

核糖体 DNA ITS 区序列在植物 分子系统学研究中的价值

赵志礼 徐珞珊 董 辉 王峥涛

(中国药科大学生药学研究室, 南京 210038)

摘要: 本文就近年来国内外有关被子植物核糖体 DNA 中的内转录间隔区(ITS)序列在植物属内、近缘属间乃至科内系统发育研究中的应用, 结合作者在中国姜科山姜属(*Alpinia* Roxb.) 上的研究, 对 ITS 区序列在植物分子系统学研究中的价值作一简要综述, 对其应用前景也进行了讨论。

关键词: 分子系统学; 核糖体 DNA; ITS 区序列

中图分类号: Q949; Q7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)02-0050-05

Evaluation of ITS sequence of nrDNA in plant molecular systematics ZHAO Zhi-li, XU Luo-shan, DONG Hui, WANG Zheng-tao (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(2): 50~54

Abstract: This paper reviewed the application of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) internal transcribed spacer region (ITS) sequences in phylogenetic study of angiosperms at intra-inter genera or family levels in recent years at home and abroad. Combined with the research of Chinese *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae) by the authors, a brief summary of significance of ITS sequences on the study of molecular systematics of plants and discussion on its prospect of application are also given.

Key words: molecular systematics; nrDNA; ITS sequence

人们对周围赖以生存的各种植物的认识及其系统发育的研究, 是随着研究手段、实验方法及技术的不断提高而逐步深入的。从《诗经》、《神农本草经》、《本草纲目》、《植物名实图考》等鸿篇巨著中, 便可以看到我们的祖先对植物及其经济、药用价值和系统关系的认识历程。瑞典博物学家林奈根据植物花部形态特征建立了“性系统”, 英国科学家达尔文的《物种起源》提出了生物进化的学说, 植物遗传学规律的发现与应用, 用染色体的形态和数目进行系统学研究, 植物大量次生代谢产物的分离与结构鉴定及其系统学意义的探讨, 所有这些均表明植物系统学研究不断得到升华。而 20 世纪 50 年代 DNA 分子双螺旋结构的发现, 以及 PCR (polymerase chain reaction) 技术的建立, 使迅速地进行 DNA 序列的大量测定并应用于分子系统学的研究成为可能。结合形态学、解剖学、细胞学、遗传学等学科的研究成果, 从 DNA 分子水平揭示植物系统演化关系, 使植物系统学研究进入了一个新的时代。近年来, 国内外学者进行了大量卓有成效的分子系统学研究, 发表

了不少相关论文。本文仅简述近年来植物分子系统学研究中常用的基因种类, 并着重讨论核糖体 DNA ITS 区序列在被子植物科以下等级系统学研究中的应用价值。

1 植物分子系统学研究中 常用的基因片段

植物分子系统学研究的基本方法之一是对植物的一定 DNA 序列进行同源性比较, 构建系统树, 以此探讨它们的系统演化关系。基于目前现有的序列资料, 常用于系统学研究的基因片段有: 叶绿体基因组的 *matK*、*rbcL*、*ndhA*、*ndhD* 基因等^[1]; 核基因有核糖体 DNA 18S、26S 基因及 ITS 区等片段。叶绿体 *rbcL* 基因片段常用于属间及科级以上分类群

收稿日期: 1999-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39600010)

作者简介: 赵志礼, 男, 1956 年 11 月生, 甘肃兰州人, 博士, 副教授, 主要从事生药学、药用植物学、中药资源学等研究。

研究, *matK* 基因一般用于属间甚至种间关系的系统学研究。

有关 *rbcL* 基因的研究工作较多, 如 1993 年 Chase 等^[2] 发表了一篇颇有影响的论文, 涉及绝大部分种子植物科的类群(499 种种子植物), 基于 *rbcL* 基因序列探讨种子植物的系统演化关系。我国学者陈之端等^[3] 用叶绿体基因 *rbcL* 的核苷酸序列证据讨论马尾树科(Rhoipteleaceae)的系统位置。马尾树科只有 1 属 1 种: 马尾树(*Rhoiptelea chiliantha* Diels et Hand.-Mazz.), 产我国西南部及越南, 系统位置较为独特, 该科曾被置于荨麻目(Urticales); 有些学者认为该科与桦木科(Betulaceae)近缘, 另一些学者则持不同看法, 认为与胡桃科(Juglandaceae)有密切的系统关系。用花粉等形态学特征进行系统分析, 所得的结论更为复杂。分子系统学研究结果为解决该科的系统位置问题提供了有力证据: 分别利用 Cunoniaceae 科的 *Bauera* 属、“低等”金缕梅类植物连香树属(*Cercidiphyllum* Sieb. et Zucc.) 和枫香属(*Liquidambar* L.) 作为外类群进行分支分析, 得出两种彼此一致的分析结果。在 *rbcL* 基因树上, 马尾树与胡桃科的 3 个属的植物归为一支, 置信度(bootstrap value)100%。马尾树科与胡桃科有很近亲缘关系的观点得到了很好的支持。

尽管叶绿体基因载有重要的系统发育信息, 但叶绿体基因一般为单亲遗传, 在植物分子系统学研究中, 如遇解决网状进化一类问题时, 确有其局限性。而双亲遗传的核基因, 则显示了独到的优势。相信随着植物基因组全序列测定工作的不断深入, 可用于植物系统学研究的基因片段会越来越多, 使植物系统学研究的结果更为全面。

2 核糖体 DNA ITS 区的系统学价值

核糖体上的基因为多拷贝、中度重复序列, 一个重复单位由 5.8S、18S、26S 编码区以及一些间隔区组成。ITS(internal transcribed spacer)区位于 18S 和 26S 基因之间, 中部被 5.8S 一分为二, 即 ITS1 区与 ITS2 区。5.8S、18S、26S 进化速率慢, 常用于探讨科级和科级以上等级的系统发育问题^[4]。而间隔区如 ITS 区进化速率较编码区快, 一般用于研究较低等级如属间、种间甚至居群间的系统关系。

2.1 ITS 区序列在被子植物科内系统发育研究中的意义

从大量已发表的论文来看, 被子植物 ITS1 区与 ITS2 区的序列长度变异很小(均小于 300 bp); 研究结果证明在探讨一些被子植物科内的系统发育时, ITS 区提供的信息(包括网状进化的直接证据)是很有价值的, 它使我们对被子植物系统进化的认识又向前跨了一步^[5]。

假八角科(Winteraceae)在被子植物中是一个系统位置非常独特的科, 数十年来, 植物学家们认为它是假想早期有花植物祖先原型最古老的代表, 深入研究该科内系统发育关系, 对揭示被子植物的起源与进化历程无疑是一件非常有意义的工作。Suh 等^[6] 的研究说明 ITS 区序列在探讨此类古老原始的被子植物科内系统进化关系时, 显示了较高的系统学价值。Suh 等用 ITS 以及 5.8S 序列重建的假八角科的系统关系, 与形态学研究所得结论有很好的相关性。序列资料还在一些属的划分上, 提供了有力的证据。如 *Tasmannia* 属与 *Drimys* 属的关系, 一些学者认为前者应归于 *Drimys* 属。在该实验涉及的序列比较中, 两者序列间的变异最大, 显然将它们合并是不适宜的。另外, 序列分化百分比, *Tasmannia* 属与 *Drimys* 属之间为: ITS1, (11.33 ± 0.61)% ; ITS2, (29.55 ± 0.63)% ; *Drimys* 属与“*Bubbia-Zygogynum*”这一支成员之间的为 ITS1, (9.86 ± 0.36)% ; ITS2, (11.12 ± 0.98)% ; 在该科内达到最大。因此认为 nrDNA 资料暗含了这样一个信息, 即 *Drimys* 属来源于假八角科早期分化出来的一支。该研究还推测了假八角科 ITS 区序列核苷酸替代率: ITS1 区约为每年 $3.2 \times 10^{-10} \sim 5.2 \times 10^{-10}$ /位点; ITS2 区约为每年 $3.6 \times 10^{-10} \sim 5.7 \times 10^{-10}$ /位点。毛茛科(Ranunculaceae)铁破锣属(*Beesia* Balf. f. et W. W. Smith)仅有 2 种植物, 分布于我国西南部及缅甸。尽管为一小属, 但系统学家对其系统位置的处理意见不一, 争论的焦点为: 该属应置于金莲花族, 还是应置于升麻族, 或应将该属单列出来。汪小全等人^[7] 以 ITS 区序列证据探讨铁破锣属的系统位置, 认为该属为升麻族的自然成员, 并可能是升麻族植物中一个最原始的类群。

金缕梅科(Hamamelidaceae)全世界约 140 种, 也是一个古老的科, 在被子植物起源与系统演化中具有重要作用。由于该科独特的系统位置及科内各

种复杂的种系关系,一直吸引着不少分类学家的研究兴趣。但苦于已有资料的局限性,经典方法在解决此类问题上,显得有些力不从心。利用分子证据处理金缕梅科内复杂的系统演化关系,是近年来该科研究的又一特点。李建华等^[8]通过对金缕梅科弗特吉族(*Fothergilleae*)7属代表植物 nrDNA ITS 区的序列测定,利用 *Corylopsideae* 族的蜡瓣花属植物 *Corylopsis pauciflora* 等作外类群,进行系统分析,认为蚊母族(*Distylieae*)和狭义的弗特吉族均不形成自己的单系分支,因此,支持将两族合并为广义的弗特吉族;并认为银缕梅属(*Shaniodendron*)同帕罗堤属(*Parrotia*)有着密切的亲缘关系;根据该片段核苷酸序列的演化速率推算出的银缕梅属和帕罗堤属属间分化时间为晚中新世,此结论大致与化石记录相符。施苏华等^[9]对金缕梅科四药门花属(*Tetrathyrium* Benth.)及其近缘属植物进行了 ITS 区序列分析和系统学意义的探讨,结果显示:被分析的金缕梅亚科(*Hamamelidoideae*)植物形成一个单系群,亚科内和其中的金缕梅族(*Hamamelideae*)内部呈复系演化的特征;四药门花属与榉木属(*Loropetalum* R. Br.)属于同一个单系类群,它们与金缕梅属(*Hamamelis* L.)的亲缘关系较远;文中还就一些族的系统位置进行了讨论。

蔷薇科(*Rosaceae*)植物不仅具有很高的经济价值,而且其习性、花托形状、果实类型均呈多样性。由于该科植物存在着广泛的属间杂交以及多倍体现象等,使得其系统学研究更为复杂化。Campbell 等人^[10]应用 nrDNA ITS 区以及一小部分 5.8S 基因序列,结合形态学证据,在探讨蔷薇科属间杂交较为普遍的苹果亚科(*Maloideae*)内的系统发育关系中,做了有益的尝试。苹果亚科约有 28 属 900 多种植物,Campbell 等选取了有代表性的 19 属,并以蔷薇科另 3 个亚科(*Amygdaloideae*, *Rosoideae*, *Spiraeoideae*)的 4 种植物为外类群,重建了苹果亚科的系统发育关系。结果表明,该亚科并非单系;传统分类中被置于绣线菊亚科(*Spiraeoideae*)的 *Vauquelinia* 属与苹果亚科的枇杷属(*Eriobotrya* Lindl.)、石斑木属(*Rhaphiolepis* Lindl.)一起形成了强支持的一支,该支与由苹果亚科其他属构成的一支显示出姐妹群关系。将苹果亚科 ITS 区序列与新近的形态学、木材解剖学研究资料进行的综合系统学分析,其结论与根据 ITS 区序列所得基本一

致。自然界中杂交现象在有些植物类群之间是比较普遍的,要揭示它们的系统演化关系,应用单亲遗传的叶绿体基因组资料远远不够;而核基因组序列资料就显得尤为重要,Campbell 等人的工作很好地说明了这一点。

苦苣苔科(*Gesneriaceae*)中的苦苣苔亚科(*Cyrtandroideae*)主要分布于亚洲及非洲热带地区。该亚科内族之间的系统关系比较复杂,争议颇多。汪小全等^[12]应用 nrDNA ITS 区以及部分 5.8S 序列,对苦苣苔亚科 4 族代表植物进行了系统学研究,认为:尖舌苣苔族(*Klugieae*)可能是苦苣苔亚科中一个较特殊的孤立类群,将其作为一个族的等级是合适的。建议将浆果苣苔族(*Cyrtandreae*)和芒毛苣苔族(*Trichosporeae*)均并入长蒴苣苔族(*Didymocarpeae*)。

2.2 ITS 区序列在探讨属下等级系统发育中的价值

ITS 序列资料在探讨属下等级的系统进化关系以及种系关系时,也体现了应有的价值。Alice 与 Campbell 对蔷薇亚科(*Rosoideae*)的大属——悬钩子属(*Rubus* L.)进行了 nrDNA ITS 区序列分析与系统学研究^[11]。悬钩子属有 12 亚属约 400 多种,实验材料不仅覆盖了所有各亚属,而且还包括了单型近缘种 *Dalibarda repens* L.,共 57 个类群,并以 *Fullugia* 属、路边青属(*Geum* L.)和林石草属(*Waldsteinia* Willd.)为外类群。分析结果显示:ITS 区序列在悬钩子属下亚属水平上提供的信息量较大,而在近缘种之间变异性较低。基因树中,*D. repens* 与悬钩子属各类群共同构成强支持的一支;在取样多于一个种的亚属中,仅有 *Orobatus* 亚属显示单系。*R. ursinus* 为 *Rubus* 亚属植物,其与 *Idaeobatus* 亚属的夏威夷特有种 *R. macraei* 显示姐妹群关系;进一步的序列多态性分析表明,*R. ursinus* 可能是 *R. macraei* 近缘类群与 *Rubus* 亚属另一类群的杂交后裔。另外,ITS 序列分析结果还肯定了染色体倍性资料在悬钩子属系统发育研究中的价值,并揭示在以往的分类学研究中比较重视枝刺、叶型特征,对它们的系统学意义似应加以限定。

Lamiaceae 科 赧 桐 属 (*Clerodendrum* L.) 约有 400 多种植物,主要分布于东半球的热带、亚热带地区。由于该属植物表现出了较高幅度的形态学变异,因此对其系统学方面的争论一直没有间断。如

曾被分为属下两大类的 *Clerodendrum* 与 *Cyclonema*, 不同学者又将其处理为组级、亚属级或属级水平的类群。虽有表征分类学与支序分类学的研究工作提示广义的赧桐属并非一个自然分类群, 但仍缺乏足够有说服力的证据。Steane 等^[13]基于 nrDNA ITS 区序列等分子资料之上的有关该属的系统学研究, 很好地解决了这个问题。他们的工作涉及广义赧桐属 33 种植物, 同时选取 5 个外类群属。值得一提的是, 在系统关系分析中, 结合了先前所得到的叶绿体 DNA(cpDNA)限制位点资料, 并加以比较, 使结论更为客观。由 ITS 区序列资料(包括 5.8S)构建的基因树, 将其分为 4 支(I~IV), 进一步的分析显示广义的赧桐属为多系群, 主要分支情况、“多系群”的结论与由 cpDNA 限制位点及其序列资料^[14]所得推断相一致。核基因组资料与叶绿体基因组资料均表明该属以往的分类系统不适当, 应予以订正: 狭义赧桐属包括基因树中的 3 支(I~III), 而将 *Cyclonema*(包括 *Konocalyx* 组)恢复为一个独立的属 *Rotheca* Raf. 是合理的。

Cerbah 等^[15]用 nrDNA ITS 区序列探讨了菊科(Asteraceae) *Hypochaeris* 属内的分子系统发育与染色体进化问题。 *Hypochaeris* 属在该科中是一小属, 但存在的分类学争论却不少。就其种类而言, 一说约 50 种, 另一说则认为约 100 种。多产于南美。该属有两个分化中心: 一个在地中海地区, 一个在南美地区。Cerbah 等选取地中海种类 10 种, 南美种类 4 种, 并以 *Leontodon hispidus* 与 *Hyoseris scabra* 作外类群, 测定了 ITS 区序列, 结果显示 *Hypochaeris* 属(包括有争议的 *H. robertia*)是一单系群。所构建的系统树, 可很好地分辨出四个主支, 其中 *H. robertia* 一种单独构成一支。在分析染色体的进化关系时, 由 ITS 序列得出的系统关系与染色体特征基本吻合。在系统树中, 除了 *H. glabra* ($2n=10$) 与 *H. radicata* ($2n=8$)组成的这一支外, 每一支均显示了同一个染色体数目。而这两种植物染色体数目虽不同, 但亲缘关系很近, 极易进行自然与人工杂交。研究结果还表明, *Hypochaeris* 属内染色体进化与以前的一些假设不同: 其属内核型进化可能是自祖种 4 或 5 的染色体基数进行非整倍的增加与减少, 并伴随着一些染色体的重排。该研究工作显示了 ITS 序列资料在揭示一些双子叶植物高级类群如菊科内系统发育关系时的价值。

作者测定并分析了中国姜科(Zingiberaceae)山姜属(*Alpinia* Roxb.)19 个分类群的 ITS 区序列, 以姜属(*Zingiber* Boehm.)为外类群进行系统分析, 结果显示: 山姜属植物各类群间分化较大, 信息位点占总位点的 24.5%, 说明 ITS 片段序列适合山姜属属下等级的系统学研究^[16]。

顾京等^[17]对野生大豆与栽培大豆 ITS1 区序列进行了分析; 惠东威等^[18]则用 ITS1 区序列构建了大豆属(*Glycine* Willd.)12 个种(24 个种系)的种系关系。

在不同的植物类群以及不同的分类等级上, ITS 区序列的价值不一样。葛颂等^[19]测定了裂叶沙参(*Adenophora lobophylla* Hong)和同属全部 2 组 7 亚组共 10 个代表种的 ITS 片段的序列, 并以风铃草属(*Campanula* L.)为外类群。在重点探讨了裂叶沙参分类地位的同时, 分析了 ITS 区片段序列在桔梗科(Campanulaceae)沙参属(*Adenophora* Fisch.)系统发育重建中的价值。结果表明, 裂叶沙参与大花盘亚组的 *A. himalayana* 组成一支, 与根据形态学和杂交实验所得出的推断不同。值得注意的是, 沙参属种间在 ITS 片段上的分化很小(0.0%~3.9%), 属内差异最大的组间仅有 10 个碱基的替换, 亚组间的差异就更小了。因此, 在探讨近缘种的关系时, 分辨率不够。

3 尚待解决的问题及应用前景

综上所述, ITS 区序列分析已在被子植物分子系统学研究中发挥了重要作用, 为解决一些长期存在的系统分类争议提供了令人信服的证据, 但还有许多工作要做: (1) 国产特有类群的序列资料相对缺乏。(2) 由于 ITS 区序列的进化速率比较快, 一些序列具有杂合位点。因此, 可将克隆测序法与 PCR 直接测序法相结合, 加大测序样本量(包括同时对多个克隆进行测序); 结合其他学科的研究资料, 推断杂交亲本以及种系的发生, 探讨杂合位点在分子系统进化上的意义。相信在这方面的突破, 可能会使人们对 ITS 区的价值有一个新的认识。(3) 就现有的研究结果来看, ITS 区序列种间甚至居群间的分辨率是比较好的, 所以选用此片段作为中药材的分子标记是适宜的。可根据完整的相关序列, 选用适当的分子鉴定技术, 并摸索出有效的方法, 进

行中药材的真伪鉴定甚至品质上的评价。目前植物总DNA的提取方法已比较完善,可从长期贮存的标本中进行提取、扩增与测序,使中药材的分子鉴别在方法学上得到保证。

随着分子生物学的飞速发展,人们将会对ITS区序列及其植物分子系统学价值有更广泛深入的了解。

参考文献

- [1] 汪小全,洪德元. 植物分子系统学近五年的研究进展概况[J]. 植物分类学报,1997,35(5):465~480.
- [2] Chase M W, Soltis D E, Olmstead R G, *et al.* Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*[J]. Ann Missouri Bot Gard, 1993, 80: 528~586.
- [3] 陈之端,汪小全,孙海英,等. 马尾树科的系统位置:来自 *rbcL* 基因核苷酸序列的证据[J]. 植物分类学报,1998,36(1):1~7.
- [4] Soltis D E, Soltis P S, Nickrent D L, *et al.* Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences [J]. Ann Missouri Bot Gard, 1997, 84: 1~49.
- [5] 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: 247~277.
- [6] 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.
- [7] 汪小全,邓崢嵘,洪德元. 铁破锣属的系统位置——ITS (nrDNA)序列证据[J]. 植物分类学报,1998,36(5):403~410.
- [8] 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.
- [9] 施苏华,黄椰林,章群,等. 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(1):87~95.
- [10] Campbell C S, Donoghue M J, Baldwin B G, *et al.* Phylogenetic relationships in Maloideae (Rosaceae): evidence from sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and its congruence with morphology [J]. Amer J Bot, 1995, 82(7): 903~918.
- [11] Allice 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.
- [12] 汪小全,李振宇. rDNA 片段的序列分析在苦苣苔亚科系统学研究中的应用[J]. 植物分类学报,1998,36(2):97~105.
- [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] Steane D A, Scotland R W, Mabberley D J, *et al.* Phylogenetic relationships of *Clerodendrum* s. l. (Lamiaceae) inferred from chloroplast DNA [J]. Syst Bot, 1997, 22: 229~244.
- [15] 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.
- [16] 赵志礼. 中国山姜属植物系统分类学研究[D]. 南京:中国药科大学生药学研究室. 1999.
- [17] 顾京,惠东威,庄炳昌,等. 野生大豆与栽培大豆 rDNA ITS1 区的研究[J]. 植物学报,1994,36(10):759~764.
- [18] 惠东威,陈受宜,庄炳昌. 利用 rRNA 基因 ITS-1 序列构建的大豆属(*Glycine*)12 个种的种系关系[J]. 中国科学(C辑), 1997,27(4):327~333.
- [19] 葛颂, Schaal B A, 洪德元. 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究中的价值[J]. 植物分类学报,1997,35(5):385~395.

(责任编辑:惠红)

《植物资源与环境学报》加入 《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”的声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。作者著作使用权与本刊稿酬一次性付给,如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将作适当处理。