

基于 ITS 序列的蔷薇纲二十六个物种遗传多样性分析

欧立军, 孙海军

(怀化学院 生命科学系, 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室,
民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008)

摘 要:利用 ITS 序列对蔷薇纲的桔梗科、唇形科、菊科、豆科和蔷薇科 5 个科的 26 个物种进行了遗传多样性分析。结果表明:26 个物种的 ITS 序列全长为 580~815 bp, G+C 含量约为 60%; 基于 ITS 序列构建的系统树表明, 科内物种优先聚类, 桔梗科和唇形科优先聚类后再与菊科聚为 1 支, 豆科和蔷薇科为另 1 支。可见, ITS 可以将不同科的物种区分开来, 但对科间关系的确定存在一定局限性。因此, ITS 序列最好结合其它如形态学、结构学和其它分子标记等多种分析手段才能更加准确地分析科间亲缘关系。

关键词:科; ITS; 鉴定; 亲缘关系

中图分类号:S 336 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0094-03

经典植物分类学根据直观且丰富的形态特征研究分类群的特性, 建立了区别数十万种植物的演化体系, Takhtajan^[1]、Thorne^[2]、Dahlgren^[3]、Cronquist^[4] 和 Melchior^[5] 的系统是现行的五大被子植物系统, 但环境和发育阶段对形态影响较大, 加上不同分类系统对形态指标主观侧重不同, 因此得出的结果不同而产生了各种争议; 采用其它特征或性状如同工酶、花粉超微结构和特殊的内含物等进行分类, 又由于这些特征的标记数量有限, 其分类结果同样存在争议。吴征镒等^[6] 于 1998 年提出了 1 个被子植物的八纲系统的新方案, 包括木兰纲、樟纲、胡椒纲、石竹纲、百合纲、毛茛纲、金缕梅纲和蔷薇纲等 8 个纲, 但纲内的分类系统有待进一步研究。

近 20 a 来, DNA 序列已被广泛应用于植物各分类

阶元的系统学研究中, 基于各种分子数据的分析已成为植物系统学研究的常用手段。ITS (Internal transcribed spacers) 是高等植物细胞核中编码 18S、5.8S 和 26S rDNA 的 1 个转录单位, 是进化速度较快的中度保守序列, 且各重复单元间具有同步进化的特点。因此, ITS 已经成为在序列水平上探讨系统发育和进化研究的有效手段, 广泛应用于被子植物的科内如蔷薇纲的桔梗科^[7]、唇形科^[8]、菊科^[9]、豆科^[10] 和蔷薇科^[11] 等, 但少见应用于科间关系的报道。该试验对蔷薇纲的桔梗科 5 个物种、唇形科 3 个物种、菊科 6 个物种、豆科 6 个物种和蔷薇科 6 个物种等 26 个物种的 ITS 序列进行分析, 建立其分子鉴定标记, 探讨 ITS 序列在科间关系确定的有效性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

桔梗科的 5 个物种, 唇形科的 3 个物种, 菊科的 6 个物种, 豆科的 6 个物种和蔷薇科的 6 个物种。PCR 产物纯化采用生工生物工程(上海)有限公司的 DNA 纯化

第一作者简介:欧立军(1976-), 男, 湖南长沙人, 博士, 副教授, 研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: ou9572@126.com.

基金项目:湖南省高校科技创新团队支持计划资助项目(2010212); 湖南省“十二五”植物学重点建设学科资助项目(201142)。

收稿日期:2013-01-16

Abstract: Taking different parts of squama of the bulb scales of *Lilium dauricum* and *L. cernum* as explants, the effect of different sterilize method and different hormones composing and different parts of a squama on their adventitious bud induction and multiplication were studied. The results showed the bulb scales treated with 75% alcohol for 30 s followed by 30% 84 disinfectant for 15 min exhibited the best sterilization effect; the suitable medium for bulb induction of *L. dauricum* was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L; the optimum medium for adventitious bud proliferation was MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The suitable medium for bulb induction of *L. cernum* was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L, MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L was better for adventitious bud proliferation. The better sampling sites of explants were the base of the bulbs central scales.

Key words: *Lilium dauricum*; *Lilium cernum*; tissue culture

试剂盒。

1.2 试验方法

采取 CTAB 法进行 DNA 的提取。ITS 引物参考 White 等^[11], 采用 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 和 5'-GGAAGGTAAAAGTCAAGG-3', 反应体系包括 10× PCR buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 50 mmol/L 引物各 1 μL, DNA 40 ng, *Taq* DNA polymerase 0.4 μL, 补充双蒸水至 50 mL。反应程序为: 95℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 后延伸 10 min。纯化产物鉴定后双向测序, 重复 3 次。所得

序列采用 DNAMAN 和 MEGA 4 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列长度和 GC 含量分析

由表 1 可知, 26 个物种的 ITS 全长为 580~815 bp, G+C 含量约为 60%, 长度变化为 235 bp, GC 含量在 49.7%~66.2% 之间; 同时发现, 科内物种的 ITS 序列长度相近, 长度变化主要发生在科间, 且没有完全相同的 ITS 序列, 这表明 ITS 序列可以作为鉴定科内不同物种的分子标记。

表 1 ITS 长度和 GC 含量比较

Table 1 Length and GC content of ITS sequences of different species

科 Families	物种 Species	ITS		科 Families	物种 Species	ITS	
		长度 Length/ bp	GC 含量 GC content/ %			长度 Length/ bp	GC 含量 GC content/ %
唇形科	藿香	580	63.5	菊科	千里光	726	49.7
	薄荷	723	62.5		狭苞橐吾	642	52.2
	一串红	617	63.3		小蓟	729	56.8
豆科	刺槐	616	54.4	蔷薇科	羊耳菊	709	50.2
	合欢	624	62.5		一枝黄花	630	52.0
	黄芪	603	53.1		泽兰	665	54.6
	山合欢	598	63.3		红果树	590	65.8
	云实	704	57.2		枇杷	595	64.0
桔梗科	紫荆	613	57.6		山莓	698	54.0
	风铃草	782	58.5		山楂	632	58.9
	桔梗	815	56.1		委陵菜	621	60.4
	党参	758	59.2		绣线菊	642	64.9
	半边莲	616	62.5				
	南沙参	793	56.5				

2.2 不同科 ITS 序列信息位点分析

从表 2 可以看出, 不同科存在一定数量的信息位点, 其中桔梗科、菊科和蔷薇科信息位点较多, 存在 17 个

信息位点, 唇形科和豆科较少, 分别有 11 个和 3 个信息位点; 信息位点主要以单核苷酸多态性(SNP)为主, 这些位点可以作为鉴定不同科的分子标记。

表 2 不同科的 ITS 信息位点

Table 2 Informative sites of different families

科 Families	ITS 信息位点 Informative sites of ITS															
	64	68	84	89~90	93	101	107	162	279	308	544	600	683	732	736	741
菊科	64	68	84	89~90	93	101	107	162	279	308	544	600	683	732	736	741
C	A	C	A C	G	A	G	C	T	C	G	G	G	A	G	C	T
桔梗科	141	211	263	283	305	535	537	539	563	588	627	634~635	667	689	711	714
C	A	A	G	G	C	C	C	C	G	C	C	A C	A	C	G	C
唇形科	268	274	289	516	530	561	591	594	603	678	694					
G	C	C	C	C	G	C	G	C	C	G	G					
豆科	184	326	687													
G	C	T														
蔷薇科	66~67	74	77	80	83	88	134	163	202	207	328	527	532	546	673	691
G C	G	C	G	C	A	C	G	C	C	G	T	C	C	G	T	C

2.3 基于 ITS 序列的系统树

根据 ITS 序列构建得到的 5 个科 26 个物种的系统树发现, 科内物种优先聚类; 5 个科在系统树中被分为两大支, 桔梗科和唇形科优先聚类后与菊科聚为 1 支, 豆科和蔷薇科聚为另 1 支(图 1)。

3 讨论

按照吴征镒等^[6]的观点, 唇形科在八纲系统中是属

于蔷薇纲唇形亚纲下的唇形目, 桔梗科在八纲系统中是属于蔷薇纲菊亚纲下的桔梗目, 而菊科在八纲系统中是属于蔷薇纲菊亚纲下的菊目, 因此, 桔梗科与菊科在亲缘关系上更近。且桔梗科和唇形科这 2 个科的植物确实在形态学上有很多相同特点, 例如都为草本植物, 叶均为单叶, 且无托叶。花两性, 辐射对称或两侧对称, 花萼均为 5 裂, 花粉近球形、长球形至扁球形。该研究结果表明, 桔梗科和唇形科优先聚类后再与菊科聚类, 这

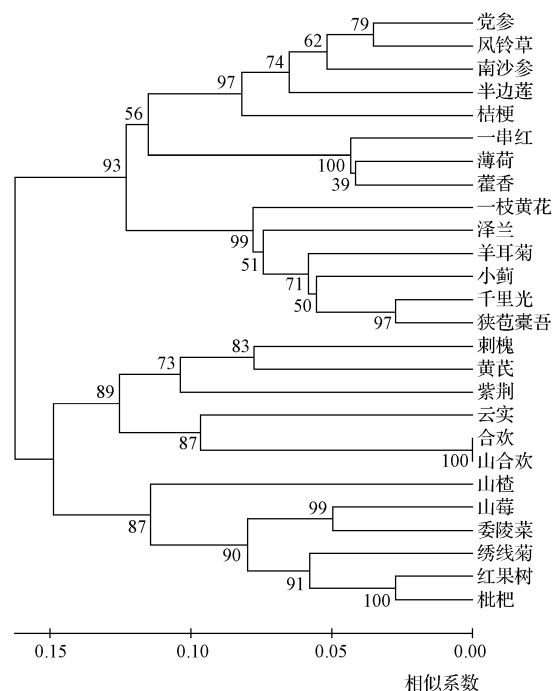


图1 基于ITS序列构建的蔷薇纲下桔梗科等5个科植物的系统树

Fig. 1 Dendrogram of different families based on ITS sequences 意味着桔梗科和唇形科关系更近,这与吴征镒等^[6]的被子植物八纲系统和基于形态学的分类系统不一致,这说明ITS序列在揭示科间的亲缘关系上存在一定的局限性,这可能与不同植物的ITS序列进化速率不一致,且1个片段长度有限的序列无法提供足够的信息位点有关^[12]。因此,ITS序列可以作为物种鉴定有效的分子标

记,但判断科间亲缘关系时最好结合其它如形态学、结构学和其它分子标记等多种分析手段。

参考文献

- [1] Takhtajan A. Diversity and classification of flowering plants[M]. New York: Columbia University Press, 1997.
- [2] Thorne R F. Classification and geography of the flowering plants[J]. Botanical Review, 1992, 58: 225-348.
- [3] Dahlgren G. An updated angiosperm classification[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1989, 100: 197-203.
- [4] Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants[M]. New York: The New York Botanical Garden, 1988.
- [5] Melchior H A. Engler's syllabus der pflanzenfamilien, zwolfte zuflage, II band, Angiospermen[M]. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1964.
- [6] 吴征镒, 汤彦承, 路安民, 等. 试论木兰植物门的一级分类—一个被子植物八纲系统的新方案[J]. 植物分类学报, 1998, 36(5): 385-402.
- [7] 葛颂, Schaal B A, 洪德元, 等. 用核糖体 DNA 的 ITS 序列探讨裂叶沙参的系统位置—兼论 ITS 片段在沙参属系统学研中的价值[J]. 植物分类学报, 1997, 35(5): 385-395.
- [8] 施苏华, 杜雅青, David B, 等. 用 cpDNA *matK* 基因和 nrDNA ITS 区序列确定我国特有植物四棱草属的系统位置[J]. 科学通报, 2003, 48(11): 1176-1180.
- [9] 杨中保, 刘春霞, 赵卫敬, 等. 灯盏花 rDNA ITS 序列测定及其在替代资源寻找中的意义[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2629-2632.
- [10] 高静. 基于 5.8S rDNA ITS 序列的内蒙古棘豆属植物分子系统学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2011.
- [11] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. In: Innes M, Gelfand D, Sninsky, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications, 1990: 315-322.
- [12] 郑小艳, 曹家树, 滕元文. DNA 序列分析在植物分子系统学研究中的应用现状—以蔷薇科为例[J]. 园艺学报, 2009, 36(12): 1827-1836.

Genetic Diversity Analysis of Twenty-six Species in Rose Class Based on ITS Sequences

OU Li-jun, SUN Hai-jun

(Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-western Medicinal Plant and Ethnobotany, Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Department of Life Science, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418008)

Abstract: The genetic analysis of 26 species including Campanulaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Leguminosae sp. and Rosaceae were studied using ITS sequences. The results showed that the ITS lengths of 26 species were from 580 bp to 815 bp and GC content was about 60%. Clustering results based ITS sequences showed the species from the same family were firstly clustered. Five families were divided into two branches that Campanulaceae, Lamiaceae and Asteraceae were a branch and the others were a branch. The results indicated different species from different families could be identified and the identification of familial relationships had some limitations by ITS sequences. In conclusion, ITS sequences would be combined with some analytical tools such as morphology, structure and others molecular techniques to accurately analyze familial relationships.

Key words: family; ITS sequences; identify; phylogenetic relationship