

裸子植物的生化系统学(二)——松科植物的 种子蛋白多肽

胡志昂 刘长江 王洪新*

(中国科学院植物研究所, 北京)

摘要 本文用 SDS 线性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了松科 Pinaceae 10 属凡 50 种植物的种子蛋白多肽。松科植物种子都有含量较高的、分子量为 45000 道尔顿(简称为 45 K)的多肽。分子量大于 45K 的多肽种类很多, 但含量都较低。为了定量地比较各分类群主要种子蛋白多肽, 规定“多肽距离”为两分类群不同的多肽数除两分类群多肽总数的商。各属种间平均多肽距离和前文报道的酶谱距离有同样的趋势, 证明松科分子进化速率的稳定性。除了油杉属和冷杉属比较接近外, 各属间多肽差别很大, 说明属间的间断性。种间多肽谱虽有不同程度的变异, 但变异是连续的。不同属、不同亚属形态进化和分子进化的比较, 表明两种进化在速率和机理上都是不同的。

关键词 松科; 种子蛋白多肽; 分子进化

前文^[2]报道了松科植物的过氧化物酶。尽管酶谱资料和形态学资料一样具有种属专一性, 但是和形态资料不同, 各属的种间平均酶谱距离并不固定, 而是与该属化石历史成正相关。这是分子进化的特点。

在植物分类学中, 报道最多的大分子资料是种子蛋白。据 Ladizinsky 和 Hymowitz (1979)^[7]的统计, 到 1978 年止已研究过 13 科 45 属植物的种子蛋白分类, 证明种子蛋白电泳谱具有高度稳定性、专一性和叠加性(杂种及异源多倍体的蛋白谱是亲本谱的叠加), 广泛用于研究粮食作物和豆类及其近缘野生种的起源和进化, 作为地球上主要森林树种的裸子植物却很少报道。Clarkson 和 Fairbrothers (1970)^[5]报道过 2 种又 1 变种美洲产冷杉的种子蛋白电泳。Juo 和 Stotzky (1970)^[6]分析了 5 种松树、1 种冷杉、1 种云杉和 1 种落叶松的种子蛋白, 提议应该分析更多的种类方利于比较。最近, Langridge 等 (1981)^[8]报道了辐射松 (*Pinus radiata*) 种子蛋白多肽的遗传学。蛋白样品电泳前用十二烷基硫酸钠(SDS) 处理, 离解为亚基多肽。随后用高分辨率的 SDS 线性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。因为每个多肽迁移的距离和其分子量的对数成反比, 通过和已知分子量的标准蛋白比较, 便可确定每个多肽的分子量。本文报道用类似方法分析松科全部 10 属 50 种植物种子蛋白多肽的结果。

材料和方法

分析种子蛋白多肽的松科植物按《中国植物志》第七卷(裸子植物)的系统^[1]列于表 1。种子蛋白的提取用 Hymowitz 和 Hadley (1972)^[5]的提取液, 但外加 0.5 M NaCl。提

* 承蒙傅立国、陈祖镗及黄敏仁同志赠给种子, 谨致谢意。

表 1 分析种子蛋白多肽的植物名录

Table 1 Plant catalog used to analyse seed protein peptides

中文名	学名	中文名	学名
1. 云南油杉	<i>Keteleeria evelyniana</i>	26. 黄花落叶松	<i>L. olgensis</i>
2. 青岩油杉	<i>K. davidiana</i> var. <i>chien-peii</i>	27. 欧洲落叶松	<i>L. decidua</i>
3. 日本冷杉	<i>Abies firma</i>	28. 金钱松	<i>Pseudolarix amabilis</i>
4. 西藏冷杉	<i>A. spectabilis</i>	29. 雪松	<i>Cedrus deodara</i>
5. 黄果冷杉	<i>A. ernestii</i>	30. 红松	<i>Pinus koraiensis</i>
6. 紫果冷杉	<i>A. recurvata</i>	31. 华山松	<i>P. armandi</i>
7. 白冷杉	<i>A. concolor</i>	32. 海南五针松	<i>P. fenzeliana</i>
8. 黄杉	<i>Pseudotsuga sinensis</i>	33. 乔松	<i>P. griffithii</i>
9. 华东黄杉	<i>P. gaussenii</i>	34. 北美乔松	<i>P. strobus</i>
10. 云南铁杉	<i>Tsuga dumosa</i>	35. 日本五针松	<i>P. parviflora</i>
11. 铁杉	<i>T. chinensis</i>	36. 华南五针松	<i>P. kwangtungensis</i>
12. 银杉	<i>Cathaya argyrophylla</i>	37. 白皮松	<i>P. bungeana</i>
13. 鳞皮云杉	<i>Picea retroflexa</i>	38. 西藏长叶松	<i>P. roxburghii</i>
14. 云杉	<i>P. asperata</i>	39. 油松	<i>P. tabulaeformis</i>
15. 红皮云杉	<i>P. koraiensis</i>	40. 云南松	<i>P. yunnanensis</i>
16. 雪岭杉	<i>P. schrenkiana</i>	41. 思茅松	<i>P. kesiya</i> var. <i>langbianensis</i>
17. 欧洲云杉	<i>P. abies</i> (Linn.)	42. 马尾松	<i>P. massoniana</i>
18. 紫果云杉	<i>P. purpurea</i> Mast.	43. 黄山松	<i>P. taiwanensis</i>
19. 鱼鳞云杉	<i>P. jezoensis</i> var. <i>microsperma</i>	44. 黑松	<i>P. thunbergii</i>
20. 西藏云杉	<i>P. spinulosa</i>	45. 西黄松	<i>P. ponderosa</i>
21. 喜马拉雅红杉	<i>Larix himalaica</i>	46. 加勒比松	<i>P. caribaea</i>
22. 红杉	<i>L. potaninii</i>	47. 巨松	<i>P. lambertiana</i>
23. 新疆落叶松	<i>L. sibirica</i>	48. 意大利松	<i>P. pinea</i> L.
24. 落叶松	<i>L. gmelini</i>	49. 单叶松	<i>P. monophylla</i>
25. 华北落叶松	<i>L. principis-rupprechtii</i>	50. 阿勒颇松	<i>P. halepensis</i>

取过程基本上采用 Langridge 等 (1981)^[8] 方法而略作变更, 具体步骤如下: 约 20 毫克种子用 2 毫升提取液磨成匀浆; 2000 g 离心 5—10 分钟, 上清液加二倍以上体积的丙酮, -10℃ 放置 1—2 小时; 2000g 离心 5 分钟, 弃去上清液; 沉淀用 0.5 毫升 Langridge 等 (1981)^[8] 的解离液溶解, 100℃ 下加热 5 分钟, 存放冰箱备用。电泳胶的组成、电泳、染色和脱色按 Spencer 等 (1980)^[10] 方法。

蛋白质多肽分子量的测定用下列标准蛋白: 细胞色素 C (分子量 12500 道尔顿, 简写为 12.5 K); 铁蛋白 (18.5 K); 胰凝乳蛋白酶原 A (25 K); 肌肉醛缩酶 (39.5 K); 卵清蛋白 (45 K); 过氧化氢酶 (57.5 K); 血清白蛋白 (68 K)。各标准蛋白的迁移率对分子量对数作图得一直线。种子蛋白多肽的分子量可以根据其迁移率从直线上查出。标准蛋白系联邦德国 Boehringer 产品。

各分类群相互分歧的数量指标类似前文的酶谱距离^[2], 定义“多肽距离”如下:

$$\text{多肽距离} = \frac{\text{两分类群不同的多肽数}}{\text{两分类群多肽总数}}$$

由于方法分辨率高,含量低的多肽很多,尤其是分子量大于 45K 的多肽(见图版 1:2¹⁾)。因此,计算多肽距离时只统计分子量不大于 45 K 的主要多肽。本文所有数据只有相对比较的意义。

结果和讨论

1. 银杉和油松种子蛋白多肽的分子量

图版 1:1 是银杉、油松的种子蛋白多肽的电泳谱。为了确定各个多肽的分子量,同一板也进行了标准蛋白电泳。图版 1:1:1—7²⁾ 是材料和方法一节所叙 7 种标准蛋白的谱,图版 1:1:8 是其混合电泳谱。有的标准蛋白很纯,只有一条带;有的还有一些小分子量的多肽,可能是贮存中降解的碎片。将各标准蛋白电泳谱中分子量最大、含量又最高的主带的迁移距离对其分子量的对数作图,得到一条直线。测量银杉电泳谱各多肽的迁移距离,从直线查出对应于迁移距离(横坐标)的纵坐标上的分子量数值。我们就知道银杉主要多肽的分子量为 45K,含量较高的有 55K、36K、21K 三种,含量较低的有 39 K、30 K、23K、20 K 和 17 K。油松的主带也是 45K,含量较高的有 38K、31K、20K。55K、36K、23K 和 17 K 含量较低。事实上,油松种子的 38、36K 两条多肽是由很多多肽组成。当电泳时间延长之后就分出很多细带来(参见图版 2:1:8 和图版 2:2:1)。

2. 松科各属的种间距离

(1) 落叶松属,共分析 7 种,包括红杉组和落叶松组。种间距离见表 2。

表 2 落叶松属种间多肽距离

Table 2 Interspecific peptide distances of genus *Larix*

	喜马拉雅红杉	红杉	新疆落叶松	落叶松	华北落叶松	黄花落叶松	欧洲落叶松
喜马拉雅红杉 <i>L. himalaica</i>	0	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
红杉 <i>L. potaninii</i>		0	0	0	0	0	0.22
新疆落叶松 <i>L. sibirica</i>			0	0	0	0	0.22
落叶松 <i>L. gmelini</i>				0	0	0	0.22
华北落叶松 <i>L. principis-rupprechtii</i>					0	0	0.22
黄花落叶松 <i>L. olgensis</i>						0	0.22
欧洲落叶松 <i>L. decidua</i>							0

整个落叶松属共 9 条主带,其中 7 带是共有的,没有一个种具有专一的多肽,平均种间多肽距离为 0.08,其中 5 种的多肽谱见图版 2:2:2—6。

1) 即图版 1 中的图 2,余同。

2) 即图版 1 的图 1 中的 1—7,余同。

(2) 云杉属, 共分析了 8 种, 分别属于云杉组、丽江云杉组和鱼鳞云杉组, 其中 7 种的多肽距离见表 3, 其中 6 种的多肽谱见图版 2:2:10—15。和落叶松属类似, 云杉属各种的多肽谱也比较相似。七种云杉共 9 条主要多肽, 其中 6 条是共同的。从表 3 计算平均种间多肽距离为 0.18。

表 3 云杉属种间多肽距离

Table 3 Interspecific peptide distances of genus *Picea*

	鳞皮云杉	云杉	红皮云杉	雪岭杉	欧洲云杉	紫果云杉	西藏云杉
鳞皮云杉 <i>P. retroflexa</i>	0	0.13	0.13	0.13	0.22	0.33	0.25
云杉 <i>P. asperata</i>		0	0	0.25	0.13	0.25	0.14
红皮云杉 <i>P. koreaiensis</i>			0	0.25	0.13	0.25	0.14
雪岭杉 <i>P. schrenkiana</i>				0	0.22	0.13	0.14
欧洲云杉 <i>P. abies</i>					0	0.13	0.25
紫果云杉 <i>P. purpurea</i>						0	0.14
西藏云杉 <i>P. spinulosa</i>							0

表 4 冷杉属种间多肽距离

Table 4 Interspecific peptide distances of genus *Abies*

	日本冷杉	西藏冷杉	黄果冷杉	紫果冷杉	白冷杉
日本冷杉 <i>A. firma</i>	0	0.38	0.28	0.14	0.45
西藏冷杉 <i>A. spectabilis</i>		0	0.38	0.44	0.45
黄果冷杉 <i>A. ernestii</i>			0	0.14	0.45
紫果冷杉 <i>A. recurvata</i>				0	0.36
白冷杉 <i>A. concolor</i>					0

(3) 冷杉属, 分析了 5 种, 多肽距离见表 4。冷杉属 5 种总计有主要多肽 11 条, 只有 5 条是各种都有的。除了白冷杉 (*Abies concolor*) 有两条专一的多肽外, 其他多肽都不只在一个种里分布。说明冷杉属内虽然差异很大, 但变化基本上是连续的。从表 4 数据计算平均种间距离为 0.35, 其中 3 种的多肽谱见图版 2:2:7—9。Clarkson 和 Fairbrothers (1970)^[3] 分析过两种美洲产冷杉的种子蛋白, 种间距离为 0.36, 和我们的数据十分接近。

(4) 松属, 共分析 22 种, 其中 15 种的多肽谱见图版 2:1。从图版可见, 虽然每个

表 5 松科的分子进化

属 名	化石历史 ^[4]	抗原距离 ^[9]	酶谱距离 ^[2]	多肽距离
落叶松属 <i>Larix</i>	中新世	0	0	0.08
雪松属 <i>Cedrus</i>	渐新世	—	0	—
黄杉属 <i>Pseudotsuga</i>		—	0.17	—
油杉属 <i>Keteleeria</i>		—	0.29	—
铁杉属 <i>Tsuga</i>	始新世	1.0	—	—
冷杉属 <i>Abies</i>		—	0.44	0.35
云杉属 <i>Picea</i>	晚白垩纪	0.5	0.30	0.18
松属 <i>Pinus</i>	早白垩纪	2.3	0.67	0.39

种的种子蛋白都可分辨出 30 余多肽, 但为全属共有的不足 10 条。计算松属种间平均多肽距离约 0.39, 所以松属是松科中分歧最大的属, 这和前文报道的酶谱资料是一致的^[2]。从图版 2:1 还可看出松属内两亚属的显著差别。图版 2:1:1—6 是单维管束亚属一些种的多肽谱, 与双维管束亚属一些种(图版 2:1:7—15) 比较有很多不同。在分子量 35—45K 之间, 单维管束亚属各种有较少的多肽, 而且集中在中间区域, 各个种之间有一定的差别。双维管束亚属各种该区有很多含量低的多肽, 几乎均匀分布于整个区域, 尤其是欧亚种类(图版 2:1:7—13) 相互没有区别。在 29—35 K 之间, 松属共有 29、31、33 和 35 K 等四种多肽。基本上一个种只有一条。单维管束亚属只有高分子量的 33、35 K 两种, 双维管束亚属欧亚种类都是 31K, 而美洲产的西黄松、火炬松、加勒比松都是 29 K。Langridge (1981)^[8] 报道的辐射松(原产美国加州)也是 29 K。在 14—24K 之间, 单维管束亚属各种的主要多肽是 24K 或 23K, 双维管束亚属多是 23K。20K 多肽是全属共有的, 该区域内, 单维管束亚属种间有一定的分歧, 而双维管束亚属亚洲几个种(图版 2:1:7—11, 13) 多肽谱完全一样。黑松、黄山松、马尾松、云南松、思茅松的整个多肽谱似乎完全一样。前文^[2] 报道它们的过氧化物酶谱也几乎完全一样。从整个多肽谱看, 松属两亚属差别显著, 单维管束亚属内种间变化大, 双维管束亚属各种相当接近。这结果和前文报道的酶谱资料^[2] 一致, 说明松属划分为两亚属的正确性, 可能, 双维管束亚属起源于单维管束亚属。

将上述各属的平均种间多肽距离与松科其他属的大分子资料列于表 5。

从表 5 可见, 三种大分子资料是完全平行的, 除云杉属外, 与地质年代也是平行的。种子蛋白多肽资料进一步证实松科分子进化速率的稳定性。云杉属数据较低的原因是否因为古老类型的灭绝? 这有待化石资料来判断。前文^[2] 曾对比落叶松属和松属, 讨论了松科的形态进化和分子进化。应补充说明的, 即使在松属内部形态进化速率也不一样。单维管束亚属的五针松组形态上比较接近, 但多肽谱有明显差别。双维管束亚属各种的多

肽谱都十分接近,表明种的分化是在近期发生的。白皮松曾被认为是两亚属之间的中间过渡类型或认为可另立一亚属的,但从多肽谱(图版 2:1:6)看,白皮松还是属于单维管束亚属为宜。

3. 松科各属的多肽

松科各属代表种的种子蛋白多肽谱见图版 1:2。可以看出,除油杉和冷杉比较接近外,松科各属的多肽谱差别极大,尤其和属内各种的多肽谱(图版 2:1,图版 2:2)比较,看得更清楚。不仅是落叶松属、云杉属内各种多肽谱十分接近,因而有明显的属专一性,即使是差别较大的松属,属的专一性也很显著。因为属间多肽谱差别太大,很难确定是相同的多肽还是不同的多肽,很难计算多肽距离。从主要多肽的分子量作定性的估计:油杉属和冷杉属比较接近,黄杉、落叶松和雪松相近,银杉、金钱松和松属有一定的共同点。值得注意的是落叶松和金钱松,虽然形态上很接近,但种子蛋白多肽(图版 1:2:7,8)差别很大。

总之,从本文报道的种子蛋白资料,说明松科属内变异的连续性和属间的间断性,证明松科传统分类在属、种划分上的正确^[1]。

松科植物的大分子资料(见表 5)还说明松科分子进化速率的相对稳定。比较落叶松属和松属,以及比较松属内两亚属,看来松科的分子进化和形态进化是机理上不同的两类进化。

参 考 文 献

- [1] 郑万钧、傅立国等, 1978: 中国植物志第七卷, 裸子植物门, 科学出版社。
- [2] 胡志昂等, 1983: 裸子植物的生化系统学。I. 松科植物的过氧化物酶。植物分类学报, 21(4): 423—432。
- [3] Clarkson, R. B. and D. E. Fairbrothers, 1970: A serological and electrophoretical investigation of eastern North America *Abies* (Pinaceae). *Taxon*. 19: 720—727.
- [4] Florin, R., 1963: The distribution of conifer and taxad genera in time and space. *Acta Horti. bergiani* 20: 122—312.
- [5] Hymowitz, T. and H. H. Hadley, 1972: Inheritance of a trypsin inhibitor variant in seed protein of soybeans. *Crop Sci.* 12: 197—198.
- [6] Juo, P. S. and G. Stotzky, 1970: Electrophoretic patterns of globulins and albumins in conifer seeds. *Can. J. Bot.* 48: 1911—1912.
- [7] Ladizinsky, C. and T. Hymowitz, 1979: Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 54: 145—151.
- [8] Langridge, P. et al., 1981. Biochemical genetics of some seed proteins of *Pinus radiata*. *Biochem. Genetics* 19: 585—597.
- [9] Prager, E. M. et al., 1976: Rate of evolution in conifers (Pinaceae). *Evolution* 30: 637—649.
- [10] Spencer, D. et al., 1980: Pulse-labeling studies on protein synthesis in developing pea seeds and evidence of a precursor form of legumin small subunit. *Pl. Physiol.* 66: 510—515.

BIOCHEMICAL SYSTEMATICS OF GYMNOSPERMS (2) SEED PROTEIN PEPTIDES OF PINACEAE

HU ZHI-ANG LIU ZHANG-JIANG WANG HONG-XIN

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

Abstract By means of SDS linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis, seed protein peptides of 50 species belonging to 10 genera of Pinaceae were analysed. A major peptide possessing molecular weight about 45000 daltons is shared by every species in Pinaceae. There are many peptides of higher molecular weight in seeds, but their content is very low. In order to make a series of quantitative comparisons between any two taxa, we define "peptide distance" as follows:

$$\text{peptide distance} = \frac{\text{number of different peptides between 2 taxa}}{\text{total number of peptides in 2 taxa}}$$

In the following table, the peptide distances of some genera are shown together with other molecular data about *Pinaceae*.

genus	ancestry of genus	antigen distance	zymogram distance	peptide distance
<i>Larix</i>	Miocene to now (25My)	0	0	0.08
<i>Cedrus</i> <i>Pseudotsuga</i> <i>Keteleeria</i>	Oligocene to now (35My)	—	0 0.17 0.29	— — —
<i>Tsuga</i> <i>Abies</i>	Eocene to now (57My)	1.0 —	— 0.44	— 0.35
<i>Picea</i>	Late Cretaceous-(67—100 My)	0.5	0.30	0.18
<i>Pinus</i>	Early Cretaceous-(100—130My)	2.3	0.67	0.39

From the data cited above, there are positive correlation between molecular data and the ancestry of genera in *Pinaceae*. Therefore, the rate of molecular evolution seems stable. Based on the data of peptide distances, it is suggested that the variation be discontinuous between the genera, but continuous within a genus. A comparison between molecular and morphological evolution indicates that the two evolutions are different not only in rate but in mechanism as well.

Key words Pinaceae; seed protein peptides; molecular evolution

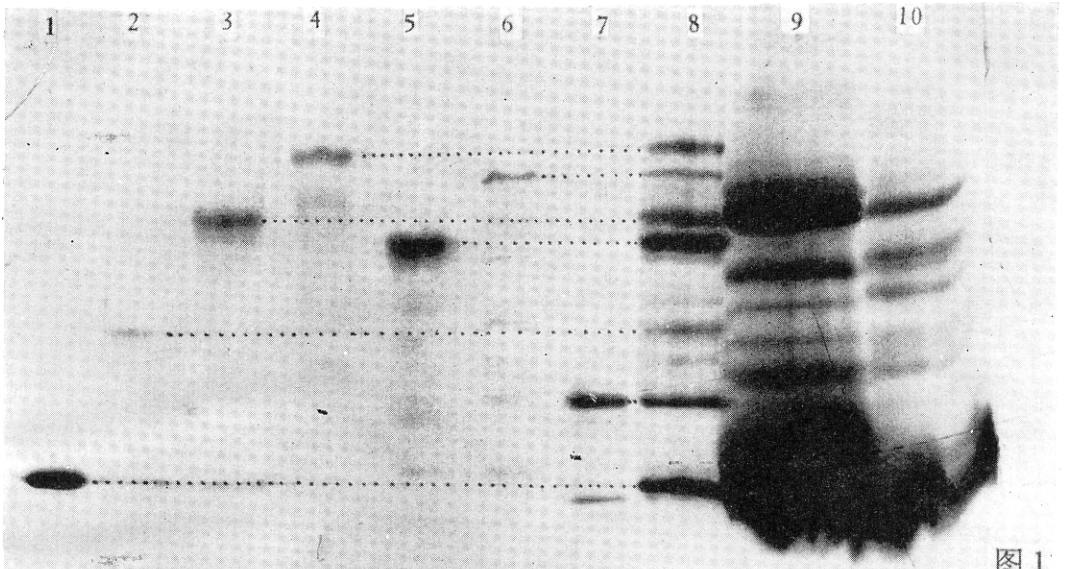


图 1

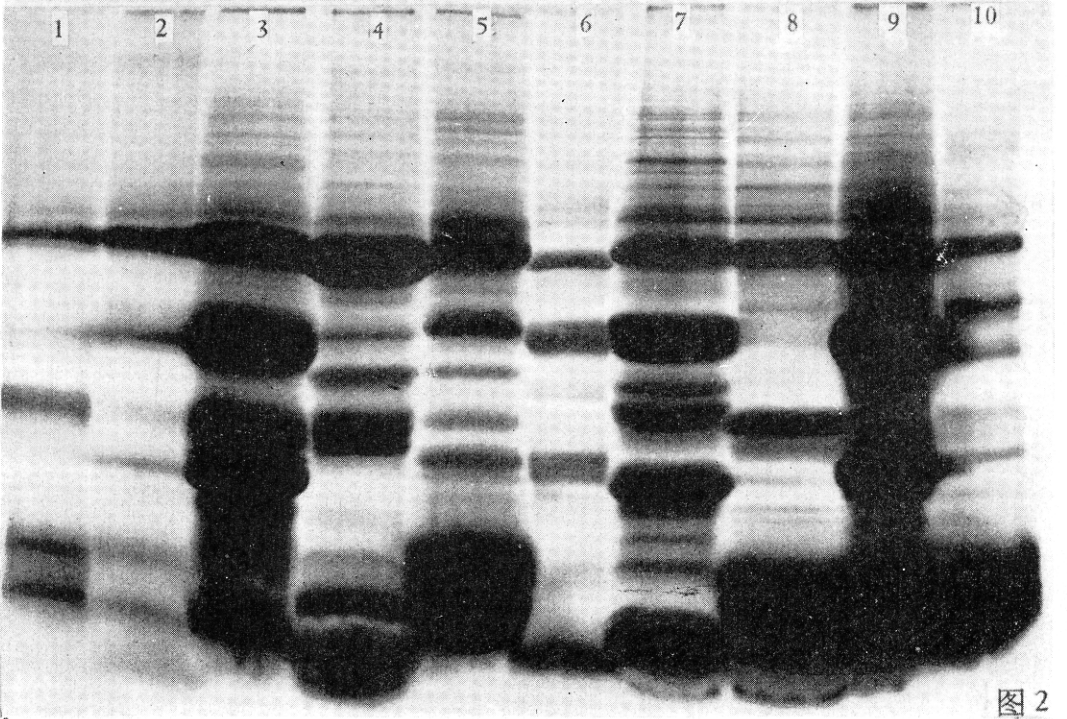


图 2

图 1 银杉种子蛋白多肽的分子量

Fig. 1 Molecular weight of seed protein peptides of *Cathaya*

1. 细胞色素 C, Cytochrome C; 2. 胰凝乳蛋白酶原 A, Chymotrypsinogen A; 3. 卵清蛋白 Albumin (egg); 4. 血清白蛋白 Albumin (serum); 5. 醛缩酶 Aldolase; 6. 过氧化氢酶 Catalase; 7. 铁蛋白 Ferritin; 8. 标准蛋白系列 Standard protein set; 9. *Cathaya argyrophylla*; 10. *Pinus tabulaeformis*.

图 2 松科10属种子蛋白多肽谱

Fig. 2 Seed protein peptide profiles of ten genera in Pinaceae

1. *Keteleeria davidiana*; 2. *Abies holophylla*; 3. *Pseudotsuga gaussonii*; 4. *Tsuga chinensis*; 5. *Cathaya argyrophylla*; 6. *Picea abies*; 7. *Larix sibirica*; 8. *Pseudolarix amabilis*; 9. *Cedrus deodara*; 10. *Pinus tabulaeformis*.

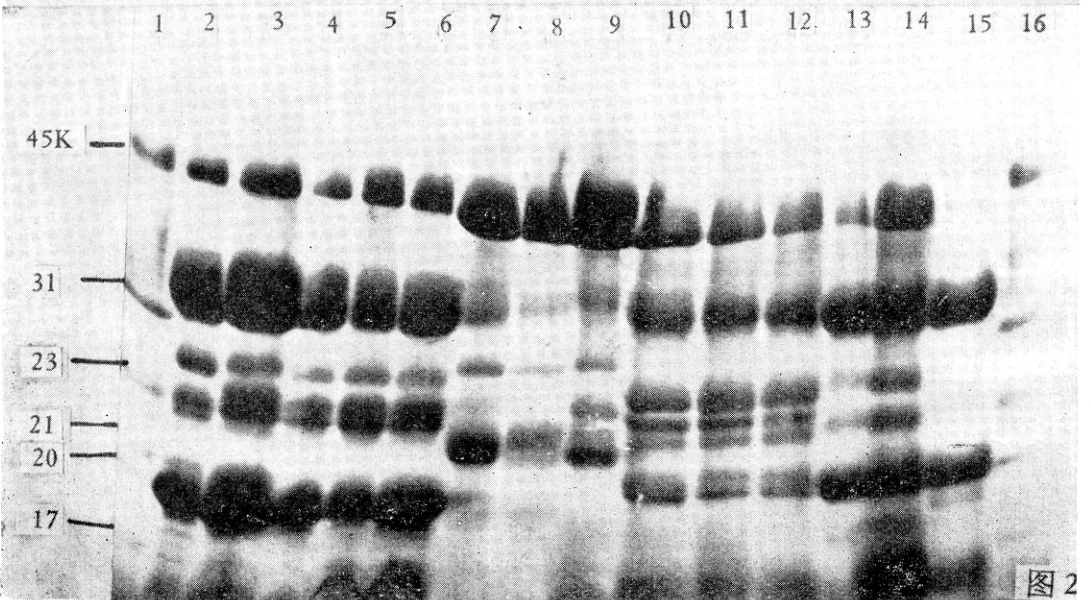
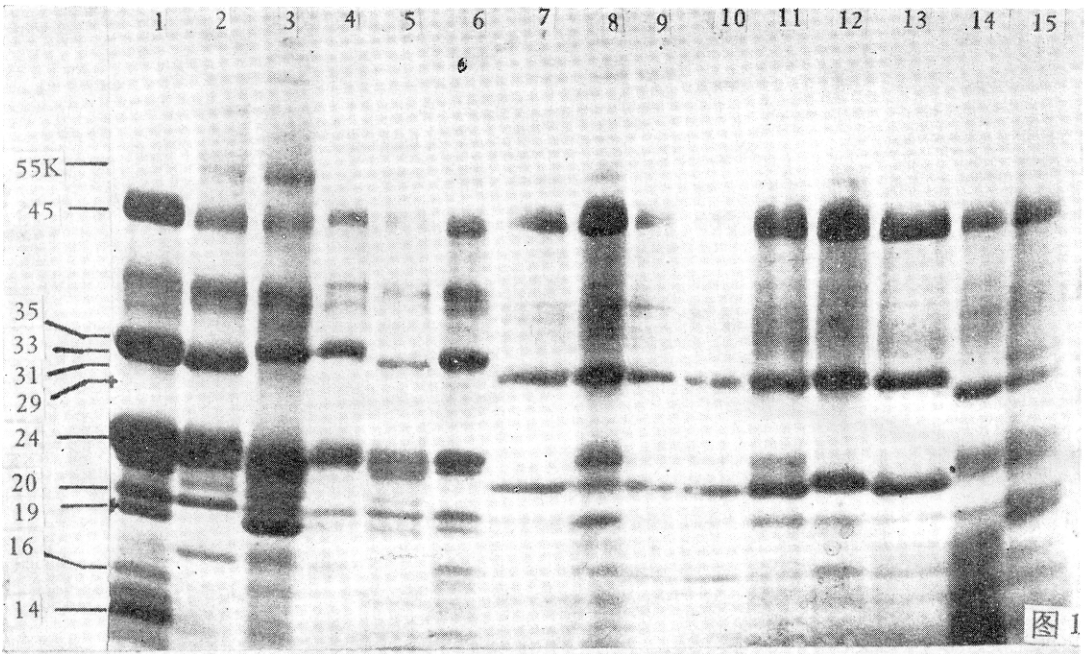


图 1 松属的种子蛋白多肽

Fig. 1 Seed protein Peptides of *Pinus*

1. *P. koraiensis*; 2. *P. armandi*; 3. *P. fenzliana*; 4. *P. monophylla*; 5. *P. strobus*; 6. *P. bungeana*; 7. *P. densiflora*; 8. *P. tabulaeformis*; 9. *P. yunnanensis*; 10. *P. qesiya*; 11. *P. massoniana*; 12. *P. nigra*; 13. *P. thunbergii*; 14. *P. ponderosa*; 15. *P. taeda*.

图 2 落叶松属、冷杉属和云杉属的种子蛋白多肽

Fig. 2 Seed protein peptides of *Larix*, *Abies* and *Picea*.

- 1, 16. *Pinus tabulaeformis*; 2. *Larix himalaica*; 3. *L. sibirica*; 4. *L. principis-rupprechtii*; 5. *L. gmelini*; 6. *L. olgensis*; 7. *Abies firma*; 8. *A. spectabilis*; 9. *A. concolor*; 10. *Picea retroflexa*; 11. *P. asperata*; 12. *P. koraiensis*; 13. *P. schrenkiana*; 14. *P. purpurea*; 15. *P. spinulosa*.