

# 胡枝子属植物 ITS 序列研究与系统发育分析

王秀荣<sup>1</sup>, 赵 杨<sup>1</sup>, 骈瑞琪<sup>2</sup>, 陈晓阳<sup>2\*</sup>

(1. 贵州大学 林学院, 贵州 贵阳 550025, 2. 北京林业大学, 北京 100083)

**摘 要:**用 PCR 产物直接测序法对 10 种胡枝子属植物和 1 个外类群的 ITS 序列进行了测定。结果表明, 10 种胡枝子 ITS 序列全长在 612~622 bp 之间, 其中 ITS1 长度在 243~228 bp 之间, 变异较大, ITS2 长度在 215~220 bp, 5.8S 的长度均为 165 bp, 比较保守。序列比对结果发现有 76 个变异位点, 占比对序列长度的 11.93%。构建了胡枝子属植物 ITS 序列的系统发育树, 并探讨了参试胡枝子种质的亲缘关系。

**关键词:**胡枝子属; ITS 序列; 系统发育

中图分类号: Q949.751.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-7461(2008)05-0070-04

## Phylogenetic Relationship of Genus *Lespedeza* by ITS Sequence Data

WANG Xiu-rong<sup>1</sup>, ZHAO Yang<sup>1</sup>, PIAN Rui-qi<sup>2</sup>, CHEN Xiao-yang<sup>2\*</sup>

(1. Forestry College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550225, China; 2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** ITS sequences of ten kinds of 10s plants of *Lespedeza* and an outgroup were obtained by primer design PCR, sequencing and cluster analysis. The results showed that ITS1 section length was 228~243 bp 5.8S sequence length was 165 bp which was too conservative, and the ITS2 section length varied from 215 bp to 220 bp and the conservative sites occupied 88.1%. Phylogenetic analysis of ITS sequences using PAUP 4.0 software and their genetic relationship was discussed

**Key words:** *Lespedeza* Michx; internal transcribed spacer(ITS); phylogeny

豆科(Leguminosae)胡枝子属(*Lespedeza*)多数植物分布广泛, 具有耐干旱、耐贫瘠、耐寒冷、耐热、耐酸、耐刈割等优良特性, 是荒山荒地造林的先锋树种, 可用作饲料、水土保持和土壤改良、薪炭林、蜜源植物及作为药用。由于胡枝子属植物形态多变和种间相似, 形态分类较为复杂, 因此不同文献对该属的种估计数目不一, 在 40~100 种之间。目前, 对该属植物的研究主要采用经典分类方法, 以形态特征和生态分布为依据; 虽然有一些细胞遗传学<sup>[1-2]</sup>、粉学方面<sup>[3-5]</sup>和同工酶<sup>[6]</sup>的研究报道, 但与系统演化的联系颇少, 难以反映分类群之间的系统发育和亲缘关系。

内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)位于 18S 和 26S rRNA 基因之间, 被 5.8S rRNA 基因分为 2 段, 即 ITS1 和 ITS2。ITS 在核

基因组中是高度重复的, 而且通过不等交换和基因转换, 这些重复单位间已发生了位点内或位点间的同步进化, 即不同的 ITS 拷贝间的序列趋于相近或完全一致。ITS 区进化速率较快, 可以提供较丰富的变异位点和信息位点, 已证实它是研究许多被子植物类群系统与进化的重要分子标记, 近年来由于其能很好地反映科内、属间及种间的亲缘而被广泛应用于植物的系统演化及亲缘关系的研究<sup>[7-9]</sup>。

本研究采用 ITS 序列产物直接测序方法, 对分布于中国的部分胡枝子属植物进行分析, 从 DNA 分子水平上探讨胡枝子属内种间亲缘关系, 以期为该属植物的系统演化途径的研究、种质资源的分子评价、鉴定及分类提供依据, 为种质资源的合理利用和遗传改良提供理论基础。

收稿日期: 2008-03-11 修回日期: 2008-04-23  
基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2002AA241111); 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(Z073224)。  
作者简介: 王秀荣, 女, 硕士, 主要从事林木遗传育种教学与研究。E-mail: wxr7211@126.com  
\* 通讯作者: 陈晓阳, 教授, 博导。E-mail: xychen@bjfu.edu.cn

# 1 材料与方法

## 1.1 材料来源

试验材料及来源见表 1, 包括大胡枝子组 3 种、胡枝子组 7 种和作为外类群的杭子稍属植物杭子稍。

表 1 试验材料及来源  
Table 1 The sources of materials

编号	种名	来源	备注
1	二色胡枝子 ( <i>L. bicolor</i> )	河北平山	大胡枝子组
2	短梗胡枝子 ( <i>L. cyrtobotrya</i> )	辽宁海城	大胡枝子组
3	美丽胡枝子 ( <i>L. formosa</i> )	江西庐山	大胡枝子组
4	达乌里胡枝子 ( <i>L. daurica</i> )	内蒙古赤峰	胡枝子组
5	阴山胡枝子 ( <i>L. inschanica</i> )	甘肃平凉	胡枝子组
6	牛枝子 ( <i>L. potaninii</i> )	宁夏盐池	胡枝子组
7	截叶胡枝子 ( <i>L. cuneata</i> )	甘肃天水	胡枝子组
8	多花胡枝子 ( <i>L. floribunda</i> )	山东烟台	胡枝子组
9	短叶胡枝子 ( <i>L. mucronata</i> )	山东烟台	胡枝子组
10	绒毛胡枝子 ( <i>L. tomentosa</i> )	北京密云	胡枝子组
11	杭子稍 ( <i>Campylotropis macrocarpa</i> )	河南信阳	外类群

## 1.2 叶片总 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取植株的总 DNA, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 的质量, DNA 的浓度通过分光光度计测定, 用无菌水稀释至同一浓度备用。

## 1.3 ITS 序列的扩增、纯化和测序

PCR 扩增反应在 PE 公司的 9700 型 PCR 扩增仪上进行, 反应体系为 50  $\mu$ L, 内含: 双链 DNA 模板 (约 25 ng), dNTP (200  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), 正反引物分别为 2  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, Taq DNA 聚合酶 (1.5U), 10 $\times$  Buffer (200 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl; 100 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 200 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> KCl; 15 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>)。扩增反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s; 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。引物序列是 5'-

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', 5'-CCTC-CTCCGCTTATTGATATGC-3'。扩增片段包括 ITS 序列全长及 18S、26S 的部分序列, 扩增产物的纯化、测序均由北京擎科生物技术公司完成。

## 1.4 ITS 序列分析

ITS1 和 ITS2 序列范围根据所用引物以及豆科草木犀的相关序列 (Z97662 和 Z97687) 确定。所得序列采用 Clustal X version 1.83 进行排序。

# 2 结果与分析

## 2.1 胡枝子属植物 ITS 序列的长度及 G+C 含量

本试验采用 PCR 产物直接测序法对 10 个种胡枝子植物的 ITS 序列进行了测定, 其长度在 760 bp 左右 (图 1), G+C 含量见表 2, 胡枝子属植物 ITS1 长度在 228~243 bp 之间, 最大相差 15 bp, 平均约为 236 bp, 与豆科其他属相差不大<sup>[7]</sup>; 胡枝子属 5.8 S 完全一致, 均为 165 bp, 说明该区比较保守; 胡枝子属植物 ITS2 长度在 215~220 bp, 最大相差 5 bp, 平均为 216 bp; 10 种胡枝子 ITS 序列全长在 612 bp 到 622 bp 之间, G+C 的含量平均为 51%, 胡枝子属植物 ITS 序列长度和已报道的被子植物长度基本一致。

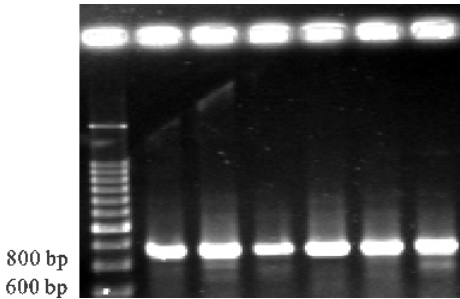


图 1 ITS 序列片段 PCR 扩增产物  
Fig. 1 Profile of PCR products of ITS region

表 2 10 种胡枝子属植物 ITS 序列的长度及 G+C 含量  
Table 2 Lengths(bp) and G+C contents of ITS sequences of 10 species of *Lespedeza*

种名	ITS-1		ITS-2		5.8S	ITS 序列全长 (含 5.8S)	
	长度/bp	G+C/%	长度/bp	G+C/%	长度/bp	长度/bp	G+C/%
短梗胡枝子 ( <i>L. cyrtobotrya</i> )	243	47.0	215	52.3	165	622	49.8
达乌里胡枝子 ( <i>L. daurica</i> )	239	50.5	216	54.3	165	619	52.0
二色胡枝子 ( <i>L. bicolor</i> )	241	49.7	215	51.8	165	620	50.0
美丽胡枝子 ( <i>L. formosa</i> )	241	47.7	216	51.1	165	621	49.8
多花胡枝子 ( <i>L. floribunda</i> )	230	49.5	218	52.5	165	613	50.8
短叶胡枝子 ( <i>L. mucronata</i> )	228	49.9	220	53.2	165	612	51.3
阴山胡枝子 ( <i>L. inschanica</i> )	239	50.9	215	54.0	165	618	52.2
牛枝子 ( <i>L. potaninii</i> )	239	50.5	215	54.0	165	618	52.0
绒毛胡枝子 ( <i>L. tomentosa</i> )	228	49.9	220	53.3	165	612	51.3
截叶胡枝子 ( <i>L. cuneata</i> )	228	50.4	216	53.8	165	618	52.1
平均	235.6	49.6	216.6	53.03	165	617.3	51.1

2.2 胡枝子属植物 ITS 序列聚类分析

Gap 作为缺失处理时,对排序后的结果用 PAUP4.0 软件对 637 个位点(characters)进行分析,其中稳定位点(constant characters)507 个,变异位点 76 个(包括 54 个信息位点),变异位点和信息位点分别占全序列的 11.93%和 8.48%。计算了 10 个样本间的遗传距离(表 3),采用 UPGMA 法进行了胡枝子 10 个种间的系统发育关系分析,构建了系统发育关系树(图 2)。最简约树长度为 158 步,一致性指数(consistency index, CI)和维持性指数

(restention index, RI)分别为 0.905 1 和 0.807 4。大于 0.9 的 CI 说明此系统树有较高的可信度。最大简约树用 bootstrap 分析各分支的支持强度,以杭子稍属的杭子稍作为外类群。结果显示,大胡枝子组的 3 种胡枝子聚为一类,具有 100%的强支持率,小胡枝子组的阴山胡枝子和牛枝子先聚在一起,再与达乌里胡枝子、截叶胡枝子聚为另一支,也有 99%的强支持率。两大分支之间通过由多花胡枝子、短叶胡枝子和绒毛胡枝子组成的另一分支联系在一起,并获得 76%的支持率。

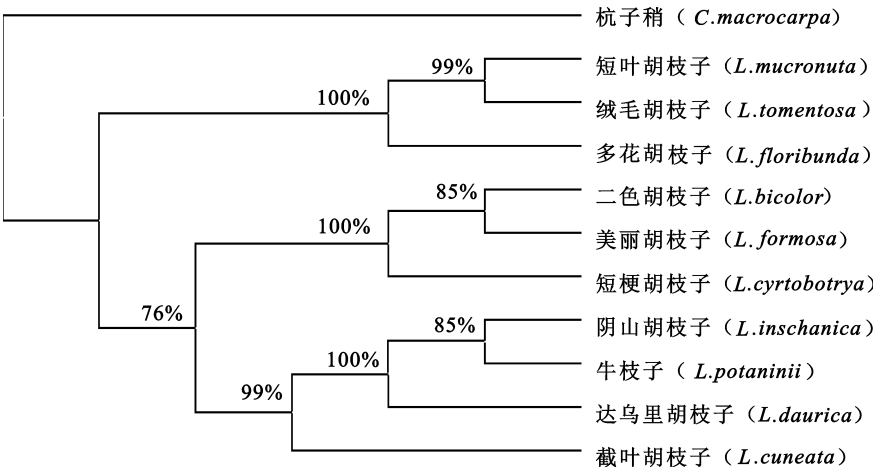


图 2 以最大相似距离法构建的胡枝子属 10 个近缘种 ITS 序列系统分支树

Fig. 2 Phylogenetic tree reconstructed using UPGMA with maximum likelihood distance based on ITS nucleotide sequence

表 3 胡枝子属 10 种植物及杭子稍 ITS 序列间的遗传距离

Table 3 Pairwise genetic distances of nrITS and 5.8s rDNA sequences of 10 species of Lespedeza and C. macrocarpa

编号	种名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>L. bicolor</i>	0.0000										
2	<i>L. formosa</i>	0.0081	0.0000									
3	<i>L. cyrtobotrya</i>	0.0306	0.0372	0.0000								
4	<i>L. mucronata</i>	0.0597	0.0682	0.0879	0.0000							
5	<i>L. tomentosa</i>	0.0547	0.0632	0.0828	0.0049	0.0000						
6	<i>L. floribunda</i>	0.0582	0.0634	0.0881	0.0197	0.0148	0.0000					
7	<i>L. daurica</i>	0.0642	0.0727	0.0884	0.0662	0.0629	0.0684	0.0000				
8	<i>L. pontaninii</i>	0.0623	0.0708	0.0865	0.0661	0.0612	0.0666	0.0016	0.0000			
9	<i>L. inschanica</i>	0.0625	0.0711	0.0852	0.0663	0.0614	0.0666	0.0032	0.0010	0.0000		
10	<i>L. cuneata</i>	0.0573	0.0658	0.0833	0.0679	0.0629	0.0699	0.0309	0.0292	0.0293	0.0000	
11	<i>L. macrocarpa</i>	0.1150	0.1220	0.1364	0.0102	0.0999	0.1054	0.1109	0.1107	0.1107	0.1144	0.0000

3 结论与讨论

胡枝子属植物分布区域较广,横跨太平洋形成东亚—北美洲间断分布,向北可达亚寒带,寒带边缘,向南可到澳大利亚。我国除新疆外,全国各省、区均有该属植物的分布。分布区地理生态因子的巨大差异使得该属植物形态变异很大,不同的学者对该属的种数估计的数目不一,在 40~100 种之间,相差较大。据《中国植物志》记载,分布于中国的胡枝子属植物共有 26 种,按有无闭锁花分为 2 组:无闭

锁花的为大胡枝子组,有 12 种。有闭锁花的为胡枝子组,有 14 种。从图 2 可以看出,10 种胡枝子并没有完全像传统的形态分类那样,按有无闭锁花而聚为 2 组,而首先是由大胡枝子组的二色胡枝子和美丽胡枝子聚在一起,然后再与短梗胡枝子聚为一组;在小胡枝子组,阴山胡枝子和牛枝子先聚在一起,然后再与达乌里胡枝子、截叶胡枝子聚为一组,而同为该组的多花胡枝子、短叶胡枝子和绒毛胡枝子并没有直接和它们聚在一起,而是独立出来,表现出与小胡枝子组其他 4 种胡枝子具有较远的亲缘关系,是

一个由低级向高级进化的中间类型,这一结果与利用 ISSR 分子标记研究的结果相似<sup>[10]</sup>。

红霞(2003)应用支序分析法<sup>[11]</sup>,利用胡枝子 28 个较为稳定可靠的形态形状,对分布在内蒙古的胡枝子属 12 个分类群的起源与演化关系进行了探讨,指出了分布在内蒙古的胡枝子属的系统发育顺序为短梗胡枝子→二色胡枝子→多花胡枝子→阴山胡枝子→尖叶胡枝子→长叶铁扫帚→绒毛胡枝子→达乌里胡枝子→牛枝子。多花胡枝子与二色胡枝子、短梗胡枝子亲缘关系很近,而在本试验中发现多花胡枝子与短梗胡枝子、二色胡枝子的亲缘关系还是较远的。

目前对胡枝子属植物的遗传多样性和亲缘关系的研究还刚刚开始,而且由于各研究者所用的材料和方法不同,所得到的胡枝子属系统发育顺序及种间亲缘关系,也并不一样,同时,研究所涉及的种类较少,研究的方法较单一,也难以较系统全面的评价胡枝子遗传多样性及亲缘关系,因此有必要采用一些新的方法,选取更多的种来对该属植物的遗传多样性及亲缘关系作更深入的研究,为胡枝子属的分类和系统发育研究提供理论依据。

参考文献:

(上接第 64 页)

[51] 张建峰,李吉跃,宋玉民,等.植物耐盐机理与耐盐植物选育研究进展[J].世界林业研究,2003,16(2):16-22.

[52] 刘凤华,郭岩,谷冬梅,等.转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J].遗传学报,1997,24(1):54-58.

[53] GAO M,SAKAMOTO A,MIURA K,et al. Transformation of Japanese persimmon(*Diospyros kaki* Thunb.) with a bacterial gene for choline oxidase [J]. Molecular Breeding,2000,6(5):501-510.

[54] GERVERA M,ORTEGA C,NAVARRO A,et al. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance to salinity gene HAL2 from yeast [J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology,2000,75(1):26-30.

[55] 王俊英,尹伟伦,夏新莉.胡杨锌指蛋白基因克隆及其结构分析[J].遗传,2005,27(2):238-245.

[56] 马丽.胡杨耐盐相关基因克隆及转化群众杨的研究[D].北京林业大学硕士学位论文,2005.

[57] 朱馨蕾,马艳,张富春.盐胁迫下胡杨 cDNA 文库的构建及其 nhx 基因的克隆[J].植物研究,2007,27(1):82-88.

[58] 李驹,陈维明.杨树耐盐细胞系的筛选及不定苗再生的研究[J].林业科技通讯,1984(1):1-3.

[59] 李玲,韩一凡.杨树耐盐突变体筛选的研究[J].林业科学,

[1] 夏亦莽.十种胡枝子的核型研究[J].中国草地,1989(3):17-19.

[2] 张义贤.胡枝子的核型研究[J].山西大学学报:自然科学版,1990,13(1):87-89.

[3] 黄普华.我国东北胡枝子属及其近缘属的花粉形态和分类研究[J].植物分类学报,1987,25(5):366-369.

[4] 孙京田.山东胡枝子属植物花粉形态研究及其在分类上的意义[J].山东师范大学学报:自然科学版,2001(2):190-193.

[5] 张玉兰.我国某些蜜源植物花粉形态研究[J].武汉植物研究,1994,9(4):317-320.

[6] 张吉宇,袁庆华,王彦荣,等.胡枝子属植物野生居群遗传多样性 RAPD 分析[J].草地学报,2006,14(3):214-218.

[7] JANET L, IVANA S. Christian Brochmann Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference[J]. Mol Phylogenet Evol, 2003,29(3):417-34.

[8] 赵卫国,潘乐,张志芳.桑属植物 ITS 序列研究与系统发育分析[J].蚕业科学,2004:30(1):11-14.

[9] GAO L M, ZHU L D, ZHANG C Q. Infrageneric and sectional relationships in the genus rhododendron (Ericaceae) inferred from ITS sequence data[J]. 植物学报,2002,44(11):1351-1356.

[10] 赵杨,陈晓阳,王秀荣,等.9 种胡枝子亲缘关系的 ISSR 分析[J].吉林林业科技,2006,35(3):1-4.

[11] 红霞.内蒙古胡枝子属(*Lespedeza* Michx.)植物的分类学研究[D].内蒙古师范大学硕士论文,2003.

1990,26(4):359-362.

[60] 张绮纹,张望东.群众杨 39 无性系耐盐悬浮细胞系的建立和体细胞变异完整植株的诱导[J].林业科学研究,1995,8(4):395-401.

[61] 李周岐,徐养福,郭军战.河北杨体细胞抗盐性突变体抗性稳定性研究[J].西北林学院学报,1997,12(2):80-84.

[62] 李周岐,郭军战,李建梅,等.河北杨体细胞抗盐性变异系的同工酶鉴定[J].西北林学院学报,1995,10(4):68-71.

[63] 李周岐,郭军战,刘西平,等.河北杨体细胞抗盐性突变体试管苗抗盐性测定[J].西北林学院学报,1996,11(4):94-97.

[64] 李周岐,周志华,郭军战,等.河北杨体细胞抗盐性突变体离体筛选的研究[J].西北林学院学报,1995,10(3):1-7.

[65] 杨秀平,翟梅枝,张凤云,等.河北杨体细胞抗盐性突变体 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 积累特性[J].西北林学院学报,2003,18(4):26-28.

[66] 王兴军,姚敦义.运用多步选择系统筛选木槿耐盐突变体[J].植物生理学通讯,1994,30(1):22-24.

[67] 王长泉,宋恒.杜鹃抗盐突变体的筛选[J].核农学报,2003,17(3):179-183.

[68] 高玉红,李云.植物离体培养筛选耐盐突变体的研究[J].核农学报,2004,18(6):448-452.