

## 核 rDNA ITS 分子标记在兰科植物研究中的应用

李亚, 龚黄莎, 杨柏云, 熊冬金\* (南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西省植物资源重点实验室, 江西南昌 330031)

**摘要** 在植物基因组中核 rDNA 是高度重复的串联序列, 其中 18S rDNA 与 5.8S、26S rDNA 共同构成一个转录单位。ITS(基因内转录间隔区)分布在 18S-5.8S-26S 区域, 该区域包括 3 个部分: ITS1 和 ITS2 以及位于它们之间高度保守的 5.8S rDNA 外显子区。兰科(Orchidaceae)是单子叶植物中的第一大科, 进化程度较高。文中介绍了 ITS 序列的结构特点, 重点对 ITS 序列在兰科植物近缘种亲缘关系鉴定、系统进化及分子系统地理学研究中的应用及前景进行了综述。

**关键词** ITS; 系统进化; 分子系统地理学; 兰科植物

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)10-04280-03

## Application of Nuclear rDNA Molecular Markers in Study on Orchidaceae

LI Ya et al (Jiangxi Key Laboratory of Plan Resource, College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031)

**Abstract** The nuclear rDNA genes occur as high tandem repeats in the plant genome. 18S rDNA and 5.8S, 26S rDNA constitute a transcription unit. The internal transcribed spacer (ITS) is intercalated in the 16S-5.8S-26S region separating the elements of the rDNA locus. The ITS region consists of three parts: the ITS1, ITS2 and the highly conserved 5.8S rDNA exon located between them. These consecutive gene blocks, consisting of several regions, are widely applied in plant phylogenetics. Orchidaceae is the first branch of monocotyledon and has a higher rate of evolution. The structure characteristics of ITS sequence were introduced, its application in Orchidaceae closely related species identification, phylogenetic and molecular phylogeography research were reviewed, the prospect was forecasted.

**Key words** ITS; Phylogenetic; Molecular phylogeography; Orchidaceae

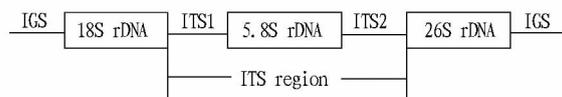
兰科(Orchidaceae)植物是单子叶植物中的第一大科,也是开花植物中最大的家族之一,有 6 个亚科 725 属 25 000 余种<sup>[1]</sup>。兰科植物分布极广,全世界除两极和沙漠外均有分布,但其中 85% 集中分布在热带和亚热带。我国是野生兰花资源大国,约有 173 属 1 200 多种<sup>[2]</sup>,主要种类有春兰、蕙兰、建兰、寒兰和墨兰等。从生物进化的角度来看,绝大多数兰科植物种类正处在进化和特化的活跃期,对兰科植物的保护在某种程度上意味着对未来地球上生物多样性的保护<sup>[3]</sup>。近年来,许多学者都在不断地对我国兰花资源进行调查、引种驯化、栽培繁殖、筛选评估和种质资源保存等研究<sup>[4]</sup>。但是,由于自然杂交导致的兰科植物变异性大,中间类型较多,种的分类界限不明确等问题,给属间、属内的分类整理带来了很大的困难<sup>[5]</sup>。随着现代生物学技术的迅猛发展,分子标记技术在兰科植物种质资源、遗传多样性以及系统进化等方面的研究中已得到广泛应用。文中主要综述核 rDNA 基因内转录间隔区(ITS)序列的特点及其在兰科植物研究中的应用。

**1 核 rDNA** 核糖体广泛存在于植物的叶绿体、线粒体和细胞质中,由大小 2 个亚基组成,每个亚基又由 rRNA(核糖体 RNA)及其相关蛋白构成<sup>[6]</sup>。植物细胞核中编码 rRNA 的基因是由高度串联重复并有转录活性的多基因家族,每一基因组有上千个拷贝,每个拷贝又分为编码区和非编码区,其中编码小亚基的 18S rDNA 与 5.8S、26S rDNA 共同构成一个转录单位<sup>[7]</sup>。在高等植物中,rDNA 的编码区序列高度保守(不

同纲、目间的同源率可达 90% 以上),序列差异主要表现在其中的内转录间隔区 ITS、ETS 及 IGS 等非编码区上<sup>[6]</sup>。

## 2 ITS 序列

**2.1 ITS 序列的结构** 基因内转录间隔区(ITS)分布在 18S-5.8S-26S 区域(图 1)<sup>[8]</sup>,该区域包含 3 个部分: ITS1 和 ITS2 以及位于它们之间的高度保守的 5.8S rDNA 外显子区。在被子植物中,这个区域的总长度在 500~750 bp 之间<sup>[9]</sup>,而在其他种子植物中可能更长,达 1 500~3 500 bp<sup>[10-11]</sup>。所有的间隔区都会被组装成为成熟的核糖体<sup>[12-14]</sup>,ITS1 和 ITS2 的转录物在 rRNA 加工的过程中被切掉,但这 2 部分在核 rRNA 成熟过程中具有重要作用。现在可以确定的是,在核糖体生源论中 ITS2 是构成 rRNA 大亚基(LSU)所必需的<sup>[15]</sup>。所有间隔区正确的高阶结构对于指引内切核糖核酸酶找到合适的切割位点是很重要的<sup>[16]</sup>。虽然在不同的有机体中 ITS2 的序列长度变化很大,但 Hadjiolova 等<sup>[17]</sup>证实了哺乳动物和酿酒酵母具有结构同源域。与编码区相比,间隔区进化得更快,如内转录间隔区(ITS),在研究属内种间和较近的族间、属间关系时都表现出较高的趋异率<sup>[18-22]</sup>,并且被广泛应用于不同水平的系统重建<sup>[15]</sup>。



注:IGS. 基因间隔区;ITS. 内转录间隔区。

图 1 编码核糖体 rRNA 基因构成示意

**2.2 ITS 序列的特点** 作为 rDNA 转录单位的一部分,ITS 存在于所有有机体中,具有以下特点:①双亲遗传,区别于母系遗传的叶绿体和线粒体的标记;②易 PCR 扩增,有几个通用引物可用于多种不同种类的生物;③多拷贝结构;④大小适中,使之易于测序;⑤基于已发表过的研究显示,适合用于

**基金项目** 江西省重点科技计划项目(20122BBF60059)。

**作者简介** 李亚(1987-),女,重庆人,在读硕士研究生,研究方向:植物分子生物学,E-mail:liyya\_1987@126.com。\* 通讯作者,副教授,硕士生导师,从事植物种质资源研究,E-mail:jxxdj@163.com。

**收稿日期** 2013-03-10

物种进化或属的进化研究<sup>[9-11]</sup>。近年来的研究也表明核 rDNA ITS 序列可用于解决科、亚科、族、属、种甚至种下水平的植物系统发育问题,而且还为重建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,甚至在揭示异域间断分布居群间的关系上也具有潜力<sup>[23-25]</sup>。

### 3 核 rDNA ITS 在兰科植物中的应用

传统的植物系统学是建立在形态解剖学、孢粉学和生理生化等性状的表现型基础上的,然而从分子遗传学角度来看,表现型的不同是基因型差异的反映。因此直接对植物的 DNA 序列进行分析,可为植物系统学在基因组水平上提供最有力和直接的依据,从而可从分子水平上认识物种分化的内在原因和物质基础<sup>[26]</sup>。而鉴于兰科植物高度演化的形态,传统的系统学分类方法存在一定缺陷,近年来,分子生物学的方法越来越多地应用于兰科植物的亲缘关系、系统进化及分子系谱研究中。

**3.1 在近缘种亲缘关系中的应用** Cox 等<sup>[27]</sup>应用核 rDNA ITS 序列研究了兜兰属 (*Paphiopedilum*)、杓兰属 (*Cypripedium*)、美洲兜兰属 (*Phragmipedium*)、碗兰属 (*Selenipedium*)、墨西哥兰属 (*Mexipedium*) 的 150~170 个种之间的亲缘关系,证明兜兰属的划分与传统分类基本一致。

丁小余等<sup>[28-29]</sup>分别对束花石斛 (*Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl)、曲茎石斛 (*Dendrobium flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sum et L. G. Xu) 及其同属相似种进行 rDNA ITS 区域序列比较研究,分别挑选出了 15 个和 7 个碱基位点用作鉴别束花石斛及其近缘种、曲茎石斛 (南阳居群) 及其近似种的 DNA 证据。

丁小余等<sup>[30]</sup>对铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 主要产区 F 型和 H 型居群 rDNA ITS 碱基序列差异的研究表明,铁皮石斛居群内部 rDNA ITS 区的差异与植物生活型的差异呈一定的相关性, H 型居群的铁皮石斛是 F 型的变种,进一步证明铁皮石斛 F 型居群与 H 型居群间具有显著的差异性。

周倩等<sup>[31]</sup>对浙江乐清铁皮石斛 (*Zhejiang Dendrobium officinale*) rDNA ITS 序列进行克隆,并将其与我国石斛属 12 个组中的 34 个种的 rDNA ITS 进行比对,结果表明浙江乐清铁皮石斛的 rDNA ITS 序列与黄石石斛 (*Dendrobium tosaense*) 一致,其次与铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 最相近,序列相似性达 99%,这与系统发育树的结果一致。

**3.2 在系统进化中的应用** Tsai 等<sup>[32]</sup>根据 ITS 的序列差异确定了 12 种台湾石斛的遗传关系,完整地分析了 12 种石斛和 2 种非石斛属植物的 ITS 序列,共发现了 684 个特征,测定了其遗传距离和并建立了一个系统发育树。

Gravendeel 等<sup>[33]</sup>通过利用独蒜兰属 (*Pleione*) 质体 DNA 和 rDNA ITS 序列并结合形态学的方法特点,分析了独蒜兰属野生种的起源和进化趋势。

Chochai 等<sup>[34]</sup>应用核糖体 ITS 和质体序列对兜兰属 (*Paphiopedilum*) 的系统进化进行了研究,结果证实了兜兰属是单源的,并且可被分为硬叶亚属 (*Parvisepalum*)、短瓣亚属

(*Brachypetalum*) 和兜兰亚属 (*Paphiopedilum*) 3 个亚属。

Sharma 等<sup>[35]</sup>对印度东北部的纹瓣兰 (*Cymbidium alofolium*) 等 10 个兰属物种的 nrITS 区域进行了系统进化分析,结果显示 ITS1 和 ITS2 区域的变异序列长度和 G+C 含量, 5.8S 最为保守 (98.71%), 其次是 ITS1 (86.12%), 最后是 ITS2 (69.40%)。而且 ITS2 具有较高的简约信息位点 (7.46%)、较多的序列片段缺失 (24.63%) 以及大量的转换和颠换。他们的研究证实了 rDNA ITS 区是一个可靠的系统进化标记,尤其是 ITS2,在较高的分类水平中可作为 DNA 条形码的一个可靠指标,甚至可作为一种额外的方法用于鉴定更广泛的植物类群,特别是兰科植物。

**3.3 分子系统地理学** 分子系统地理学源于 20 世纪 70 年代中期对线粒体 DNA 的研究,其主要研究对象及物种内不同种群形成现有分布格局的历史原因和进化过程。植物分子系统地理学通常采用植物叶绿体 DNA 来估计植物物种遗传变异的分布模式,确定植物在冰期时的避难所、冰期后的迁移路线,估测近缘种之间的歧化时间及确定植物物种的保护单元等<sup>[36-38]</sup>。

Tremblay 等<sup>[39]</sup>运用 PCR-RFLP 技术对仙女木 (*Dryasintegrifolia*) 进行了分子系统地理学研究, Broyles<sup>[40]</sup>研究了北美地区 19 个马利筋 (*Asclepias exaltata*) 的种群遗传结构, Sewell 等<sup>[41]</sup>利用 RFLP 技术对北美东部的 *Liriodendron tulipifera* 种群进行了遗传变异分析。

近年来,分子系统地理学在兰科植物的研究中也得到应用。Tsai 等<sup>[42]</sup>基于核糖体 DNA 和质体 DNA (包括 *trnL*、*trnL-F*、*atpB-rbcL* 间隔区) 对来自苏门答腊岛、马来西亚半岛和明打威群岛的蝴蝶兰 (*Phalaenopsis violacea*) 进行了研究,并利用核 rDNA ITS 以及质体 DNA 的 *trnL* 内含子和 *atpB-rbcL* 间隔区对蝴蝶兰属的系统进化和生物地理学分布进行了深入探讨。

Stahlberg 等<sup>[43]</sup>通过流量细胞计数法、形态测量法及分子标记 (质体 DNA 和核 rDNA ITS) 对来自斯堪的纳维亚及俄罗斯科拉河半岛的 27 种根爪兰属 (*Dactylorhiza maculate*) 的 238 个样本进行了分类学和分子系统地理学研究。

Tranchida-Lombardo 等<sup>[44]</sup>利用 rDNA 对地中海冰期避难所的火烧兰 (*Epipactis helleborine*) 及其近缘种的亲缘关系、形态分化和分子系统地理学进行了研究。系统进化和系统地理学研究结果支持火烧兰是近几年 (可能是第四纪冰期的最近阶段) 入侵到意大利半岛的假说,并且它在兰花谱系多样化中起着重要作用。传粉策略的改变以及繁育方法 (从异化受粉到自花受粉) 的循环变化可能是促进火烧兰快速多样化的关键。

### 4 应用前景与展望

ITS 的诸多优点使其成为一种重要的分子标记广泛而被应用到植物近缘种分类、物种鉴定、物种起源、物种进化及分子系统地理学等研究中。目前应用核 rDNA ITS 标记对兰科植物的研究尚存在较大空白,在有些兰科植物中,由于遗传变异等原因在 rDNA ITS 区域差异较小,不能进行有效的区

分,因此,还需借助传统的形态学鉴定、细胞遗传学及其他的分子标记方法如叶绿体 DNA (cpDNA) 等加以补充。随着现代分子生物学的迅速发展及植物基因组测序的不断深入,人们对 ITS 有更加全面深入的了解,探索出更好的方法用于兰科植物种质资源鉴定和系统学研究,特别是对我国药用性兰科植物、珍稀濒危兰科植物等的分类鉴定和种质资源保护将起到至关重要的作用。

## 参考文献

- [1] FLOYD S S, HERBERT S Z, GORDON W D. Orchids [M]. New York: Golden Press, 1989.
- [2] 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003: 70 - 99.
- [3] 罗毅波. 中国兰科植物的保护策略 [J]. 中国林业, 2003 (11): 24 - 25.
- [4] 武海, 蹇黎, 朱利泉. 中国兰花资源分子标记鉴定研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010 (9): 56 - 60.
- [5] 梁红健, 刘敏, 钟志宇, 等. 中国部分兰花品种 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 1996, 23 (4): 365 - 370.
- [6] 田欣, 李德铎. DNA 序列在植物系统学研究中的应用 [J]. 云南植物研究, 2002, 24 (2): 170 - 184.
- [7] 牛宪立, 姬可平, 吴群, 等. rDNA ITS 区序列分子标记技术在植物学研究中的应用 [J]. 生物信息学, 2009, 7 (4): 268 - 271.
- [8] 肖龙鸾, 朱华. 植物 nrDNA ITS 致同进化不完全 [J]. 西北植物学报, 2009, 29 (8): 1708 - 1713.
- [9] BALDWIN B G, SANDERSON M J, PORTER J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. Ann Missouri Bot Gard, 1995, 82 (2): 247 - 277.
- [10] MAGGIN F, MARROCCO R, GELATI T M, et al. Length and nucleotide sequences of the internal spacers of nuclear ribosomal DNA in gymnosperms and pteridophytes [J]. Plant Syst Evol, 1998, 213 (3/4): 199 - 205.
- [11] LISTON A, ROBINSON W A, OLIPHANT J M, et al. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed region of non-flowering seed plants [J]. Syst Bot, 1996, 21 (2): 109 - 120.
- [12] HADJILOVA K V, GEORGIEV O I, NOSIKOV V V, et al. Localization and structure of endonuclease cleavage sites involved in the processing of the rat 32S precursor to ribosomal RNA [J]. Biochem J, 1984, 220 (1): 105 - 116.
- [13] CALONJE M, MARTIN-BRAVO S, DOBES C, et al. Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction [J]. Plant Syst Evol, 2009, 282 (3/4): 257 - 280.
- [14] HOUSELEY J, KOTIVIC K, HAGE A E, et al. Trf4 targets ncRNAs from telomeric and rDNA spacer regions and functions in rDNA copy number control [J]. Embo J, 2007, 26: 4996 - 5006.
- [15] PETER P, JAAKKO H. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37 (4): 1897 - 1912.
- [16] MAI J C, COLEMAN A W. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants [J]. Mol Evol, 1997, 44 (3): 258 - 271.
- [17] HADJILOVA K V, NORMANN A, CAVAILLE J, et al. Processing of truncated mouse or human rRNA transcribed from ribosomal minigenes transfected into mouse cells [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14 (6): 4044 - 4056.
- [18] BAUM D A, SMILL R L, WENDEL J F. Biogeography and floral evolution of baobabs *Adansonia*, Bombacaceae as inferred from multiple data sets [J]. Syst Biol, 1998, 47 (2): 181 - 207.
- [19] XIANG Q Y, CRAWFORD D J, WOLFE A D, et al. Origin and biogeography of *Aesculus* L. (Hippocastanaceae): A molecular phylogenetic perspective [J]. Evolution, 1998, 52 (4): 988 - 997.
- [20] DOWNIE S R, KATZ-DOWNIE D S, SPALIK K. A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences [J]. Amer J Bot, 2000, 87 (1): 76 - 95.
- [21] SCHWARZBACH A E, RICKLEFS R E. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology [J]. Amer J Bot, 2000, 87 (4): 547 - 564.
- [22] STANFORD A M, HARDEN R, PARKS C R. Phylogeny and biogeography of *Jugland* (Juglandaceae) based on *matK* and ITS sequence data [J]. Amer J Bot, 2000, 87 (6): 872 - 882.
- [23] 李学营, 彭建营, 白瑞霞. 基于核 rDNA 的 ITS 序列在种子植物系统发育研究中的应用 [J]. 西北植物学报, 2005, 25 (4): 829 - 834.
- [24] BALDWIN B G. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: Chromosomal and morphological evolution reexamined [J]. Amer J Bot, 1993, 80 (2): 222 - 238.
- [25] WIDMER A, BALDISBERGER M. Molecular evidence for allopolyploid speciation and a single origin of the narrow endemic *Draba ladina* (Brassicaceae) [J]. Amer J Bot, 1999, 86 (9): 1282 - 1289.
- [26] 刘志文, 韩旭, 赵明辉, 等. 核糖体 DNA 在植物系统发育中的应用与研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (9): 3561 - 3562.
- [27] COX A V, PRIDGEON A M, ALBERT V A, et al. Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences [J]. Plant Systematics and Evolution, 1997, 208: 197 - 223.
- [28] 丁小余, 徐璐珊, 王峰涛, 等. 束花石斛及其相似种的 DNA 分子鉴别 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (6): 407 - 411.
- [29] 丁小余, 徐璐珊, 徐红, 等. 曲茎石斛及其近似种鉴别的形态和 DNA 分子证据 [J]. 药理学报, 2001, 36 (11): 868 - 873.
- [30] 丁小余, 王峰涛, 徐璐珊, 等. F 型、H 型居群的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列差异及 SNP 现象的研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (2): 85 - 89.
- [31] 周倩, 蒋贤慧, 杨晶晶, 等. 浙江乐清铁皮石斛 rDNA ITS 序列的克隆及序列比对 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29 (3): 513 - 517.
- [32] TSAI C C, PENG C I, HUANG S C, et al. Determination of the genetic relationships of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA [J]. Sci Hort, 2004, 101 (3): 315 - 325.
- [33] GRAVENDEEL B, EURLINGS M C M, VEN DEN BERG C, et al. Phylogeny of *Pleione* (Orchidaceae) and parentage analysis of its wild hybrids based on plastid and nuclear ribosomal ITS sequences and morphological data [J]. Systematic Botany, 2004, 29 (1): 50 - 63.
- [34] CHOCHAI A, LEITCH I J, INGROUILLE M J, et al. Molecular phylogenetics of *Paphiopedilum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on nuclear ribosomal ITS and plastid sequences [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2012, 170: 176 - 196.
- [35] SHARMA S K, DKHAR J, KUMARIA J, et al. Assessment of phylogenetic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer region of rDNA [J]. Gene, 2012, 495: 10 - 15.
- [36] AVISE J C, ARNOLD J, BALL R M, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. Ann Rev Ecol Syst, 1987, 18: 489 - 522.
- [37] 王静, 李明, 魏辅文, 等. 分子系统地理学及其应用 [J]. 动物分类学报, 2001, 26 (4): 431 - 439.
- [38] 王玲, 郭元涛, 钱增强, 等. 植物分子系统地理学及其研究进展 [J]. 西北植物学报, 2005, 25 (6): 1250 - 1258.
- [39] TREBLAY N O, SCHOEN D J. Molecular phylogeography of *Dryas integrifolia*: glacial refugia and post glacial recolonization [J]. Mol Ecol, 1999, 8: 1187 - 1198.
- [40] BROYLES S B. Postglacial migration and the loss of allozyme variation in Northern population of *Asclepias exaltata* (Asclepiadaceae) [J]. Am J Bot, 1998, 85 (9): 1091 - 1097.
- [41] SEWELL M M, PARKS C R, CHASE M W. Intraspecific chloroplast DNA variation and biogeography of north American *Liriodendron* L. (Magnoliaceae) [J]. Evolution, 1996, 50: 1147 - 1154.
- [42] TSAI C C, SHEUE C R, CHEN C H, et al. Phylogenetics and biogeography of the phalaenopsis violacea (Orchidaceae) species complex based on nuclear and plastid DNA [J]. Plant Biol, 2010, 53: 453 - 460.
- [43] TRANCHIDA-LOMBARDO V, CAFASSO D, CRISTAUDDO A, et al. Phylogeographic patterns, genetic affinities and morphological differentiation between *Epipactis helleborine* and related lineages in a Mediterranean glacial refugium [J]. Annals of Botany, 2011, 107 (3): 427 - 436.
- [44] STAHLBERG D, HEDREN M. Systematics and phylogeography of the *Dactylorhiza maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia: insights from cytological, morphological and molecular data [J]. Plant Syst Evol, 2008, 273: 107 - 132.