

Application of nrDNA-ITS Sequences in Plant Phylogeny and Evolution

Xihong Liu, Lei Zhang, Gang Li, Rui Qin, Hong Liu*

Engineering Research Centre for the Protection and Utilization of Bioresource in Ethnic Area of Southern China, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan
Email: *liuhong@mail.scuec.edu.cn

Received: Dec. 2nd, 2013; revised: Dec. 24th, 2013; accepted: Jan. 2nd, 2014

Copyright © 2014 Xihong Liu et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Xihong Liu et al. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

Abstract: The application of nuclear rDNA ITS sequences in plant phylogeny and evolution analysis was discussed in this paper. Nuclear rDNA is an important nuclear gene fragment, which had been widely used in phylogenetic studies. The internal transcribed spacer of nuclear rDNA was divided into ITS1 and ITS2 by 5.8S rDNA. The length of ITS1 ranges from 165 bp to 298 bp in angiosperms, and the length of ITS2 ranges from 177 bp to 266 bp. ITS sequence is relatively longer in gymnosperms. It much depends on the length of ITS1. As mutate quickly, ITS sequences are capable of providing many variable sites and informative sites, which has become an important molecular marker in plant systematic development and classification researches within low-order angiosperm categories. At the same time, it can prove important systematic information for exploring polyploidy reticulate evolution and allopolyploid origins.

Keywords: ITS Sequence; Phylogenetic Development; Angiosperm; Gymnosperm; Advanced Structure

nrDNA-ITS 区序列在植物系统与进化研究中的应用

刘锡红, 张磊, 李刚, 覃瑞, 刘虹*

中南民族大学生命科学院, 南方少数民族地区生物资源保护与综合利用工程中心, 武汉
Email: *liuhong@mail.scuec.edu.cn

收稿日期: 2013年12月2日; 修回日期: 2013年12月24日; 录用日期: 2014年1月2日

摘要: 本文就核 rDNA (nrDNA) 的 ITS 区序列在植物系统与进化研究中的应用进行了讨论。nrDNA 是植物系统发育研究中广泛应用的重要核基因片段。5.8S rDNA 把 nrDNA 的内转录间隔区分为 ITS1 和 ITS2 两部分。被子植物中 ITS1 的长度为 165~298 bp, ITS2 的长度为 177~266 bp; 裸子植物中 ITS 片段较长, 且其长度变化主要由 ITS1 的长度变异所致。由于 ITS 序列变异较快, 能够提供较丰富的变异位点和信息位点, 已成为被子植物较低分类阶元的系统发育和分类研究中的重要分子标记, 为探讨多倍体复合体网状进化关系, 异源多倍体的起源提供了重要的系统学信息。

关键词: ITS 序列; 系统发育; 裸子植物; 被子植物; 高级结构

*通讯作者。

1. 引言

植物系统进化一直是生物科学研究的重要内容,同时也是植物种质资源鉴定研究的重要领域,但由于基因组结构的复杂性,给研究带来了一定的困难。近年来,ITS 区在植物系统进化中得到越来越多的应用。由于 ITS 序列变异较快,能够提供较丰富的变异位点和信息位点,已成为被子植物较低分类阶元的系统发育和分类研究中的重要分子标记,也为探讨多倍体复合网状进化关系,异源多倍体的起源提供了重要的系统学信息^[1]。本文主要针对 ITS 序列的特殊性及其优点,对其基本结构、功能、应用、测序与二级结构预测展开了讨论。

研究表明,18S、rbcL 等编码基因及线粒体 DNA (mtDNA)一般适用于较高分类阶元甚至整个种子植物谱系间的系统发育的探讨,而 ITS 及叶绿体 DNA (cpDNA)的非编码区序列等因进化速率较快多用于较低分类阶元的系统关系研究。作为核糖体 DNA (rDNA)间隔序列的 ITS 序列在目前的研究中发现其在基因组中保持高度的一致性,并呈现一定的保守性。ITS 序列与中高度重复序列和非编码序列相比较,保守性较高;与编码基因序列相比,变异速度相对较快。根据以上的研究特点,可以推断出它们在进化上的一些关系。目前,这方面的研究在裸子植物和被子植物上得到广泛的应用。

目前对植种亲缘关系的研究方法有很多,例如杂交法。从整体上看,遗传多样性的研究方法从个体形态学水平、细胞学水平、生理生化水平发展到了分子水平,研究层次也随之深入^[1]。ITS 最初由 White 等利用真菌的 nrDNA 序列设计出通用的引物和扩增方法而引入系统学。因为 ITS 所具有的一系列特征而使它在系统学中被广泛应用^[2]。首先,ITS 和其它的核 rDNA (nrDNA)多基因家族成员一样,核染色体组中高度重复,成千上百的 nrDNA 拷贝以串联重复的方式排列在染色体的一个或多个位点上,便于扩增、克隆与测序。其次,nrDNA 基因家族有着快速的致同进化,从而促进染色体组重复单元之间,甚至是非同源染色体的 nrDNA 位点之间的一致性,这个特点对系统重建尤为重要。第三,ITS 片段的长度通常较短(在被子植物中小于 700 bp),两个间隔区的侧翼都是高度保守的序列,容易利用设计的通用引物对多数群体进行扩

增。

不同植物的基因组结构和功能存在差异,导致进化速率不同。在植物系统发育和进化的研究中,应用较为广泛的是核基因组和叶绿体基因组。其中核基因组进化的最快,约为叶绿体基因组的 2 倍。由于 cpDNA 的进化速率远不及 nDNA,从而限制其在较低分类阶元(如属、亚属)中的应用。因此,越来越多的研究者将注意力集中到 nDNA 中进化较快的 DNA 序列上,18S~26S 核核糖体 DNA 的内转录间隔区 ITS 正是符合要求的序列之一^[3]。因此,分析和研究不同植种的 ITS 序列,可以通过建立系统树的方法将不同的物种区分开来。

2. nrDNA 的 ITS 序列

2.1. 18S~26S nrDNA 结构特征

编码 rRNA 的 rDNA 成簇存在于染色体的核仁组织区中,是基因组 DNA 中的中等重复序列,构成有转录活性的基因家族。在植物基因组中,每个 rDNA 重复单位的长度约为 7.8 kb 到 18.5 kb,单倍体中的拷贝数约为 600~8500 个。每个 rDNA 重复序列由保守的编码区和可变的间隔区 IGS 构成。

rDNA 基本结构如图 1 所示,由 18SrDNA、5.8S rDNA、26S rDNA 和位于三者之间的内转录间隔区 ITS 组成,其中 ITS 被 5.8S 分为 ITS1 和 ITS2 两部分。ITS1、ITS2 分别位于 18S~5.8S、5.8S~26S rDNA 之间,而 18S、5.8S、26S rDNA 的序列非常保守,这样就可以用与它们序列互补的通用引物对 ITS 区进行 PCR 扩增和测序。PCR 扩增引物的设计非常重要,目前研究中所用引物多是根据 white 等设计的或对已发表的引物序列作适当调整(图 1)。

真核生物 rDNA 的编码区包括 18S、5.8S 和 28S rDNA (植物中为 26S rDNA),它们组成一个转录单元,产生一个 45S 的前体 RNA,45S 的前体 RNA 迅速折叠,形成茎环状二级结构,为加工前体转录本成为成熟 rRNA 及降解 ITS2 和 ITS2 部分为核苷酸的大分子复合物提供必要的识别、接触和作用的信号^[4-6]。外部转录间隔区(ETS)存在于 18S rDNA 基因的上游和 28S rDNA 基因的下游。ITS 和 ETS 中都包含有前体 rDNA 加工的信息,在 rRNA 成熟的过程中起着相当重要的作用^[7]。其中一个特异性的剪切就发生在 ITS2 序列内

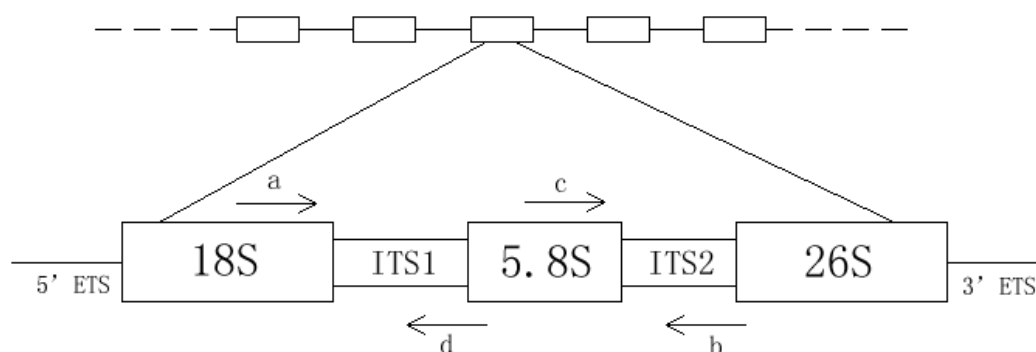


Figure 1. The structure of 18S-26S rDNA in plants

图 1. 植物 18S-26S rDNA 的基本结构, 箭头示 PCR 扩增和测序引物

部, 导致成熟的 5.8S3'端和大亚基 LSU5'端的最终形成。ITS 区和 ETS 区的转录产物均在 rRNA 成熟过程中被降解。它们的转录产物在加工过程中被剪切掉, 只是部分地对成熟起作用^[8]。在两段 ETS 之间的即是非转录区(NTS), 它们共同构成了 IGS, 使两个相邻的重复单位被隔开。IGS 含有多个重复序列, 有的序列可以为稳定的转录提供起始位点, 有的可以作为结核转录所需蛋白的启动子^[9]。这些重复序列的长度及重复次数都导致了 IGS 序列的长度不仅在种间、种内, 甚至在一个群体的不同个体间都是高度可变的。

高等植物中 nrDNA 是高度重复的串联序列单位, 18S、5.8S 和 26S 连接在一起, 共同作为一个转录单位, 又称顺反子。而 5S 则位于另外的位点上, 与 nrDNA 在染色体上的分布彼此独立。18S~26S rDNA 在植物上有一至数个位点, 高度重复(几百至几千次), 由于协同进化, 绝大多数物种内这些重复单位间已发生纯合或接近纯合。如果植物多倍化历史不长, 那么同步进化尚未使 rDNA 的重复单位发生一致化, 其 ITS 区就会具有很高的异质性, 这种现象在禾本科偃麦草等植物中已被证实存在。在自然界的植物尤其是多倍体植物进化中, 协同进化的现象很明显^[10]。多倍体植物 ITS 区的进化途径十分复杂, 祖先的 ITS 序列可能在后代中共存, 也可能只向一个方向进化^[11,12]。ITS 作为在分子生物学中的研究重点的同时, 也在种质资源鉴定中得到了大量的应用, 主要源于两个因素: 首先, ITS 在核基因组中高度重复, 并且通过基因转换和不等交换, 这些重复单位间已经发生了位点内和位点间的同步进化, 即不同 ITS 拷贝间的序列趋于相近或完全一致^[13]。即不同 ITS 拷贝间的序列趋于相

近或完全一致, 这就为对 PCR 产物直接进行测序奠定了理论基础^[14]。其次, ITS 序列包含被 5.8S rDNA 所分隔的 ITS1 和 ITS2 两个片段。DNA 测序的难易程度与成本和 DNA 片段长度有着直接的关系。在裸子植物中, ITS 序列长度变异较大^[15], 不利于扩增和测序。在被子植物中, ITS 序列的长度稳定, 而且序列变异较快, 可以提供丰富的信息位点, 测序方便。

2.2. ITS 序列在被子植物鉴定中的应用

在被子植物中, ITS 长度(包括 ITS1、ITS2 和 5.8S rDNA)通常为 565~700 bp, 变异幅度很窄; 既具有核苷酸序列的高度变异性又有长度上的保守性, 说明这些间隔区的序列很容易在近缘类群间排序, 而且丰富的变异可在较低的分类阶元上解决植物的分子鉴定及系统发育问题; 并且, 只需用扩增时的一对引物即可对被子植物的 ITS 进行全序列测定, 这使得该序列在探讨被子植物属下水平的系统分类与进化的研究中得到广泛应用。

被子植物核 rDNA 的 ITS 区中, 5.8S rDNA 的长度非常保守, 一般为 163 bp 或 164 bp, 仅在大豆属中发现其长度为 168 bp^[16], 序列保守, 在有些类群中根本没有变异^[17]。因此, 5.8S rDNA 提供的信息有限, 在研究中可不必测该片段的序列^[18]。但近几年也有研究表明, 高度保守的 5.8S rRNA 基因序列对揭示远缘属间的系统发育关系能提供一定的信息量, 在研究中可将 5.8S 与 ITS 序列结合起来^[19]。

ITS1 和 ITS2 的长度比较保守, 被子植物 ITS1 的长度为 187~298 bp, ITS2 的长度为 187~252 bp。至于 ITS1 与 ITS2 的相对长度, 不同类群间变化较大^[20],

在菊科、十字花科等科中, ITS1 比 ITS2 长; 在葫芦科、玄参科等科中, ITS1 比 ITS2 短; 在蔷薇科、蝶形花科等科中, ITS1 和 ITS2 的长短因属、种而异。在大多数被子植物类群中这两个片段所提供的信息量相近, 虽然单独根据 ITS1 或 ITS2 均可得出重要的系统学结论^[21], 但考虑到这两个片段的长度有限, 各自的信息量并不十分充足, 因此, 大多数情况下都是将这两个片段综合起来考虑。

2.2.1. 在科、亚科、族水平的应用

ITS 序列分析已成为在分子水平上探讨科、亚科、族内关系十分有效的手段, 在种内, ITS 序列对于揭示异域分布或间断分布居群间的关系具有很大潜力, 该片段特别适合于属、种级的系统发育和分类研究。汪小全等通过测定苦苣科 4 族 5 个属的 nrDNA 的 ITS 区以及部分 5.8S rRNA 基因的 3'端序列, 对其中 5 种代表植物进行了系统学研究, 发现尖舌苣苔族的代表植物在 ITS1 和 ITS2 在长度、序列以及 GC 含量上均与其它几个族有较大差异, 由此推测尖舌苣苔族可能很早就沿单独的一个分支演化^[22]。

章群和施苏华等对金缕梅科部分植物的 nrDNA 的 ITS (包含 5.8S 区)进行了比较分析, 深入探讨了金缕梅科的系统发育^[23,24]。形态和分子证据表明, 五味子科是被子植物最基部的分支之一。而在传统的分类系统中, 五味子科一直被认为是木兰亚纲中较特化的类群。两种截然不同的观点导致五味子科的系统位置和在被子植物起源演化上的意义也截然不同, 使得该类群成为被子植物系统学研究中的关键类群之一而备受关注。刘忠、汪小全等分析了五味子科内 14 种代表植物的 nrDNA 的 ITS 序列, 为五味子科的系统位置和演化趋势提供了分子证据^[25]。

2.2.2. 在属及属下分类阶元中的应用

由于 ITS 序列在关系密切的物种间的长度特别接近, 而且序列又存在一定程度的变异, 因此 ITS 序列非常适合在属及属下水平做关于分类鉴定和系统发育的研究。Alice 与 Campell 对蔷薇亚科的悬钩子属 (*Rubus*)进行了 nrDNA ITS 区序列分析与系统学研究, 分析结果显示, ITS 序列在悬钩子属下亚属水平上可提供较大的信息量, 但同时发现, 在关系较近的近缘种之间, ITS 序列的变异性较低^[26]。

保曙琳, 丁小余等对野生菱和栽培菱种 rDNA ITS 片段进行分析, 探讨了该片段在两大群体中的系统学及鉴别研究意义, 通过测序得到了 rDNA ITS1、ITS2 和 5.8S rDNA 的完整序列, 发现菱属 (*Trapa*)各居群间 rDNA ITS 的差异较小, 但是根据 ITS 序列的碱基插入、缺失等特征可以很好地鉴别野生菱和栽培菱。这说明对于某些类群, 即使变异性较低, 仍然可以根据 ITS 的其它特征对物种进行鉴定^[27]。

ITS 序列分析已成为近年来国际上植物多样性研究的热点, 并在药用植物种质资源研究中得到广泛的应用。丁小余等利用 rDNA ITS 序列对国内外石斛属民族药用植物的分类及生药学研究进行了探讨, 并鉴别出了易混淆的石斛品种^[28]; 马小军等研究了野山参 (*Panax*)和栽培参 rDNA ITS 的遗传差异, 利用得到的 ITS 序列鉴别出不同的品种^[29]; 赵志礼、周开亚等用直接测序法对国产黑果山姜 (*Zingiber*)以及水山姜的 rDNA ITS 序列进行了测定, 结果显示两者序列完全一致, 证实了《中国植物志》中记载的水山姜为黑果山姜^[30]。以上的研究成果都说明, rDNA ITS 序列是一种适宜于中药材鉴别分子标记。对稻属 (*Oryza*)^[31]、苋属 (*Amaranthus*)^[32]等其它植物物种的分类和系统学研究也说明, ITS 将在物种鉴别中发挥越来越重要的作用。

2.2.3. 种及种下水平的应用

rDNA 上的 5.8、18 和 28S rRNA 基因有极大保守性, 即存在广泛的异源同源性。而由于 ITS 序列不参与成熟核糖体的组装, 所以 ITS 序列在进化过程中承受的自然选择压力非常小, 因此能够容纳更多的变异。ITS1 和 ITS2 属于中度保守序列, 其保守性基本表现为种内相对一致, 种间差异比较明显。这种特点使 ITS 序列适合于植物的分子鉴定以及属内物种间或种内差异较明显的物种间的系统发育关系分析。同时由于 ITS 在位点内、位点间存在同步进化, 导致在许多物种内 ITS 不存在位点多态性^[33-35], 但仍有不少研究发现 ITS 存在种内多态性, 即在不同亚种、居群的同一点位有 2 或 2 个以上的核苷酸类型^[36-38], 有些种内多态性还可在种、亚种间关系的分析中得到应用, 如 Ainouche 等人发现在禾本科雀麦属植物中, 虽然大麦状雀麦 (*Bromus hordeaceus*) (4x = 28) 等 4 种植物在不同亚种、居群间的 ITS 序列完全一致, 但除此以外, 发现在有些物种的亚种、居群间仍存在位点多态

性,多态位点总数为 27 个,主要集中在四倍体物种 *B. lanceolatus*, *B. secalinus*, *B. grossus* 和 *B. bromoideus* 之中^[39]。同时 Ainouche 等人在雀麦属的几个二倍体物种中,如 *B. briziformis*, *B. japonicus*, *B. intermedius* 也发现了 1~4 个多态性位点^[39],PCR 产物直接测序的方法限制了这种种内位点多态性,因此可以先通过克隆 PCR 产物中不同的重复单位,然后再进行测序来确定每一种重复单位的序列及所占比例。

2.3. ITS 序列在裸子植物鉴定中的应用

与被子植物相比,裸子植物中的 ITS 序列长度更长,变异幅度更大,尤其是长度变异尤为显著,变异幅度为 975~3125 bp,其中变异较大的部分是 ITS1 片段,而 5.8S rDNA + ITS2 的长度变化范围约在 375~450 bp 之间,因此,一般认为 ITS 不适用于裸子植物的鉴定和系统发育研究^[40]。裸子植物较长的 ITS 片段给扩增、测序等都增加了难度,但同时变异较大也表明其较大的信息含量。近年来利用 ITS 片段对裸子植物某些类群的研究分析工作有了新的进展^[41]。

通过 PCR 扩增并测序并研究裸子植物 rRNA 基因间转录间隔区的结构,屈良鹤等^[42]发现裸子植物的 ITS 区较其它植物长几百到上千个核苷酸,如苔藓、蕨类和被子植物。通过对 28 种冷杉属(*Abies*)植物的 ITS 序列进行研究,向巧萍等^[41]发现 ITS 长度的变化主要是由于 ITS1 的长度变异所致,同时,冷杉属属下阶元植物的 ITS 片段长度变异虽然很大,但较长的 ITS 的加长部分可以被看作一个插入序列,其他部分序列则有较高同源性,并不影响采用 ITS 序列进行系统发育分析。但较大的长度变异异常给排序带来太大的困难,削弱了 ITS 在分子鉴定和系统发育研究中的应用效果。由于人们对 ITS 序列长度变异的机理和原因知之甚少,对 ITS 序列同源性的推测又很困难,因此,不能直接采用 ITS 长度变异这一性状来进行系统发育的分析,但长度的变异可以作为一个性状与其他性状(如形态学性状)一起用于系统学研究^[43]。

2.4. ITS 区测序方法的争议

在被子植物系统发育分析中,是测定 ITS 单一

PCR 克隆,还是直接测定 PCR 全部产物的序列更好,尚处于争论之中^[8]。客观的说,两种测定方法各有其利弊。如果 rDNA 重复序列间的重合程度很高,那么 PCR 产物直接测序就可以反映出 ITS 区的序列,但是在 PCR 扩增中存在一定的随机错误^[44]。相反,如果 rDNA 重复序列间的纯和程度较低,各重复单位间序列差异较大,特别是当重复序列间存在插入/缺失时,对 PCR 产物直接测序将导致无法读出其序列,必须对 PCR 产物进行常规克隆后再测序,如杉科密叶杉属植物 *Athrotaxis laxifolia* 和 *A. cupressoides* 的 ITS1 序列,如果 PCR 产物中不同重复序列的浓度比较平均,直接测序可直接确定重复序列间的变异,这在其他类群中也发现类似的情况^[11,45],因此通过直接测定 PCR 产物的序列可以反映 rDNA 重复序列间的纯和度。另一方面,如果 PCR 产物中不同重复序列的浓度比较平均的话,直接测序后根据测序-放射自显影带纹可直接确定重复序列间的变异情况,这些发生变异的核苷酸会在同一位点显示出来^[11,46]。

3. ITS 区测序的技术流程及系统学分析

目前对 ITS 序列分析的具体流程大体相同,主要包括总 DNA 提取、PCR 扩增、(克隆)、测序、排序等步骤。

3.1. 总 DNA 的提取

采用液氮冷冻研磨,CTAB 法提取 DNA。

3.2. PCR 扩增、产物纯化及测序

选择合适的引物对 ITS 区进行扩增,得到双链的 PCR 产物。然后经琼脂糖电泳检测、回收、纯化。对 PCR 产物进行纯化是直接测序的关键,可用离心透析法、透析袋法、Gene clean 方法等,也可先对 PCR 产物进行克隆然后测序。

3.3. 排序

用计算机软件如 CLUSTAL V、CLUSTAL X、CLUSTAL W、DNASTAR 程序等对所测得的序列进行排序,然后根据空位(gap)情况对排序结果进行适当调整。ITS1 和 ITS2 的边界可根据已发表的植物 18S、5.8S 和 26S rDNA 序列以及近缘类群的 ITS1、ITS2

序列确定, 从目前发表的文章看大多数数据集中在被子植物上。

3.4. 系统学分析

确定变异位点和信息位点的数目, 然后进行系统学分析, 只有信息位点才能用于系统学分支分析。常用的分析软件有 PAUP 分析软件、PHYIIP3 软件包、MEGA 等。对转换和颠换进行加权和对将 gap 作为缺失或新性状得到的简约树树形大致相同, 但自展数值不同。最常用的分支分析法有简约法、邻接法、最大似然法等。

4. ITS2 二级结构预测

ITS2 是真核生物 rDNA 基因的重要组成部分, 在 rDNA 基因加工成熟过程中起到重要的作用。ITS2 保守的结构域和二级结构为广范围遗传距离排序提供了重要的技术保障。

通过比较了 7 条热门条形码序列并对 6000 余个样本的分析^[47], 再依据各条形码评价指标, 姚辉等^[48]确定了序列 ITS2 是药用植物鉴定最优的序列, 且物种水平的鉴定成功率高达 92.7%。此外, 多位学者已提出 ITS2 具有很多优点^[47,49], 其序列长度较短, 易于扩增, 甚至适用于已降解的药材^[50]; 作为 ITS 的一部分, ITS2 一直受到广大系统进化专家的青睐并被广泛应用于系统进化的研究^[49,51]。ITS2 的二级结构研究也具有一定的系统分类价值^[51,52]。

测序峰图采用序列拼接软件 CodonCode Aligner V 3.5 (CodonCode., USA) 校对拼接, 去除低质量序列及引物区, 进行多序列比对并人工校验。对于 ITS2 序列, 拼接得到一致序列后使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8S 和 26S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[53]。去掉测序质量差、不能确定具体物种的(比如含“sp.”的序列)及不完整序列。通过 HMM 真菌模型(Florida State University, USA) 计算 K2P 距离。采用平均种内距离、最大种内距离及 theta 值来描述种内变异, 相应的采用平均种间距离、最小种间距离及 theta 值来描述种间变异^[54,55]。用计算机 Perl 语言统计种间、种内遗传距离的分布频度, 评价 Barcoding Gap^[56]。通过 Wilcoxon 两个样本的统计检验^[57], 进一步比较种间、种内变异程度的大小。最后

采用相似性搜索法和最小距离法考察 ITS2 的鉴定成功率^[58]。

姚辉等^[48]采用植物 DNA 条形码候选序列来讨论 ITS2 片段在黄芪属药用植物中的鉴定能力。结果显示, ITS2 基因区通用性强, 序列在黄芪种属间的差异较大, 具有明显的 Barcoding Gap, 能够正确的鉴定 41 个黄芪属植物物种, 仅余 6 个物种不能鉴定, 其研究表明 ITS2 能够作为黄芪属药用植物鉴定的 DNA 条形码序列, 并具有重要的应用价值。

郑言等^[1]对栽培稻、广陆矮四号、药用野生稻、宽叶野生稻和高秆野生稻这几种植物的 ITS2 的二级结构进行了预测, 发现广陆矮四号稻和药用野生稻的二级结构在一定程度上具有一定的相似性, 具有四个臂和一定的结构环, 宽叶野生稻和高秆野生稻也具有相似的特点。这些可以认为是稻属的保守性在 ITS2 序列中的具体体现。但是也可以发现具体结构仍然存在较大的差异。这些差异可能是由 PCR 引物的选择和种属自身的特异性这两个原因引起的。

本实验室在不同品种红花 ITS 序列分析中, 发现 33 个红花群体中有 15 个位点发生变异。在 ITS2 区有三个位点发生小群体一致性突变。结果显示正常情况下(如库车无刺)二级结构大致可分为 a、b、c、d 和 e 五个区(图 2)。大部分红花品种可分为以库车无刺为代表的 I 型结构和以西昌红花为代表的 II 型结构, 同时也有因为序列一级结构变异导致二级结构变化幅度较大的云红 5391 和云红 5441 (图 2)。I 型结构: 库车无刺、南溪红花、乌鲁木齐 HH3、吐鲁番 HH5、云红 4581 和云红 5551。其余品种除云红 5391 与云红 5441 之外, 均为 II 型结构。

5. 结论

综上所述, ITS 区序列分析已经在植物物种鉴定以及分子系统学研究中发挥了重要的作用, 为解决一些长期存在的分类争议提供了令人信服的证据。裸子植物和被子植物的 ITS 序列的差异很可能来自于长期的环境剧烈的变化。相信随着分子生物学技术日新月异的发展, 人们将对 ITS 序列有更深入的了解, 并探索出更好的方法用于我国植物种质资源的鉴定和系统学研究。

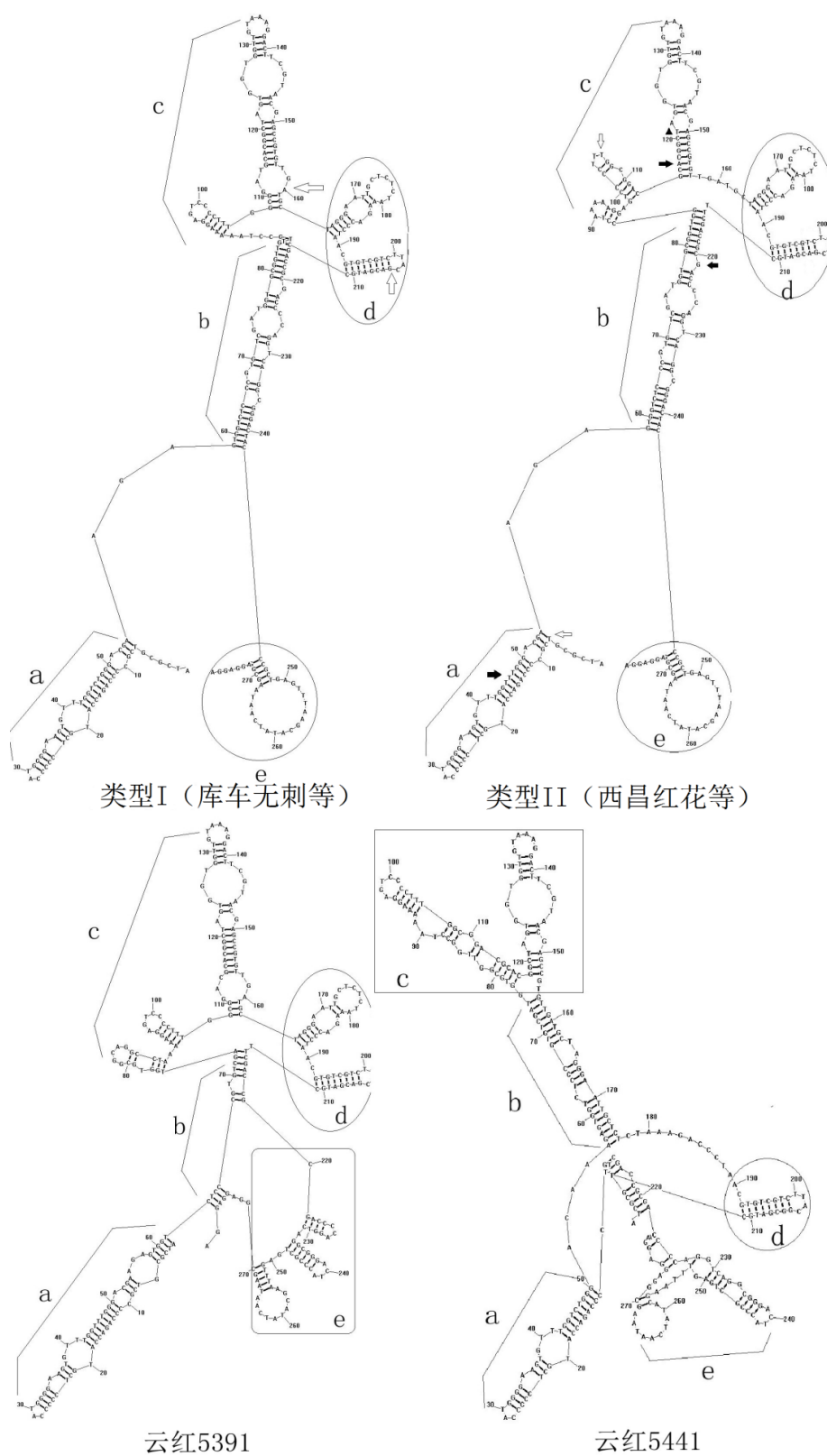


Figure 2. Predicted secondary structure of ITS2 of different safflowers
图 2. 不同品种红花 ITS2 对应的预测二级结构

项目基金

武汉市青年晨光计划项目(201270131395)。

参考文献 (References)

- [1] 郑言, 覃瑞 (2008) 水稻与药用野生稻、宽叶野生稻、高秆野生稻的 ITS 序列分析. *生命科学仪器*, **6**, 30-40.
- [2] White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. *InnisMA. PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic, New York, 15-22.
- [3] 赵玥, 赵文军 (2005) 核 rDNA ITS 序列在植物种质资源鉴定中的应用. *辽宁农业科学*, **5**, 26-28.
- [4] Venema, J. and Tollervey, D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, **33**, 261-311.
- [5] Hadjiolova, A. Normann, J., Cavaillé, et al. (1994) Processing of truncated mouse or human rRNA transcribed from ribosomal minigenes transfected into mouse cells. *Molecular and Cellular Biology*, **14**, 4044-4056.
- [6] Lalev, A.I. and Nazar, R.N. (1999) Structural equivalence in the transcribed spacer of pre-rRNA transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*, **27**, 3071-3078.
- [7] Joseph, N., Krauskopf, E., Vera1, M.I., et al. (1999) Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Research*, **27**, 4533-4540.
- [8] Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., et al. (1995) The its region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **82**, 247-277.
- [9] Suzuki, A., Tanifuji, S., Komeda Y., et al. (1996) Structural and functional characterization of the intergenic spacer region of the rDNA in *Daucus carota*. *Plant and Cell Physiology*, **37**, 233-238.
- [10] Wang, J.B. and Zhang, W.J. (2000) Concerted evolution of nuclear rDNA in allopolyploid plants. *Hereditas*, **22**, 54-56.
- [11] Sang, T., Crawford, D.J., Stuessy, T.F., et al. (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6813-6817.
- [12] Wendel, J.F., Schnabel, A. and Seelanan, T. (1995) Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 280-284.
- [13] Elder, J.R. and Turner, B.J. (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequence in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, **70**, 297-319.
- [14] Ainouche, M.L. and Bayer, R.J. (1997) On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): Insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Genome*, **40**, 730-743.
- [15] 汪小全, 洪德元 (1997) 植物分子系统学近五年的研究进展概况. *植物分类学报*, **35**, 465-480.
- [16] Kollipara, K.P., Singh, R.J. and Hymowitz, T. (1997) Phylogenetic and genomic relationships in the genus *Glycine* Willd Based on sequences from the ITS region of nuclear rDNA. *Genome*, **40**, 57-68.
- [17] Sang, T., Crawford, D.J. and Stuessy, T.F. (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6813-6817.
- [18] 张文驹 (1998) 应用 rDNA 的 ITS 区探讨多倍体小麦的基因组起源. 武汉大学, 武汉.
- [19] 陈之端, 汪小全, 孙海英等 (1998) 马尾树科的系统位置: 来自 rbcL 基因核苷酸序列的证据. *植物分类学报*, **1**, 407-416.
- [20] 王建波, 张文驹 (1999) 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用. *植物分类学报*, **4**, 407-416.
- [21] 周毅, 邹喻苹, 洪德元等 (1996) 中国野生稻及栽培稻核糖体 DNA 第一转录间隔区序列分析及其系统学意义. *植物学报*, **38**, 785-791.
- [22] 汪小全, 李振宇 (1998) rDNA 片段的序列分析在苦苣苔亚科系统学研究中的应用. *植物分类学报*, **2**, 97-105.
- [23] 章群, 施苏华, 黄椰林等 (1999) 金缕梅亚科 ITS 序列分析及其系统发育初探. *中山大学学报(自然科学版)*, **1**, 107-110.
- [24] 章群, 施苏华, 黄椰林等 (2000) 金缕梅族 ITS 序列分析及其系统学意义. *中山大学学报(自然科学版)*, **1**, 72-76.
- [25] 刘忠, 汪小全, 黄椰林等 (2000) 五味子科的系统发育: 核糖体 DNA ITS 区序列证据. *植物学报*, **7**, 758-761.
- [26] Allice, L.A. and Campbell, C.S. (1999) Phylogeny of *rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, **1**, 81-97.
- [27] 保曙琳, 丁小余, 常俊等 (2004) 长江中下游地区菱属植物的 DNA 分子鉴别. *中草药*, **8**, 926-930.
- [28] Ding, X.Y., Wang, Z.T., Xu, H., et al. (2000) Database establishment of the whole rDNA ITS region of Dendrobium species of "Fengdou" and authentication by analysis of their sequences. *Acta Pharmacologica Sinica*, **7**, 567-573.
- [29] Ma, X.J., Wang, X.Q., Xiao, P.G., et al. (2000) Comparison of sequences between wild ginseng DNA and garden ginseng DNA. *China Journal of Chinese Material Medical*, **4**, 206-209.
- [30] 赵志礼, 周开亚, 董辉等 (2001) 国产“水山姜”的分类学研究——来自核糖体 DNAITS 区序列的证据. *云南植物研究*, **4**, 439-443.
- [31] Bao, Y. and Ge, S. (2003) Identification of *oryza* species with the CD genome based on RFLP analysis of nuclear ribosomal ITS sequences. *Acta Pharmacologica Sinica*, **7**, 762-765.
- [32] 宋葆华, 陈之端, 汪小全等 (2000) 中国菟属 nrDNA 的 ITS 序列分析及其系统学意义. *植物学报*, **11**, 1184-1189.
- [33] Francisco, O.J., Santos, G.A., Hines, A., et al. (1997) Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1595-1613.
- [34] Hsiao, C., Chatterton, N.J. and Assay, K.H. (1994) Phylogenetic relationships of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome*, **37**, 112-120.
- [35] Wojciechowski, M.F., Sanderson, M.J., Baldwin, B.G., et al. (1993) Monophyly of aneuploidy astragalus (fabaceae): Evidence from nuclear ribosomal dna internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany*, **80**, 711-722.
- [36] Downie, S., Ramanath, S., Katz-Downie, D. and Llanas, E (1996) A molecular phylogeny of apiaceae subfamily apioidae: Evidence from nuclear ribosomal dna internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany*, **83**, 234-251.
- [37] Buckler, E.S. and Holtsford, T.P. (1996) Zea systematics: Ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 612-622.
- [38] Suh, W.C., Ross, W. and Record, Jr., M.T. (1993) Two open complexes and a requirement for Mg²⁺ to open the lambda PR transcription start site. *Science*, **259**, 358-361.
- [39] Ainouche, M.L. and Bayer, R.J. (1997) On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): Insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Genome*, **40**, 730-743.
- [40] Karvonen, P. (1995) Genetic variation and structure of ribosomal DNA (rDNA) in Scots pine and Norway spruce. *Acta University Ouluensis Series A Scientiae Rerum Naturalium*, **10**, 1-68.
- [41] 向巧萍, 向秋云 (2000) ITS (nrDNA)片段在冷杉属植物中的

- 长度多态性及其在松科的系统与演化研究中的应用. *植物学报*, **9**, 946-951.
- [42] Qu, L.H., Xi, B.Q., Shi, S.H., et al. (1993) A characteristic size of the ITS in gymnosperm rDNA. *15th International Botanical Congress*, Tokyo, 28 August-3 September 1993, 201.
- [43] Gernandt, D.S. and Liston, A. (1999) Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 711-723.
- [44] Gething, M.J. and Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature*, **355**, 33-45.
- [45] Gernandt, D.S. and Liston, A. (1999) Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, **5**, 711-723, 46.
- [46] 张文驹, 瞿礼嘉 (1998) 普通小麦基因组最可能的 4 个供体的 ITS1 和 ITS2 序列及其亲缘关系. *植物学报: 英文版*, **11**, 994-1000.
- [47] Chen, S.L., Yao, H., Han, J.P., et al. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, **5**, 370-375.
- [48] 高婷, 姚辉, 马新业等 (2010) 中国黄芪属药用植物 DNA 条形码(ITS2)鉴定. *世界科学技术(中医药现代化)*, **2**, 222-227.
- [49] Coleman, A.W. (2003) ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, **19**, 370-375.
- [50] Chiou, S.J., Yen, J.H., Fang, C.L., et al. (2007) Authentication of medicinal herbs using PCR-Amplified ITS2 with specific primers. *Plant Medica*, **73**, 1421-1426.
- [51] Coleman, A.W. (2007) Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, **35**, 3322-3329.
- [52] Prasad, P.K., Tandon, V., Biswal, D.K., et al. (2009) Phylogenetic reconstruction using secondary structures and sequence motifs of ITS2 rDNA of *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Braun, 1899 (Digenea: Paragonimidae) and related species. *BMC Genomics*, **10**, S25.
- [53] Wolf, M., Achatziger, M., Schultz, J., et al. (2005) Homology modeling revealed more than 20000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. *RNA*, **11**, 1616-1623.
- [54] Meier, C.P. and Paulay, G. (2005) DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, **3**, Article ID: e422.
- [55] Meier, R., Zhang, G. and Ali, F. (2008) The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the "Barcoding Gap" and leads to misidentification. *Systematic Biology*, **57**, 809-813.
- [56] Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., et al. (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 2923-2928.
- [57] Kress, W.J. and Erickson, D.L. (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One*, **2**, Article ID: e508.
- [58] Ross, H.A., Murgan, S. and Li, W.L. (2008) Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology*, **57**, 216-230.