明显差异(Kamachi等2004)。(2)光形态建成相关突变体。野生型配子体在红光的照射下,叶绿体会朝着红光光源的方向移动,但*phy3*突变体的叶绿体在红光下缺少这种反应(Tsuboi等2006)。另外,铁线蕨(*A. capillus-veneris*)中缺少叶绿体避光反应的*phot1*和*phot2*突变体(Wada 2007)。(3)性别分化相关突变体。在水蕨中已经获得多种单突变体或多突变体,其中具有代表性的包括,① *her* 突变体:配子体对成精子囊素(antheridiogen)不敏感,在成精子囊素存在条件下发育成雌雄同体的配子体(Kamachi等2007);② *tra* 突变体:在没有成精子囊素存在条件下,仍然会发育成雄性配子体;③ *fem*突变体:配子体发育成雌性配子体的突变体;④ *man* 突变体:在成精子囊素存在时发育成雄性配子体,无成精子囊素存在时发育成雌雄同体配子体,但配子体上能产生高于正常情况10倍或更多的精子器(Banks 1999)。(4)响应环境胁迫的突变体。如抗盐和抗除草剂的突变体,这些突变体的配子体对NaCl和草甘膦具有很强的抗性(Calica 2005)。

## 2.2 分析基因功能的RNA干扰和DNA干扰技术

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是真核生物体内的一种基因调控机制。人们采用真核生物的这一特征设计并构建了可转录为dsRNA的表达载体(RNAi载体),用于抑制真核生物体内特定基因的表达,然后通过获得表达构建序列的转基因植株(遗传稳定的突变体)分析目的基因的功能。与之相似,DNA干扰(DNAi)是真核生物体内由双链DNA(double stranded DNA, dsDNA)介导体内同源序列降解的现象,人们据此发展了DNAi技术。相对于RNAi技术,DNAi省去了构建dsRNA表达载体的步骤,因此更为方便和简单,而且可以高通量且有效地抑制目的基因表达(Kawai-Toyooka等2004)。人们最初分别利用DNAi和RNAi技术,成功地抑制了水蕨幼配子体发育过程中与叶绿素合成和叶绿体发育相关的同源基因*CrChl1*、*CrFtsZ*和*CrUrod*以及*CrCaM1*、*CrCPK1*和*CrPRO1*基因的表达(Stout等2003; Rutherford等2004),从而证明了这两种技术手段在研究蕨类配子体发育过程中的有效性,并且

明确了这些基因在配子体中的功能。进而,Kawai-Toyooka等(2004)用DNAi技术证明了铁线蕨配子体的*AcPHOT2*(叶绿体避光反应相关基因)参与叶绿体避光反应的移动过程,而*AcPHY3*基因(红光介导的光受体趋光性同源基因)参与萌发不久的丝状体细胞红光趋光性过程。van der Weele等(2007)也利用RNAi技术证明了*Mv-mago*基因参与苹科植物*Marsilea vestita*精子发生的细胞分裂过程。

## 2.3 分析孢子萌发相关基因表达的基因芯片等技术

蕨类的孢子萌发是一个受到多个基因精细调控的细胞学过程。孢子在光照(或激素和植物生长调节物质)条件下打破休眠状态启动萌发,先以重力作用建立极性,进行一次不对称的细胞分裂并萌发出假根和丝状体原始细胞,后者继续分裂形成配子体(Roux等2003)。Salmi等(2005)用cDNA微阵列技术分析了水蕨孢子萌发过程中不同时间点mRNA表达丰度的变化,发现孢子萌发最初24 h转录本的表达丰度没有明显变化,萌发48 h时有900多个mRNA(占初始转录本的29%)的表达丰度明显改变,这表明孢子在进行了第一次细胞分裂后由静止状态迅速转为活跃的代谢状态。同时,作者通过对水蕨孢子EST的分析显示,参与孢子萌发过程的基因可能超过14 000个,其中3 500多个基因序列与拟南芥具有高度相似性。在此基础上,Salmi等(2007)利用cDNA芯片和实时定量PCR技术,证明了水蕨孢子萌发过程中3个参与信号转导和胁迫反应的基因受到外源伟哥(viagra)的影响,由此证明NO/cGMP信号途径参与了重力指导的孢子极性建立过程。此外,人们已用分子生物学技术分析了部分参与光调控孢子萌发基因的功能,如红光对孢子萌发的促进作用是通过光敏色素蛋白基因家族*PHY1*、*PHY2*和*PHY4*的调控来完成,而且已经在铁线蕨孢子中克隆出这些基因(Wada 2007)。铁线蕨孢子细胞核的移动在红光、蓝光和黑暗条件下分别受到*neol1*、*phot2*与*phot1*等不同基因的调控(Tsuboi等2007)。Imaizumi等(2000)从铁线蕨中分离出蓝光受体基因家族中的5个基因(*CRY1-5*),并证明*CRY3*和*CRY4*基因有调节蓝光抑制孢子萌发的作用,同时也找到了部分孢子萌发特异表达基因的同源基因并推测了这些基因的功能,如认为*PgiC*基因编码的蛋白质与葡萄糖磷酸酶具有较高的同源性; Stout等(2003)的研究则证明*CrCaM1*、

*CrCPK1* 和 *CrPRO1* 基因编码的蛋白产物与钙离子信号通道有关。

**2.4 性别分化相关基因的功能分析** 多数孢子同型的真蕨类植物其性别分化受激素、接种密度和营养条件等环境因素的影响。成精子囊素和赤霉素在蕨类植物性别分化过程中起着关键作用, 此类激素存在时, 配子体即发育成雄配子体; 若缺少此类激素, 配子体发育成两性或雌配子体。而且, 当除去已发育成雄配子体的环境中的这两类激素, 雄配子体上尚未发生性别分化的细胞就会发生逆转, 从而导致雄配子体发育为雌雄同体的两性配子体 (Banks 1999)。在自然条件下, 孢子萌发后生长发育较快的配子体形成雌配子体或两性配子体, 这些配子体向环境中分泌激素, 以致生长较慢的配子体形成雄配子体。此外, 高密度、弱光照和饥饿条件均更有利于配子体精子器的形成 (Banks 1999; Huang 等 2004)。近年来, 人们已经克隆到了受激素影响的性别决定基因 *FEM* 和 *TRA*, 其中 *FEM* 促进雄配子体形成, 而 *TRA* 则促进雌配子体形成, 而且这 2 个基因的表达相互抑制, 同一配子体中也只表达其中一类基因。成精子囊素可以激活 *HER* 基因, 从而抑制 *TRA* 基因, 使 *FEM* 基因得以表达, 由此产生雄配子体, 反之则产生雌配子体 (Banks 1999; Eberle 和 Banks 1996)。此外, Wen 等 (1999) 用消减杂交 (subtractive hybridization) 技术从水蕨配子体中分离出 *ANII* 基因, 并通过突变体分析发现 *ANII* 基因往往瞬时表达并通过与 *TRA5* 表达相互抑制参与性别决定。

**2.5 应答环境胁迫基因的功能分析** 近年来, 人们利用基因克隆与转化等分子生物学技术分析了以蜈蚣草 (*Pteris vittata*) 为代表的凤尾蕨科以及蕨科植物对金属 (如 As、Cd 和 Ni) 超富集或耐受能力的分子机理 (Ma 等 2001), 并克隆和表征了其中一些关键的功能基因, 如蜈蚣草中的谷氧还蛋白基因 (*PvGrx5*)、砷酸盐还原酶基因 (*PvACR2*)、磷酸丙糖异构酶 (TPI) 的同源基因 (*PV4-8*) 和植络素合成酶基因 (*PvPCSI*) 等, 通过在拟南芥和大肠杆菌中将这些基因敲除或超量表达分析表明, 它们参与了生物体抗砷过程中氧化还原等关键事件的调控 (Dong 等 2005; Duan 等 2005; Ellis 等 2006; Rathinasabapathi 等 2006; Sundaram 等 2008)。此外, 满江红 (*Azolla filiculoides*) 中的金属硫蛋白基因 (*AzMT2*) 参与了植

物体对  $Cd^{2+}$  和  $Ni^{2+}$  等重金属离子解毒的代谢过程 (Schor-Fumbarov 等 2005)。

### 3 蕨类植物起源与进化研究中的分子生物学技术

蕨类植物是一个非常古老的类群, 其起源可以追溯到 4 亿多年前。研究者们根据化石标本和现存植物的形态比较以及地理分布等特征, 建立了蕨类植物的起源和系统发生关系。自上世纪 90 年代, 随着分子生物学的兴起, 在 DNA 分子水平上重建蕨类植物系统进化关系逐渐成为蕨类研究中的热点。蕨类分子系统学研究常用的分子标记主要来自叶绿体基因组, 如 *rbcL* 基因、*atpB* 基因、*rps4* 和 *rps4-trnS* 基因间隔区 (intergenic spacer region, IGS) 以及 *trnL-F* 基因间隔区 (刘红梅等 2009)。*rbcL* 基因编码 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 氧化酶大亚基, 位于植物叶绿体 DNA 的大单拷贝区, 长约 1 400 bp, 该基因进化速率相对较慢, 主要用于研究蕨类植物科和目甚至整个蕨类类群的系统进化关系。*atpB* 基因编码叶绿体 ATP 合成酶的  $\beta$  亚基, 该基因进化速率慢, 序列保守但能提供足够的系统发育信息, 多用于蕨类植物目、科和属水平上的系统发育重建。*rps4* 基因长约 600 bp, 该基因多与 *rps4-trnS* IGS 联合用于系统发育分析。*trnL-F* 基因间隔区是编码转运 RNA (tRNA) 的 *trnL* 基因与 *trnF* 基因之间的一段基因间隔区, 长 160~440 bp, 一般用于科内属间或者属下的系统学研究 (刘红梅等 2009)。利用这些基因序列进行的分子系统学研究为验证传统分类系统科属分类关系的合理性提供了证据, 并且对划分外部形态相似却难以依据经典分类方法区分的类群亦有很大帮助。

**3.1 维管植物各类群的重新界定** 传统分类观点认为, 从蕨类植物开始具有维管束组织, 据此将其与种子植物合称为维管束植物, 并将其分为松叶蕨类 (Psilophytina)、石松类 (Lycophytina)、木贼类 (Sphenophytina)、水韭类 (Isoephytina) 和真蕨类 (Filicophytina) 5 个类群。Pryer 等 (2001) 通过对 35 种代表性陆生植物的形态性状与 4 个基因序列 (*atpB*、*rbcL*、*rps4* 和 18S rDNA) 的分析, 重新界定了维管植物各个类群之间的关系, 现存维管植物分为 3 个单系类群: (1) 石松类、(2) 种子植物和 (3) 木贼类、松叶蕨类和真蕨类 (薄囊蕨类和厚囊蕨类), 其中石松类是维管植物的最早分支, 木贼类和真蕨类与种子植物的亲缘关系最近。Pryer 等

(2001)的研究也推翻了传统认为蕨类植物为一自然单系类群的观点。

**3.2 早期薄囊蕨类之间的系统发育关系** 不同学者综合 *atp1*、*atpB*、*rbcL*、*rps4*、18S rDNA 和核 SSU rDNA 基因序列,重建了早期薄囊蕨类的系统演化关系(Pryer 等 2004; Wikström 和 Pryer 2005)。这些分子系统学研究从以下几方面更新或进一步证实了人们对一些类群亲缘关系的认识: (1)紫萁科(Osmundaceae)是薄囊蕨类植物的最早分支,是其他类群的姐妹群; (2)澄清了双扇蕨科(Dipteridaceae)、马通蕨科(Matoniaceae)和里白科(Gleicheniaceae)的系统位置,而且双扇蕨属(*Dipteris*)和燕尾蕨属(*Cheiropleuria*)、马通蕨属(*Matonia*)和 *Phanerosorus* 互为姐妹群,上述 4 个属同里白科(Gleicheniaceae)构成姊妹群关系; (3)孢子异型的水生蕨类(heterosporous ferns)、树蕨类(tree ferns)和水龙骨科(polypods ferns)等构成“核心薄囊蕨类”(core leptosporangiates),莎草蕨类(schizaeoid ferns)为其姊妹群; (4)松叶蕨类(Psilotaceae)与瓶尔小草类(Ophioglossaceae)、木贼(Equisetaceae)与莲座蕨类(Marattiaceae)分别构成姊妹群关系。

**3.3 蕨类植物科内属间的关系分析** 蹄盖蕨科(Athyriaceae)是一个较为复杂的大科,其科下属间关系一直是不同学者争论的焦点。Sano 等(2000)和王玛丽等(2003)分别利用叶绿体 *rbcL* 基因和 *trnL-F* 序列构建了蹄盖蕨科的系统发育树,并综合形态特征,对长期争论的科下属间关系提出了新的观点: (1)蹄盖蕨属(*Athyrium*)、角蕨属(*Cornopteris*)、假冷蕨属(*Pseudocystopteris*)和安蕨属(*Anisocampium*)位于系统发育树的同一分支,系统关系较近; (2)肠蕨属(*Diplaziosis*)和 *Homalosorus* 同岩蕨科(Woodsiaceae)植物位于同一分支; (3)轴果蕨属(*Rhachidosorus*)与蹄盖蕨属和双盖蕨属(*Diplazium*)的关系较远; (4)新蹄盖蕨属(*Neoathyrium*)应该作为角蕨属(*Cornopteris*)植物处理; (5)将蹄盖蕨科划分为 5 个亚科,即冷蕨亚科(Cystopterioideae)、蹄盖蕨亚科(Athyrioideae)、对囊蕨亚科(Debarioideae)、双盖蕨亚科(Diplazioideae)和轴果蕨亚科(Rhachidosorioideae)。

分类学家对鳞毛蕨类植物的概念和科属界定也存在很大争议。鳞毛蕨类植物类群多,分类难度大,其分类范畴、属间界限以及主要类群间的系统

演化关系一直是蕨类学家们争论不休的问题。李春香和陆树刚(2006a)和 Liu 等(2007b)分别利用来自叶绿体基因组的 *rbcL*、*rbcL* 和 *atpB* 基因联合分析对该类植物进行了系统发育重建,两者均认为鳞毛蕨科的概念需要重新调整。Liu 等(2007b)的研究认为,狭义鳞毛蕨科(秦仁昌 1978)的概念需要扩大,即还应该包括球盖蕨科(Peranemaceae)、叉蕨科(Tectariaceae)的部分属(如肋毛蕨属 *Ctenitis*、节毛蕨属 *Lastreopsis* 等)以及舌蕨类植物(elaphoglossoid ferns),而传统的鳞毛蕨科成员 - 拟贯众属(*Cyclopetlis*)同鳞毛蕨科其他成员的关系较远,应该作为藤蕨科(Lomariospidaceae)成员。对鳞毛蕨类植物成员属,如鳞毛蕨属(*Dryopteris*)、舌蕨属(*Elaphoglossum*)、耳蕨属(*Polystichum*)、贯众属(*Cyrtomium*)以及特有植物玉龙蕨属(*Sorolepidium*)的研究,也加深了对该类植物的进一步认识(Little 和 Barrington 2003; Rouhan 等 2004; Geiger 和 Ranker 2005; Lu 等 2005, 2007; Li 和 Lu 2006; Liu 等 2007a; Li 等 2008)。

**3.4 种间亲缘关系分析** 在对蕨类植物进行物种划分和界定时,不同研究者由于对形态特征的处理不同,从而导致对物种的定义存在差异。云南铁角蕨(*Asplenium yunnanense*)和庐山铁角蕨(*A. lushanense*)为 2 个近缘种,在整体形态特征上很接近,但在羽片形态、分裂式样和有无芽胞等方面存在差异,因而被作为 2 个种。王中仁等(2003)的细胞学研究显示,云南铁角蕨与庐山铁角蕨的染色体数目不相同,因此支持作为 2 个独立的种,但是李春香和陆树刚(2006b)的研究显示 2 个物种在 *rbcL*、*trnL-F* 和 *rps4-trnS* 基因序列上无明显差异,认为应该将两者合并为一个种。

**3.5 不同谱系起源时间的推算** 随着分子生物学技术在揭示不同类群系统关系中的逐步深入应用,利用 DNA 序列的演化速率估算类群起源和发生辐射演化的时间也成为了分子系统学研究中一个新的生长点,尤其是如果所研究的类群缺乏化石证据,那么利用 DNA 序列推测类群的起源和演化时间则是唯一可用的方法。Pryer 等(2004)依据化石参照点,利用 2 个基因组 4 个 DNA 序列对真蕨类早期类群的起源和分化时间进行了估算。他们的研究显示,真蕨类植物的早期类群是在石炭纪至侏罗纪开始分化,其中紫萁科植物在石炭纪中期(约 323 Mya)开

始分化,而松叶类和瓶尔小草类植物则在泥盆纪末期(约364 Mya)开始出现,后在石炭纪晚期发生分化,莲座蕨类和木贼类在石炭纪早期(约359 Mya)开始出现,此后不久(约354 Mya)两者即发生分化。Schneider等(2004)综合*rbcL*和*rps4*的分析,认为多数蕨类植物是在白垩纪以后才发生分化的,而大多数被子植物辐射分化的时间是在中侏罗纪到早白垩纪,即多数蕨类植物是在被子植物出现后才发生辐射分化的,该论点彻底打破了传统认为的蕨类植物在被子植物起源和分化后逐渐走向衰退的观点。此外,Yatabe等(1999)、Wikström和Kenrick(2001)、Des Marais等(2003)结合化石记录和DNA序列分别对紫萁科、现存石松类植物和木贼属(*Equisetum*)的起源和演化时间进行了估算。

#### 4 结语

虽然DNA分子标记、基因克隆、基因芯片和RNAi等技术已经在蕨类植物的各项研究中得以应用,但与这些技术在种子植物中的应用相比,无论是技术应用的成熟程度还是所能够解释的科学问题都是刚刚起步。因此,建议以后的蕨类植物研究从以下几个方面开展工作:(1)利用在种子植物中应用成熟的技术,深入分析以水蕨等类群为代表的模式植物的基因组结构(Nakazato等2006)和全基因组序列信息,或者构建蕨类植物不同组织的EST数据库(Salmi等2005; Yamauchi等2005),摸索建立可操作性强的转基因体系(Davis等2005),为分子生物学技术在蕨类研究方法学中的不断改进与完善奠定基础,同时也为深入分析和解决蕨类植物生物学问题提供可能;(2)利用分子标记技术与特异DNA序列特征,以分类系统尚存的有疑问的类群和科属(如水龙骨科、凤尾蕨科等)为重点开展分子系统学研究,为建立自然的科属分类系统提供进一步证据(刘红梅等2008)。同时,可以根据蕨类植物的特殊进化位置,开展进化-发育(Evo-Devo)生物学研究;(3)基于种子植物基因功能分析的现有成果,通过同源基因序列分析,利用基因克隆与表达技术、基因芯片技术、RNAi/DNAi技术以及蛋白质组学技术,深入揭示蕨类植物发育与代谢过程的分子机制。在基础研究层面,深入分析蕨类植物特有的生物学过程,如孢子形成与萌发、配子体性别分化、受精作用与胚发育等过程中关键事件(如单细胞光响应、细胞核迁移、细胞骨架动态、细胞

极性生长)的分子调控机理(戴绍军等2008),以及深入解析一些蕨类植物对重金属和干旱等逆境的适应与防御的分子机制等。在应用基础研究层面,有针对性地利用基因功能分析与转基因等技术,改善一些具经济价值蕨类植物的生物学性状,比如园艺观赏(如肾蕨*Nephrolepis auriculata*)、工艺(如树蕨*Alsophila spinulosa*)、环保植物(如蜈蚣草*P. vittata*)、药用(如问荆*E. arvense*)、食用(如蕨菜*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*)、工业用(如石松*Lycopodium*)与农用(如满江红*Azolla imbricata*)植物等,使其获得更大的经济价值。

#### 参考文献

- 陈进明,王晶苑,刘星,张彦文,王青锋(2004). 中华水韭遗传多样性的RAPD分析. 生物多样性, 12: 348~353
- 陈媛媛,叶其刚,黄宏文(2003). 中华水韭(*Isoetes inensis*)等位酶分析的初步研究. 武汉植物学研究, 21: 91~94
- 戴绍军,高晶,牟鸿飞,宋莹莹(2008). 蕨类植物孢子与种子植物花粉萌发的比较. 植物学通报, 25: 139~148
- 李春香,陆树刚(2006a). 鳞毛蕨科植物的系统发育: 叶绿体*rbcL*序列的证据. 植物分类学报, 44: 503~515
- 李春香,陆树刚(2006b). 云南铁角蕨与庐山铁角蕨的关系: 来自叶绿体*rbcL*、*trnL-F*和*rps4-trnS*序列的证据. 植物分类学报, 44: 296~303
- 刘红梅,王丽,张宪春,曾辉(2008). 石松类和蕨类植物研究进展: 兼论国产类群的科级分类系统. 植物分类学报, 46: 808~829
- 刘红梅,张宪春,曾辉(2009). DNA序列在蕨类分子系统学研究中的应用. 植物学报, 44: 143~158
- 潘丽芹,季华,陈龙清(2005). 荷叶铁线蕨自然居群的遗传多样性研究. 生物多样性, 13: 122~129
- 秦仁昌(1978). 中国蕨类植物科属的系统排列和历史来源. 植物分类学报, 16: 1~19, 16~37
- 王玛丽,陈之端,张宪春,陆树刚,赵桂仿(2003). 蹄盖蕨科的系统发育: 叶绿体DNA *trnL-F*区序列证据. 植物分类学报, 41: 416~426
- 王中仁(1996). 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1~137
- 王中仁,王可青,张方,侯鑫(2003). 华中铁角蕨复合体的生物学系统学研究. 植物学报, 45: 1~14
- Banks JA (1997). The *TRANSFORMER* genes of the fern *Ceratopteris richardii* simultaneously promote meristem and archegonia development and repress antheridia development in the developing gametophyte. Genetics, 147: 1885~1897
- Banks JA (1999). Gametophyte development in ferns. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 163~186
- Caliea PJ (2005). A mutant hunt using the C-fern (*Ceratopteris richardii*). Am Biol Teach, 67: 295~299
- Davis CC, Anderson WR, Wurdack KJ (2005). Gene transfer from a parasitic flowering plant to a fern. Proc Biol Sci, 272: 2237~2242
- Des Marais DL, Smith AR, Britton DM, Pryer KM (2003). Phylogenetic relationships and evolution of extant horsetails,

- Equisetum*, based on chloroplast DNA sequence data (*rbcL* and *trnL-F*). *Int J Plant Sci*, 164: 737~751
- Dong RB, Formentin E, Losseo C, Carimi F, Benedetti P, Terzi M, Schiavo FL (2005). Molecular cloning and characterization of a phytochelatin synthase gene, *PvPCS1*, from *Pteris vittata* L. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32: 527~533
- Dong YH, Chen JM, Gituru RW, Wang QF (2007). Gene flow in populations of the endangered aquatic fern *Ceratopteris pteridoides* in China as revealed by ISSR markers. *Aquatic Bot*, 87: 69~74
- Duan GL, Zhu YG, Tong YP, Cai C, Kneer R (2005). Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. *Plant Physiol*, 138: 461~469
- Eberle JR, Banks JA (1996). Genetic interactions among sex determining genes in the fern *Ceratopteris richardii*. *Genetics*, 142: 973~985
- Ellis DR, Gumaelius L, Indriolo E, Pickering IJ, Banks JA, Salt DE (2006). A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiol*, 141: 1544~1554
- Geiger JM, Ranker TA (2005). Molecular phylogenetics and historic biogeography of Hawaiian *Dryopteris* (Dryopteridaceae). *Mol Phylogenet Evol*, 34: 392~407
- Huang YM, Chou HM, Chiou WL (2004). Density affects gametophyte growth and sexual expression of *Osmunda cinnamomea* (Osmundaceae: Pteridophyta). *Ann Bot*, 94: 229~232
- Imaizumi T, Kanegae T, Wada M (2000). Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell*, 12: 81~95
- Ishikawa H, Watano Y, Kano K, Ito M, Kurita S (2002). Development of primer sets for PCR amplification of the *PgiC* gene in ferns. *J Plant Res*, 115: 65~70
- Kamachi H, Iwasawa O, Hickok LG, Nakayama M, Noguchi M, Inoue H (2007). The effects of light on sex determination in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii*. *J Plant Res*, 120: 629~634
- Kamachi H, Matsunaga E, Noguchi M, Inoue H (2004). Novel mutant phenotypes of a dark-germinating mutant *dkg1* in the fern *Ceratopteris richardii*. *J Plant Res*, 117: 163~170
- Kang M, Ye Q, Huang H (2005). Genetic consequence of restricted habitat and population decline in endangered *Isoetes sinensis* (Isoetaceae). *Ann Bot*, 96: 1265~1274
- Kawai-Toyooka H, Kuramoto C, Orui K, Motoyama K, Kikuchi K, Kanegae T, Wada M (2004). DNA interference: a simple and efficient gene-silencing system for high-throughput functional analysis in the fern *Adiantum*. *Plant Cell Physiol*, 45: 1648~1657
- Korpelainen H, Britto J, Doublet J, Pravin S (2005). Four tropical, closely related fern species belonging to the genus *Adiantum* L. are genetically distinct as revealed by ISSR fingerprinting. *Genetica*, 125: 283~291
- Li CX, Lu SG (2006). Phylogenetics of Chinese *Dryopteris* (Dryopteridaceae) based on the chloroplast *rps4-trnS* sequence data. *J Plant Res*, 119: 589~598
- Li CX, Lu SG, Barrington DS (2008). Phylogeny of Chinese *Polystichum* (Dryopteridaceae) based on chloroplast DNA sequence data (*trnL-F* and *rps4-trnS*). *J Plant Res*, 121: 19~26
- Little DP, Barrington DS (2003). Major evolutionary events in the origin and diversification of the fern genus *Polystichum* (Dryopteridaceae). *Am J Bot*, 90: 508~514
- Liu HM, Zhang XC, Chen ZD, Qiu YL (2007a). Inclusion of the Asiatic endemic genus *Sorolepidium* in *Polystichum* (Dryopteridaceae): evidence from the chloroplast *rbcL* and morphological evidence. *Chin Sci Bull*, 52: 631~638
- Liu HM, Zhang XC, Wang W, Qiu YL, Chen ZD (2007b). Molecular phylogeny of the fern family Dryopteridaceae inferred from chloroplast *rbcL* and *atpB* genes. *Int J Plant Sci*, 689: 1311~1323
- Lu JM, Barrington DS, Li DZ (2007). Molecular phylogeny of the polystichoid ferns in Asia based on *rbcL* sequences. *Syst Bot*, 32: 26~33
- Lu JM, Li DZ, Gao LM, Cheng X, Wu D (2005). Paraphyly of *Cyrtomium* (Dryopteridaceae): evidence from *rbcL* and *trnL-F* sequence data. *J Plant Res*, 118: 129~135
- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang WH, Cai Y, Kennelley ED (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409: 579~584
- Nakazato T, Jung MK, Housworth EA, Rieseberg LH, Gastony GJ (2006). Genetic map-based analysis of genome structure in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Genetics*, 173: 1585~1597
- Noumi T, Mosher ME, Natori S, Futai M, Kanazawa H (1984). A phenylalanine for serine substitution in the beta subunit of *Escherichia coli* F1-ATPase affects dependence of its activity on divalent cations. *J Biol Chem*, 259: 10071~10075
- Pryer KM, Schneider H, Smith AR, Cranfill R, Wolf PG, Hunt JS, Sipes SD (2001). Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature*, 409: 618~622
- Pryer KM, Schuettpelz E, Wolf PG, Schneider H, Smith AR, Cranfill R (2004). Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *Am J Bot*, 91: 1582~1598
- Rathinasabapathi B, Wu S, Sundaram S, Rivoal J, Srivastava M, Ma LQ (2006). Arsenic resistance in *Pteris vittata* L.: identification of a cytosolic triosephosphate isomerase based on cDNA expression cloning in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol*, 62: 845~857
- Rouhan G, Dubuisson JY, Pakotondrainibe F, Motley TJ, Mickel JT, Labat JN, Moran RC (2004). Molecular phylogeny of the fern genus *Elaphoglossum* (Elaphoglossaceae) based on chloroplast non-coding DNA sequences: contributions of species from the Indian Ocean area. *Mol Phylogenet Evol*, 33: 745~763
- Roux SJ, Chatterjee A, Hillier S, Cannon T (2003). Early development of fern gametophytes in microgravity. *Adv Space Res*, 31: 215~220
- Rutherford G, Tanurdzic M, Hasebe M, Banks JA (2004). A systemic gene silencing method suitable for high throughput,

- reverse genetic analyses of gene function in fern gametophytes. *BMC Plant Biology*, 4: 6
- Salmi ML, Bushart TJ, Stout SC, Roux SJ (2005). Profile and analysis of gene expression changes during early development in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol*, 138: 1734~1745
- Salmi ML, Morris KE, Roux SJ, Porterfield DM (2007). Nitric oxide and cGMP signaling in calcium-dependent development of cell polarity in *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol*, 144: 94~104
- Sano R, Takamiya M, Ito M, Kurita S, Hasebe M (2000). Phylogeny of the lady fern group, tribe Phymatiales (Dryopteridaceae), based on chloroplast *rbcL* gene sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 15: 403~413
- Schallau A, Kakhovskaya I, Tewes A, Czihal A, Tiedemann J, Mohr M, Grosse I, Manteuffel R, Bäumlein H (2008). Phylogenetic footprints in fern spore- and seed-specific gene promoters. *Plant J*, 53: 414~424
- Schneider H, Schuettpelz E, Pryer KM, Cranfill R, Magallon S, Lupia R (2004). Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature*, 428: 553~557
- Schor-Fumbarov T, Goldsbrough PB, Adam Z, Tel OE (2005). Characterization and expression of a metallothionein gene in the aquatic fern *Azolla filiculoides* under heavy metal stress. *Planta*, 223: 69~76
- Stout SC, Clark GB, Sarah AE, Roux SJ (2003). Rapid and efficient suppression of gene expression in a single-cell model system, *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol*, 131: 1165~1168
- Su YJ, Wang T, Zheng B, Jiang Y, Chen GP, Gu HY (2004). Population genetic structure and phylogeographical pattern of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae), inferred from cpDNA *atpB-rbcL* intergenic spacers. *Theor Appl Genet*, 109: 1459~1467
- Sundaram S, Rathinasabapathi B, Ma LQ, Rosen BP (2008). An arsenate-activated glutaredoxin from the arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. regulates intracellular arsenite. *J Biol Chem*, 283: 6095~6101
- Tsuboi H, Suetsugu N, Kawai-Toyooka H, Wada M (2007). Phototropins and neochrome1 mediate nuclear movement in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell Physiol*, 48: 892~896
- Tsuboi H, Suetsugu N, Wada M (2006). Negative phototropic response of rhizoid cells in the fern *Adiantum capillus-veneris*. *J Plant Res*, 119: 505~512
- van der Weele CM, Tsai CW, Wolniak SM (2007). Mago nashi is essential for spermatogenesis in *Marsilea*. *Mol Biol Cell*, 18: 3711~3722
- Wada M (2007). The fern as a model system to study photomorphogenesis. *J Plant Res*, 120: 3~16
- Wang T, Su YJ, Li XY, Zheng B, Chen GP, Zeng QL (2004). Genetic structure and variation in the relict populations of *Alsophila spinulosa* from southern China based on RAPD markers and cpDNA *atpB-rbcL* sequence data. *Hereditas*, 140: 8~17
- Wen CK, Smith R, Banks JA (1999). ANI: A sex pheromone-induced gene in *Ceratopteris* gametophytes and its possible role in sex determination. *Plant Cell*, 11: 1307~1317
- Wikström N, Kenrick P (2001). Evolution of Lycopodiaceae (Lycopodiophyta): estimating divergence times from *rbcL* gene sequences by use of nonparametric rate smoothing. *Mol Phylogenet Evol*, 19: 177~186
- Wikström N, Pryer KM (2005). Incongruence between primary sequence data and the distribution of a mitochondrial *atp1* group II intron among ferns and horsetails. *Mol Phylogenet Evol*, 36: 484~493
- Woodhead M, Russell J, Squirrell J, Hollingsworth PM, Cardle L, Ramsay L, Gibby M, Powell W (2003). Development of EST-SSRs from the alpine lady fern, *Athyrium distentifolium*. *Mol Ecol Notes*, 3: 287~290
- Woodhead M, Russell J, Squirrell J, Hollingsworth PM, Mackenzie K, Gibby M, Powell W (2005). Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. *Mol Ecol*, 14: 1681~1695
- Yamauchi D, Sutoh K, Kanegae H, Horiguchi T, Matsuoka K, Fukuda H, Wada M (2005). Analysis of expressed sequence tags in prothallia of *Adiantum capillus-veneris*. *J Plant Res*, 118: 223~227
- Yatabe Y, Nishida H, Murakami N (1999). Phylogeny of Osmundaceae inferred from *rbcL* nucleotide sequences and comparison to the fossil evidences. *J Plant Res*, 112: 397~404