

中国不同地区杜仲 rDNA 的 ITS 序列分析

马玉花^{1,2}, 杨吉安¹, 贾万忠², 冶贵生¹

(1. 西北农林科技大学, 陕西 杨陵 712100; 2. 中国农科院兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046)

摘要:运用克隆测序法,对分布于中国不同地区的杜仲(*Eucommia ulmoides*)的核糖体 DNA 的 ITS 区(包括 ITS-1, 5.8S 和 ITS-2)进行测定。结果表明,杜仲植物的 ITS 区序列总长度为 587-589 bp,长度变异仅为 2 bp,其中 ITS-1 区为 218~219 bp,在 ITS-2 区为 205~206 bp,5.8S rDNA 均为 164 bp,且高度保守,无变异位点。采用 DNASTAR 软件进行系统发育分析表明,来自不同地区的杜仲样品同源性均在 96.9% 以上。根据 ITS 序列特征构建的系统树,来自同一地区的样品并不一定处于同一分组,而来自不同地区的样品也可能属于同一分组;另外它们的聚类结果与其根据叶型分类的情况也不一致。因而认为只有把杜仲的遗传变异与其它方面的证据和特征相结合,进行深入的研究,才能最终确定它们的合理的系统发育关系。

关键词:杜仲; ITS 区; ITS-1; ITS-2; 5.8S rDNA

中图分类号:Q949.751.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2004)04-0016-04

Sequence Analysis of ITS of Nuclear Ribosomal DNA(nr DNA) of *Eucommia ulmoides* from Different Geographical Origin in China

MA Yu-hua^{1,2}, YANG Ji-an¹, JIA Wan-zhong², YE Gui-sheng¹

万方数据

(1. NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Lanzhou Veterinary Research Institute of CAAS, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: The sequence of the ITS (including ITS-1, 5.8S rDNA and ITS-2) of nuclear ribosomal DNA from 15 species of *Eucommia ulmoides* from different areas of China were determined. The results showed that the size of the ITS of *E. ulmoides* was from 587 to 589 bp (ITS-1 from 218 to 219 bp, ITS-2 is from 205 to 206 bp), and the length variation was only 2 bp. The length of 5.8S rDNA was 164 bp. It's very conservative in these species and they had no variable site. On the basis of phylogenetic analysis of nucleotide sequences, the identity of *E. ulmoides* from different areas was above 96.9%. Phylogram tree based on ITS sequence data indicated that the samples from same region was not always clustered, and the samples from different regions may be in same section. This is not corresponding to the result that determined by the shape of leaf. Therefore, the rational phylogenetic relationship could be determined through associated these ITS data with other evidence.

Key words: *Eucommia ulmoides*; ITS region; ITS-1; ITS-2; 5.8S rDNA

杜仲(*Eucommia ulmoides*)雌雄异株,属落叶乔木,是杜仲科杜仲属仅存的孑遗植物,为我国特有的珍稀濒危第二类保护植物,是贵重的中药材和工业橡胶原料树种,主要分布于秦岭以南的山地。杜仲不仅具有很高的经济价值,而且对于研究被子植物系统演化以及中国植物区系的起源等诸多方面具有

极为重要的科学价值。

近年来,随着分子生物学技术的迅速发展,分子生物学技术如 RAPD, RFLP, CAPS, SSLPs, SNPs 等技术为分子系统学的研究提供了可靠的分子标记资料,其中核糖体 DNA(即 nr DNA)ITS 区(包括 ITS-1, 5.8S 和 ITS-2)序列已被广泛的用于植物属内、

收稿日期:2004-03-23

基金项目:国家“十五”科技攻关项目“杜仲生物活性成分分析及产业化技术研究”

作者简介:马玉花(1978-),女,回族,青海西宁人,硕士,主要从事植物分子生物学研究。

近缘属间等的系统发育分析^[1-6]。而对于杜仲,以往研究大都以树皮特征、叶片、枝条变异和果实类型等形态特征的差异来划分类型,而从遗传本质对杜仲进行在分类学鉴定及真伪品的鉴别等方面的研究,除了陈月琴等对杜仲原植物 25S rDNA 5' 端序列进行测定^[7],并根据序列中的核苷酸的变化为中药杜仲真伪品的鉴定提供了分子水平的资料外,其他分子鉴定方面的研究尚未见报道。在本研究中,测定了 15 个来自不同地区杜仲品系的 rDNA ITS 区

序列,并对其差异性进行了分析,旨在对分布于我国不同地区杜仲的分类鉴别提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

15 个样品均经引种栽培于西北农林科技大学树木园(表 1)。采集单株植物幼嫩叶片,立即放入液氮罐,带回实验室后置于-70℃冰箱中保存待用。

表 1 材料来源及其特征

Table 1 The origin of materials and their information

试 样	G1	G2	G3	I9	I11	I23	I27	I33	I41	I45	I49	Q9	X11	X18	Y2
产 地	四川	四川	四川	陕西	陕西	陕西	陕西	陕西	陕西	陕西	陕西	贵州	湖南	湖南	杨凌
叶 型	E	O	O	O	E	O	O	O	E	E	E	O	E	O	O
树皮类型	光皮	光皮	光皮	光皮	光皮	粗皮	光皮	光皮	光皮	粗皮	光皮	光皮	光皮	光皮	光皮

注:叶型中 E 代表椭圆形,O 代表卵型

1.2 DNA 提取

总 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法。取 2~3 片保存的叶片于研钵中,加液氮研成粉,分装于 1.5 mL eppendorf 管中,加入 65℃ 预热的 CTAB 提取液 1 mL,摇匀,置 60℃ 水浴 2~3 h,其间上下颠倒几次,离心 15 min,取上清液,加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混匀,离心 10 min,取上清液,再用等体积的氯仿-异戊醇(24:1)抽提 1 次,离心 10 min,取上清液,加入 2~2.5 倍无水乙醇,-20℃ 过夜沉淀 DNA,70% 乙醇洗 2 次,37℃ 烘干,加入 30 μL 含 RNase 的 TE 溶解 DNA,37℃ 水浴消化 RNA。

1.3 引物设计

扩增引物是根据被子植物 18S rDNA3 端和 25S rDNA5 端设计的通用引物。它们分别为上游引物 ITS1(GTC GTA ACA AGG TGA ACC TG)和下游引物 ITS2(ATA CGA ATT TAA GTC GCC CAT CA)。

1.4 核糖体 DNA ITS 片段扩增及 PCR 产物纯化

50 μL 反应体系中含 5 μL 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ free),4 μL MgCl₂,2 μL dNTP,1 μL ITS1 (50 pmol/μL),1 μL ITS2(50 pmol/μL),0.5 μL Taq DNA 聚合酶(5U/μL),36.5 μL H₂O。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min 后进入下列循环:94℃ 变性 1 min,54℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环后 72℃ 延伸 10 min,扩增反应在 DNA Thermal Cycler 2400(PE 公司,USA)上进行。

PCR 产物采用 TaKaRa 公司的凝胶回收试剂盒进行纯化。

1.5 扩增片段重组,转化及阳性克隆鉴定

取适量纯化回收的 DNA 加入 PMD18-T 载体与

连接液,16℃ 连接 3 h。取上述连接产物转化新鲜制备的感受态细菌 JM109,培养过夜后挑取白色菌落培养,少量提取质粒。重组质粒的提取采用碱裂解法进行,提取的重组质粒分别进行 Bam I 和 Hind III 双酶切鉴定和 PCR 鉴定。

1.6 ITS 序列测定和系统树的构建

ITS 序列由宝生物工程(大连)有限公司完成。ITS-1 及 ITS-2 的范围根据水稻 rDNA 序列确定。用 DNASTAR 软件对序列进行对位排列,然后手工适当校正。得到的序列用 MEGA 软件进行系统发育分析。以 Clustal 方法构建系统发生树。

2 结果与分析

共测定了 15 个来自不同地区的杜仲样品的 ITS-1,5.8S rDNA 和 ITS-2 全序列及 18S rRNA 基因 3' 端和 25S rRNA 基因 5' 端部分碱基序列,共约 680 bp。杜仲不同品系的 ITS 区序列长度为 587~589 bp,长度变异不大(仅相差 2 bp),其中 ITS-1 区为 218~219 bp,在 ITS-2 区为 205~206 bp。5.8S rDNA 在杜仲不同品系间高度保守,其长度完全一致,均为 164 bp,且无变异位点。G+C 含量在 ITS-1 区的变化范围为 63.93%~65.74%,在 ITS-2 区为 65.69%~66.67%,ITS 区(包括 ITS-1,5.8S 和 ITS-2)为 62.76%~63.42%。ITS-1 区的变异位点有 12 个,ITS-2 区有 11 个。信息位点在 ITS-1 区有 4 个,在 ITS-2 区有 3 个。碱基的变异类型有 T-C 转换,A-G 转换以及碱基的插入。DNASTAR 软件分析得到 15 个样品的 ITS 序列间的同源性和差异性(表 2)及系统树(图 1)。

表2 杜仲 15 个品系 ITS 序列间的同源性及其差异性

Table 2 Identity and divergence of nrDNA sequences among 15 species of *E. ulmoides*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. G1	—	100	99.1	99.0	97.8	96.9	98.0	98.1	98.1	96.9	98.1	98.1	98.0	99.0	98.8
2. G2	0.0	—	99.1	99.0	97.8	96.9	98.0	98.1	98.1	96.9	98.1	98.1	98.0	99.0	98.8
3. G3	0.0	0.0	—	98.0	98.6	97.8	98.8	99.0	99.0	97.8	99.0	99.0	98.8	98.0	97.8
4. L9	0.2	0.2	0.2	—	98.8	97.6	99.0	99.1	99.1	97.6	99.1	99.1	99.0	100	99.8
5. L11	0.5	0.5	0.5	0.3	—	98.6	99.8	99.7	99.7	98.6	99.7	99.7	99.8	98.8	98.6
6. L23	0.3	0.3	0.3	0.5	0.5	—	98.8	98.6	98.6	100	98.6	98.6	98.5	97.6	97.4
7. L27	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	—	99.8	99.8	98.8	99.8	99.8	99.7	99.0	98.8
8. L33	0.2	0.2	0.2	0.0	0.3	0.5	0.2	—	100	98.6	100	100	99.8	99.1	99.0
9. L41	0.2	0.2	0.2	0.0	0.3	0.5	0.2	0.0	—	98.6	100	100	99.8	99.1	99.0
10. L45	0.3	0.3	0.3	0.5	0.5	0.0	0.3	0.5	0.5	—	98.6	98.6	98.5	97.6	97.4
11. L49	0.2	0.2	0.2	0.0	0.3	0.5	0.2	0.0	0.0	0.5	—	100	99.8	99.1	99.0
12. Q9	0.2	0.2	0.2	0.0	0.3	0.5	0.2	0.0	0.0	0.5	0.0	—	99.8	99.1	99.0
13. X11	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.7	0.3	0.2	0.2	0.7	0.2	0.2	—	99.0	98.8
14. X18	0.2	0.2	0.2	0.0	0.3	0.5	0.2	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.2	—	99.8
15. Y2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.5	0.7	0.3	0.2	0.2	0.7	0.2	0.2	0.3	0.2	—

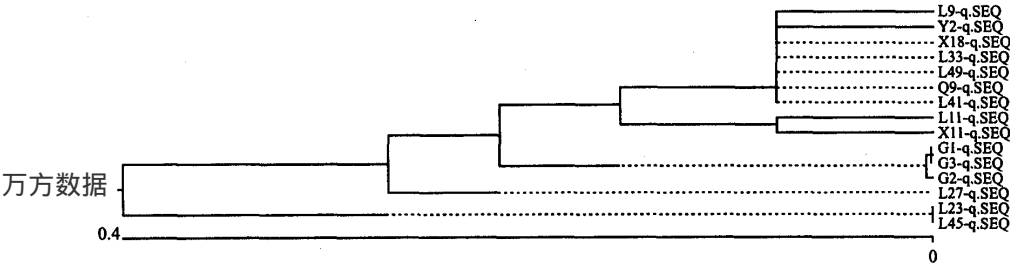


图1 基于 ITS 序列分析构建的系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on sequence analysis of ITS

3 结论与讨论

3.1 ITS 及 5.8S rDNA 序列在杜仲植物系统学研究中的价值

近年来,随着分子生物学技术的发展,植物 DNA 序列由于进化速率上的差异而被广泛的用于不同分类阶元的系统发育研究。其中核糖体 DNA ITS 区中 ITS 因其基因片段短,扩增和测序容易而越来越广泛的用于分类学研究,而其在被子植物中既有核苷酸序列的高度变异又有长度上的保守性,也使其序列很容易在近缘类群间排序,另外其丰富的变异还可在较低的分类阶元(属间、种间及种下等级)解决植物系统发育问题。国内外大量研究表明 ITS 区序列在探讨古老原始的被子植物科内系统发育关系,揭示被子植物的起源与进化历程中具有非常重要的意义^[8-11];另外,ITS 序列在探讨属下等级及种、种下水平的系统进化关系及种系关系,甚至在讨论居群间的关系时,也体现了应有的价值^[12-16]。

杜仲虽然是单科单属植物,但存活在中国的杜仲由于经历了几千年的生物的演替,环境的变迁,而引起了变异,这种变异使杜仲积累了极其丰富的遗传潜力,有着广泛的遗传基础,形成了不同的自然类型。本研究表明,在不同地区杜仲植物中 ITS-1 和 ITS-2 的变异位点共 23 个(5.41%),信息位点 7 个(1.65%),且变异位点稳定,5.8S rDNA 在杜仲不同品系间高度保守,其长度完全一致,均为 164 bp,且无变异位点。由此可见,虽然杜仲样品的 ITS 区序列虽然信息位点不是很高,但其 ITS 及 5.8S rDNA 的序列分析资料为杜仲种的鉴别及该科的分类方面提供了新的手段,所得的 ITS 区序列为杜仲的分子标记的确定提供了依据,说明核糖体 DNA ITS 区序列用于杜仲的分子鉴定是可行的。

3.2 不同分布区杜仲的亲缘关系

从表 1 可以看出,杜仲 15 个样品间的同源性均在 96.9% 以上,差异性均在 0.0~0.7 间。其中 G1 与 G2,L9 与 X18,L23 与 L45,L33 与 L41、L49、Q9 4

个样品间的 ITS 区序列完全一致,没有变异,说明它们虽然是来自不同地区的样品,但外界环境的不同并没有引起碱基序列的变异。通过序列比较分析发现,15 个样品间的 ITS-1 及 ITS-2 的碱基序列存在一定的变异,且变异位点稳定,变异主要为 68 位的插入 C、73 位的 T 取代 C、136 位的插入 T、151 位及 405 位的 C 取代 T、414 位的 G 取代 A、580 位的插入 C。而 5.8S rDNA 在杜仲不同品系间高度保守,其长度完全一致,且无变异位点。结合系统发生树,所有样品间的最大遗传距离为 0.4,这些都说明不同分布区的杜仲间的变异很小,它们的变异只是种内变异的一种形式,是种类在形态上、生理上或性状上的差异,是不超过一个种的范围内的变异,即类型,不足以划分种下等级。同时也再次说明 ITS 序列不仅适用于较高分类等级的系统学研究,也能反应种内变异及多态性。

从形态特征来看,不同分布地的杜仲可以按树皮特征可分为两大类,即光皮型和粗皮型,按叶型分为 O 型(卵型)和 E 型(椭圆形)^[17]。根据系统发生树,所研究的 15 个样品的聚类情况与根据它们的树皮特征分类的结果是一致的,即粗皮型的 L23、L45 聚为一类,而光皮型的样品首先由来自四川的 G1、G3、G3-3 个样品聚为一支, L11 和 X11 聚类后与聚成一类的 L9、Y2、X18、L33、L49、Q9、L41 聚类,这两组聚类后与 L27 聚成一支,最后再与粗皮型的 L23、L45 聚类。但是该结果与按叶型分类的结果并不一致,如叶型为 E 型的 L41、L49 与 L11、X11、G1 并没有首先聚成一支,而叶型为 O 型的 L9、X18、L33、Q9、与 G2、G3、L27 在聚类树上也没有首先聚类,因而认为叶型为 O 型还是 E 型可能只是数量性状,而不是可以作为分类依据的质量性状,因此这一特征在杜仲种内并不足以成为分类的主要区别特征。另外,系统发生树上来自同一地区的样品即 L9、L33、L41、L49 与 L11、L23、L27、X11 与 X18 并不一定处于同一分组或首先聚类;而来自不同地区的样品即 Y2、Q9、X18 与 L9、L33、L41、L49 也能处于一组,这是由于人为对资源的破坏,在我国已无天然分布的杜仲林,均是经过人工栽培的杜仲林,因而处于同一分布区的杜仲林可能是来自不同地区的样品,而不同分布区的杜仲林也可能是由同一地区的杜仲经栽培而来的。因而杜仲的遗传变异只有进一步与其它方面的证据相结合,进行深入的研究,才能最终确定它们的合理的亲缘关系。

参考文献:

- [1] 张再元. 河南省杜仲种质资源研究[J]. 经济林研究, 1991, 9(1): 80-83.
- [2] 周政贤. 我国杜仲的类型、分布和引种[J]. 林业科学, 1980, 16(10): 增刊: 84-90.
- [3] 杜红岩. 我国杜仲变异类型研究[J]. 经济林研究, 1997, 15(3): 34-36.
- [4] Sang T, Crawford D J, Sturss T F. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6813-6817.
- [5] Baldwin B G, Sanderson M J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny[J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1995, 82: 247-277.
- [6] Campbell C S, Donoghue M J, Baldwin B G. Phylogenetic relationships in Maloideae (Rosaceae): Evidence from sequences of internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and congruence with morphology[J]. *Amer J Bot*, 1995, 82(7): 903-918.
- [7] 陈月琴. 杜仲原植物 25S rDNA 5' 端序列分析及其分子识别[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(12): 707-709.
- [8] Suh Y, Thien L B, Reeve H E, et al. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae[J]. *Amer J Bot*, 1993, 80(9): 1042-1055.
- [9] 汪小全. 铁破锣属的系统位置—ITS(nr DNA)序列证据[J]. 植物分类学报, 1998, 36(5): 403-410.
- [10] 李建华, Bogle A L, Klein A S, et al. 金缕梅科银缕梅属与帕罗堤属的亲缘关系——核糖体 DNA ITS 序列证据[J]. 植物分类学报, 1997, 35(6): 481-493.
- [11] 施苏华. 四药门花属及其近缘植物 ITS 区序列分析和系统学意义[J]. 云南植物研究, 1999, 21(2): 87-95.
- [12] Alice L A, Campbell C S. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences[J]. *Amer J Bot*, 1999, 86(1): 81-97.
- [13] Steane D A, Scotland R W, Mabberley D J, et al. Molecular systematics of *Clerodendrum* (Lamiaceae): ITS sequences and total evidence[J]. *Amer J Bot*, 1999, 86(1): 98-107.
- [14] Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier M F, et al. Molecular phylogeny of the Genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution[J]. *Mol Biol Evol*, 1998, 15(3): 345-354.
- [15] 蔡金娜. 中国不同地区蛇床的 rDNA ITS 序列分析[J]. 药学报, 2000, 35(1): 56-59.
- [16] 马小军. 野山参与栽培山参 rDNA 内转录间隔区(ITS) 序列比较[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(4): 206-209.
- [17] 张康健. 中国杜仲优良品种选育[M]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学出版社, 2001.