

# 乳白石蒜 rDNA - ITS 序列分析及种内系统发育研究

陈妍, 高燕会<sup>①</sup>, 廖望仪, 童再康

(浙江林学院林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 对来源于不同产地的 11 个乳白石蒜 (*Lycoris albiflora* Koidz.) 种源的 rDNA - ITS 序列进行了扩增、纯化、克隆、酶切和测序, 并对各种源的 rDNA - ITS 序列长度、G + C 含量、碱基差异和遗传距离进行了比较分析, 构建了系统发育树。结果表明, 乳白石蒜 11 个种源的 rDNA - ITS 序列具有较高的同源性, 但不同种源间的 ITS 序列长度和碱基变异较大; 乳白石蒜 rDNA - ITS 序列总长度约为 700 bp, 共有 318 个变异位点; ITS1、ITS2 和 5.8S rDNA 片段长度分别为 222 ~ 245、240 ~ 252 和 163 bp; ITS 序列中的 G + C 含量均明显高于 A + T 含量, ITS1 和 ITS2 片段中的 G + C 含量分别为 53.8% ~ 70.5% 和 63.4% ~ 73.4%; 碱基变异类型多为颠换、转换、插入和缺失。种源间的遗传距离差异较大, 其中浙江天目山种源 (TM3) 与浙江宁波种源 (NB2) 的遗传距离最小 (0.000), 其他种源间遗传距离为 0.067 ~ 0.323。基于 ITS 序列分析结果可将 11 个乳白石蒜种源聚为 3 大类, 第 1 类包括采自浙江天目山 (TM1 和 TM2) 和浙江宁波 (NB3) 的 3 个种源, 花和花丝多为白色; 第 2 类包含来源于不同产地的 7 个种源, 花多为乳白色或乳黄色; 第 3 类仅有采自浙江兰溪 (LX) 的 1 个种源, 花色变异较大。研究结果表明, 乳白石蒜种内有丰富的遗传变异, 种源间的 ITS 序列差异与花的特征变化一致, 但与地理分布并不相关; rDNA - ITS 序列分析可用于乳白石蒜的亲缘关系、物种鉴别和遗传多样性研究。

**关键词:** 乳白石蒜; rDNA - ITS 序列; G + C 含量; 遗传距离; 系统发育

中图分类号: Q946 - 33; S682.2 \* 9 文献标志码: A 文章编号: 1004 - 0978 (2009) 03 - 0025 - 07

**Analysis on rDNA-ITS sequence and research of intra-specific phylogeny of *Lycoris albiflora***  
CHEN Yan, GAO Yan-hui<sup>①</sup>, LIAO Wang-yi, TONG Zai-kang (School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(3): 25 - 31

**Abstract:** The rDNA-ITS sequence of eleven provenances of *Lycoris albiflora* Koidz. from different locations was amplified, purified, cloned, enzyme digested and sequenced. Sequence length, G + C content, base difference and genetic distance of rDNA-ITS sequence of different provenances of *L. albiflora* were comparatively analyzed, and the phylogenetic dendrogram was constructed, too. The results show that the rDNA-ITS sequence of *L. albiflora* is great homologous, but variations in total length of rDNA-ITS sequence and base among different provenances are greater. Total length of rDNA-ITS sequence is about 700 bp and there are 318 variable sites. The fragment length of ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA is 222 - 245, 240 - 252 and 163 bp, respectively. G + C content in rDNA-ITS sequence is higher than A + T content, and G + C content in ITS1 and ITS2 fragments is 53.8% - 70.5% and 63.4% - 73.4%, respectively. Most of nucleotide variations of rDNA-ITS sequence of *L. albiflora* are transversion, conversion, insertion and deletion. The difference of genetic distance among provenances is greater, in which the genetic distance between TM3 from Tianmu Mountain of Zhejiang and NB2 from Ningbo of Zhejiang is 0.000, and that among other provenances is 0.067 - 0.323. The eleven provenances are clustered into three groups based on analysis result of rDNA-ITS sequence. The first group contains three provenances (TM1 and TM2 from Tianmu Mountain of Zhejiang and NB3 from Ningbo of Zhejiang), their flowers and filaments are mostly white. The second group contains seven provenances from different locations, their flowers are mostly milky white and buff. The third group only

收稿日期: 2008 - 12 - 08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600484); 浙江省自然科学基金项目 (Y305349)

作者简介: 陈妍 (1982—), 女, 四川都江堰人, 硕士研究生, 主要从事植物遗传育种方面的研究。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: gaoyanhui408@126.com

contains one provenance (LX from Lanxi of Zhejiang), and the variation of its flower color is greater. It is suggested that there are rich intra-specific genetic variations in *L. albiflora*, and the difference of rDNA-ITS sequence is identical with the change of flower character, but is uncorrelated with the geographical distribution of these provenances. It is concluded that the rDNA-ITS sequence analysis can be used in researches of genetic relationship, species identification and genetic diversity of *L. albiflora*.

**Key words:** *Lycoris albiflora* Koidz.; rDNA-ITS sequence; G + C content; genetic distance; phylogeny

乳白石蒜 (*Lycoris albiflora* Koidz.) 隶属于石蒜科 (Amaryllidaceae) 石蒜属 (*Lycoris* Herb.), 其花型中等、花色变异丰富且多为乳白色, 是一种潜在的园艺花卉植物。乳白石蒜染色体数目变异较多<sup>[1-2]</sup>, 是石蒜属植物中自然变异最多的种类。乳白石蒜不能自然结实, 其各种自然变异主要通过无性分鳞茎方式得以保存。目前, 在形态学、细胞遗传学和分子生物学等方面对石蒜属植物的起源和亲缘关系的研究均已取得了一定的成果<sup>[3-8]</sup>, 而有关乳白石蒜的起源和种内遗传多样性的研究还未见报道。

分子标记和 DNA 指纹分析等技术已广泛应用于植物种间遗传差异和亲缘关系的研究, 也可用于农作物种质鉴定及中药品种的鉴定<sup>[9-11]</sup>。核糖体 DNA (rDNA) 转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列的进化速度快且片段长度不大, 在种内不同基因型间存在大量的多样性。目前, rDNA - ITS 多态性检测已成为在 DNA 序列水平上探讨植物种间及种内遗传变异和系统发育十分有效的手段之一<sup>[12-13]</sup>。

作者选取来自于 6 个不同产地的 11 个具有代表性的乳白石蒜种源, 对 rDNA - ITS 序列进行克隆和测序, 从基因水平上探讨乳白石蒜的种内遗传多样性, 以为乳白石蒜新品种的辅助鉴定及其栽培、繁育和质量评价提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试的 11 个乳白石蒜种源的编号、采集地和花形态特征如下: TM1 采自浙江天目山, 花乳白色、花丝全白、花被片腹面和背面中肋淡红色; TM2 采自浙江天目山, 花乳白色、花丝全白、花型特殊; TM3 采自浙江天目山, 花白色、花丝和花柱上部均为粉红色、下部均为白色, 有些花瓣有明显红色条纹; NB1 采自浙江宁波, 花乳黄色、花丝全白、花柱上部红色;

NB2 采自浙江宁波, 花乳白色, 花丝全白, 花柱上部红色, 花瓣先端微红; NB3 采自浙江宁波, 花被乳白色, 花丝与花柱顶端淡蓝色、下部乳白色; LC1 采自江苏宜兴林场, 花乳白色, 花丝上部粉红、下部白色; LC2 采自江苏宜兴林场, 花淡黄色, 花被片皱褶并反卷、无条纹和斑点, 花丝全白, 花柱上部淡红色; HF 采自江苏宜兴湖滢镇, 花乳黄色, 花被片中部有淡黄色条纹且下部明显、上部不明显, 花被片反卷并皱褶, 花丝全白, 花柱上部淡红色; LX 采自浙江兰溪, 花被腹面中部橘红色、中肋由花被管延伸至花被片顶端、边缘乳白色, 花丝顶端与花柱上部玫瑰色、下部乳白色; JA 引种自日本, 花乳白色, 花被腹面散生少量粉红色条纹、背面具红色中肋。

11 个乳白石蒜种源均种植于浙江林学院遗传学科苗圃地。分别于 2008 年 3 月和 10 月采集乳白石蒜的幼嫩叶片, 置于 -70 °C 低温冰箱中保存备用。克隆用宿主菌为大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 克隆载体为 pGEM - T Easy Vector (购自 Promega 公司), 实验用 UniQ - 10 柱式质粒小量抽提试剂盒、纯化试剂盒、Taq DNA 聚合酶和 DNA marker 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司, EcoR I 内切酶购自 TaKaRa 生物工程有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及检测 采用 CTAB 法和硅珠法相结合的方法<sup>[4]</sup> 提取乳白石蒜基因组 DNA, 并用 U - 008OD 核酸/蛋白测定仪检验 DNA 的浓度和纯度, 取适量 DNA 样品用质量体积分数 1% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  EB) 电泳, 电泳结束后在 Gene Genius Bio Imaging System (Bio-Rad) 凝胶成像系统下观察并照相。

1.2.2 ITS 序列的扩增和纯化 根据真核生物 rDNA - ITS 序列的通用引物和石蒜属植物 18S - 26S rDNA 序列设计引物, 上游引物 P1 的序列为: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAA - 3', 下游引物 P2 的序列为: 5' - AGAAGTCGTAACAAGTTT

CCGTAGG - 3'。

以 11 个乳白石蒜的 rDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系总体积为 50  $\mu\text{L}$ ,包括:1  $\times$  PCR buffer、1 U *Taq* DNA 聚合酶、2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ 、0.3  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs、0.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物和 30 ~ 50 ng 模板 DNA。反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,58  $^{\circ}\text{C}$  退火 40 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,共 35 个循环;最后于 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应结束后,以 DNA ladder 作为分子量标记(DNA marker),用质量体积分数 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  EB)进行电泳,对反应产物进行检测。电泳结束后,在 Gene Genius Bio Imaging System (Bio-Rad)凝胶成像系统下观察和拍照。

用上海生工生物工程技术有限公司生产的纯化试剂盒对扩增的 rDNA - ITS 片段进行纯化,纯化后的 18S - 26S rDNA 基因及其间隔序列片段由上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.3 PCR 扩增产物的克隆和测序 取适量纯化的 PCR 扩增产物,加入 pGEM - T Easy 载体与连接液,4  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行连接反应并过夜。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,于 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养过夜后,每个样品挑取 5 个白色阳性菌落进行培养,采用 UniQ - 10 柱式质粒小量抽提试剂盒对重组质粒 DNA 进行提取和纯化,并用 P1 和 P2 引物对质粒 DNA 进行 PCR 检测,初步鉴定出含有 rDNA - ITS 序列的阳性克隆;然后提取出阳性克隆

的质粒 DNA,使用 *EcoR* I 进行酶切检测。由上海生工生物工程技术有限公司对 rDNA - ITS 序列的阳性克隆转化菌液进行测序。

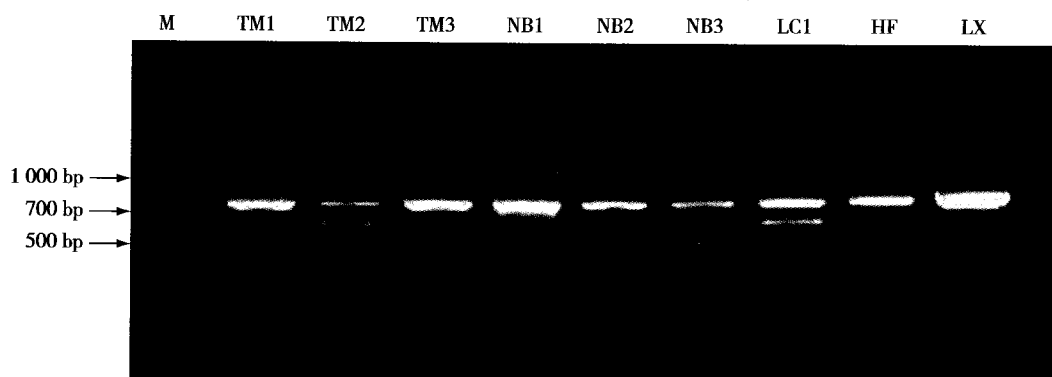
### 1.3 数据处理

将乳白石蒜 18S - 26S rDNA 序列输入到 NCBI 上的 Genbank 中用 Blastn 进行比对,发现供试的 11 个乳白石蒜 18S - 26S rDNA 序列与已登录的石蒜属植物的 18S - 26S rDNA 序列<sup>[14]</sup> 具有高度的同源性。据此,界定出 11 个乳白石蒜种源的 18S - 26S rRNA 基因及其间隔区各部分的序列,并用 DNAMAN (5.2.2) 软件进行对位排列,然后进行人工比对,并构建系统发育树。

## 2 结果和分析

### 2.1 乳白石蒜 rDNA - ITS 序列 PCR 扩增产物的分析

2.1.1 PCR 扩增产物的直接电泳结果分析 以乳白石蒜基因组 DNA 为模板进行 rDNA - ITS 序列的 PCR 扩增反应,扩增产物直接用质量体积分数 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,部分种源 PCR 扩增产物的电泳结果见图 1。从图 1 可以看出,9 个乳白石蒜种源 rDNA 的扩增产物均在 700 ~ 800 bp 处有 1 条清晰的特异性条带,该条带长度与 ITS 序列(含 5.8S rDNA)长度接近。



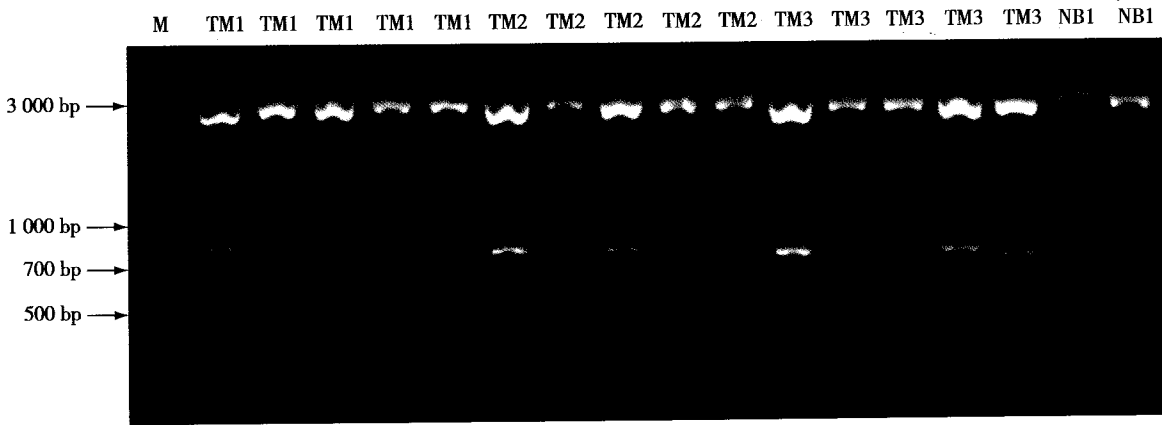
M: DNA 分子量标记 DNA molecular weight marker; TM1 - TM3: 浙江天目山 Tianmu Mountain of Zhejiang; NB1 - NB3: 浙江宁波 Ningbo of Zhejiang; LC1: 江苏宜兴林场 Yixing forest farm of Jiangsu; HF: 江苏宜兴湖滏镇 Hufu Town in Yixing of Jiangsu; LX: 浙江兰溪 Lanxi of Zhejiang.

图 1 不同产地乳白石蒜 rDNA - ITS 序列部分 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig. 1 The electrophoretogram of some PCR amplified products of rDNA-ITS sequence of *Lycoris albiflora* Koidz. from different locations

2.1.2 阳性克隆质粒 DNA 的酶切结果分析 乳白石蒜 rDNA - ITS 序列 PCR 扩增产物阳性克隆的质粒 DNA 经 *EcoR* I 酶切后的电泳图谱见图 2。由图 2 可见,酶切后,在重组质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

图谱上显示出 2 条 DNA 条带,其中,长度约为 3.0 kb 的条带为载体 DNA 片段,而长度约为 700 bp 的 DNA 条带则应为目的片段,即乳白石蒜的 rDNA - ITS 序列。



M: DNA 分子量标记 DNA molecular weight marker; TM1 - TM3: 浙江天目山 Tianmu Mountain of Zhejiang; NB1: 浙江宁波 Ningbo of Zhejiang.

图 2 经过 *EcoR* I 酶切后部分乳白石蒜 rDNA - ITS 序列重组质粒 DNA 的电泳图谱  
Fig. 2 The electrophoretogram of recombinant plasmid DNA of some rDNA-ITS sequence of *Lycoris albiflora* Koidz. after *EcoR* I enzyme digested

## 2.2 乳白石蒜 rDNA - ITS 序列分析

由于采用 PCR 扩增产物直接进行测序的结果用 CodonCode 软件无法查出引物序列,因此,为保证测序的准确性,采用克隆测序的方法进行乳白石蒜 rDNA - ITS 序列(包含 18S rDNA、28S rDNA 和 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2)的测定。根据已登录的石蒜属植物的 18S - 26S rDNA 序列确定 ITS 序列范围,并用 CodonCode 软件对乳白石蒜不同种源的 rDNA -

ITS 序列进行排位比对,界定出乳白石蒜 rDNA 的 18S - 26S rRNA 基因及其间隔序列各部分的序列。

序列分析结果表明(表 1),11 个乳白石蒜种源的 rDNA - ITS 序列具有高度的同源性,但 ITS 序列的长度变异较大,其中,ITS1 序列长度为 222 ~ 245 bp,ITS2 序列长度为 240 ~ 252 bp;5.8S rDNA 序列比较保守,长度为 163 bp。

表 1 不同产地乳白石蒜 rDNA - ITS 序列的碱基含量和序列长度分析

Table 1 Analysis of base content and sequence length of rDNA-ITS sequence of *Lycoris albiflora* Koidz. from different locations

编号 No.	产地 Location	序列长度/bp Sequence length			ITS1 的碱基含量/% Base content of ITS1		ITS2 的碱基含量/% Base content of ITS2	
		ITS1	ITS2	5.8S	G + C	A + T	G + C	A + T
TM1	中国浙江天目山 Tianmu Mountain of Zhejiang in China	226	252	163	61.7	38.3	67.9	32.1
TM2	中国浙江天目山 Tianmu Mountain of Zhejiang in China	226	240	163	63.7	36.3	66.7	33.3
TM3	中国浙江天目山 Tianmu Mountain of Zhejiang in China	224	240	163	70.5	29.5	72.6	27.4
NB1	中国浙江宁波 Ningbo of Zhejiang in China	224	240	163	64.6	35.4	70.6	29.4
NB2	中国浙江宁波 Ningbo of Zhejiang in China	224	240	163	70.5	29.5	72.6	27.4
NB3	中国浙江宁波 Ningbo of Zhejiang in China	222	242	163	57.9	42.1	63.4	36.6
LC1	中国江苏宜兴林场 Yixing forest farm of Jiangsu in China	226	242	163	63.7	36.3	66.1	33.9
LC2	中国江苏宜兴林场 Yixing forest farm of Jiangsu in China	222	240	163	69.0	31.0	70.6	29.4
HF	中国江苏宜兴湖滏镇 Hufu Town in Yixing of Jiangsu in China	220	240	163	69.2	30.8	73.0	27.0
LX	中国浙江兰溪 Lanxi of Zhejiang in China	225	242	163	53.8	46.2	66.1	33.9
JA	日本 Japan	226	240	163	65.5	34.5	73.4	26.6

一般情况下, G + C 含量是反映属种间亲缘关系的遗传型特征, 每个物种的 DNA 具有特定的 G + C 含量, 不同物种的 G + C 含量不同; 亲缘关系越近, 不同物种间的 G + C 含量差异越小; G + C 含量越高, 其变异也越小<sup>[15]</sup>。表 1 的统计分析结果表明, 乳白石蒜 ITS1 和 ITS2 序列中的 G + C 含量均明显高于 A + T 含量, 且 ITS1 序列中的 G + C 含量比 ITS2 序列变化稍大, ITS1 序列中的 G + C 含量为 53.8% ~ 70.5%, ITS2 序列中的 G + C 含量为 63.4% ~ 73.4%, 可见乳白石蒜种内的 G + C 含量变异较大。

### 2.3 乳白石蒜种源间 ITS 序列的差异及遗传距离分析

乳白石蒜 ITS 序列的碱基变异较为丰富, 约有 318 个变异位点。碱基变异类型有 G - A 和 C - T 转换, C - G 和 T - A 颠换, 插入或缺失变异。例如, 采自浙江兰溪(LX)的乳白石蒜的 ITS1 序列分别在 50 bp 处缺失碱基 G, 在 60 bp 处缺失碱基 C, 在 110 bp

处缺失 3 个碱基(GTC\GCC); 采自浙江天目山和宁波的乳白石蒜 TM3 和 NB2 种源的 ITS1 序列在 20 ~ 21 bp 处存在 G - A 和 C - T 转换; 采自浙江天目山的乳白石蒜种源 TM1 的 ITS2 序列在 35 bp 处插入 1 个碱基 G 等。序列比对结果表明, 乳白石蒜种源间的 ITS 区序列存在很大差异, 说明乳白石蒜的遗传多样性不仅仅体现在表观(形态)上, 其内在的基因序列也是丰富多变的, 这一特性为乳白石蒜的遗传改良提供了更多的种质资源。

采用 DNAMAN 分析得到的乳白石蒜 11 个种源 ITS 序列 Kimura 双参数法遗传距离见表 2。由表 2 可以看出, 浙江宁波种源 NB2 与浙江天目山种源 TM3 的遗传距离最小, 为 0.000, 表明它们的 ITS 序列是同源序列; 江苏宜兴湖滏镇种源 HF 与浙江天目山种源 TM3 以及浙江宁波种源 NB2 的遗传距离也较小, 仅为 0.067; 其余乳白石蒜种源间的遗传距离均为 0.088 ~ 0.323, 表明乳白石蒜种内有丰富的遗传变异。

表 2 基于 ITS 序列差异的乳白石蒜种源间的遗传距离(Kimura 双参数法)<sup>1)</sup>

Table 2 The genetic distance among different provenances of *Lycoris albiflora* Koidz. based on ITS sequence variances (Kimura two-parameter method)<sup>1)</sup>

编号 No.	遗传距离 Genetic distance										
	TM1	TM2	TM3	NB1	NB2	NB3	LC1	LC2	HF	LX	JA
TM1	0										
TM2	0.174	0									
TM3	0.175	0.159	0								
NB1	0.184	0.191	0.099	0							
NB2	0.175	0.159	0.000	0.099	0						
NB3	0.225	0.244	0.174	0.175	0.174	0					
LC1	0.230	0.218	0.138	0.149	0.138	0.197	0				
LC2	0.206	0.203	0.088	0.123	0.088	0.181	0.159	0			
HF	0.163	0.165	0.067	0.105	0.067	0.178	0.129	0.088	0		
LX	0.298	0.323	0.225	0.160	0.225	0.245	0.244	0.252	0.225	0	
JA	0.167	0.163	0.117	0.139	0.117	0.221	0.156	0.123	0.097	0.261	0

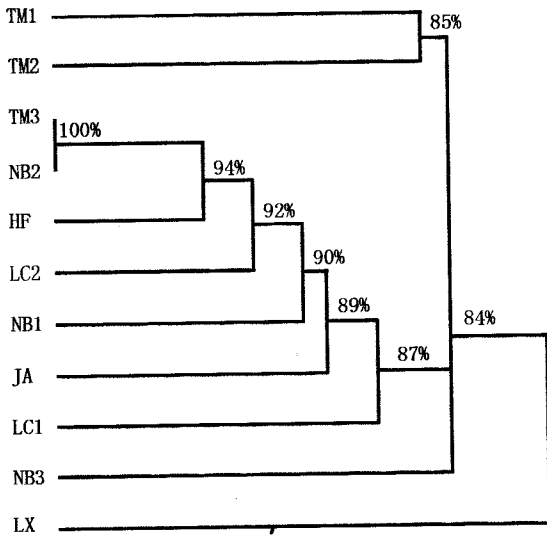
<sup>1)</sup> TM1 - TM3: 中国浙江天目山 Tianmu Mountain of Zhejiang in China; NB1 - NB3: Ningbo of Zhejiang in China; LC1 - LC2: 中国江苏宜兴林场 Yixing forest farm of Jiangsu in China; HF: 中国江苏宜兴湖滏镇 Hufu Town in Yixing of Jiangsu in China; LX: 中国浙江兰溪 Lanxi of Zhejiang in China; JA: 日本 Japan.

### 2.4 基于 ITS 序列的乳白石蒜系统发育分析

依据乳白石蒜种内 ITS 序列构建的系统发育树见图 3。由图 3 可以看出, 乳白石蒜不同种源的 ITS 序列的同源性百分率达 80% 以上。按照碱基序列的同源性并结合花形态特征大致可以聚为 3 类: 第 1 类包括 TM1、TM2 和 NB3 等 3 个种源, 前两者采自浙江天目山, 后者采自浙江宁波, 花色和花丝均为白

色; 第 2 类包含 TM3、NB2、HF、LC2、NB1、JA 和 LC1 等 7 个种源, 花色多为乳白或者乳黄色; 第 3 类仅有浙江兰溪(LX)1 个种源, 花被腹面中部橘红色、中肋由花被管延伸至花被片顶端、边缘乳白色, 花丝顶端与花柱上部玫瑰色、下部乳白色, 是花形态变异最大的种源。在基于 ITS 序列所作的聚类分析中, 除了浙江兰溪种源与其他种源在花形态特征上有明显差

异且地理分布上也具有一定距离外,其他种源特别是被聚在第2类中的7个种源,尽管花形态具有一定的相似性并具有一定的序列同源性,遗传距离也较近,但它们的地理分布距离却并不一致,这一现象说明乳白石蒜种源间的 ITS 序列差异与其花部特征变化一致,但与各种源的地理分布并不相关。



TM1 - TM3: 中国浙江天目山 Tianmu Mountain of Zhejiang in China; NB1 - NB3: Ningbo of Zhejiang in China; LC1 - LC2: 中国江苏宜兴林场 Yixing forest farm of Jiangsu in China; HF: 中国江苏宜兴湖滏镇 Hufu Town in Yixing of Jiangsu in China; LX: 中国浙江兰溪 Lanxi of Zhejiang in China; JA: 日本 Japan. 图中的百分数为各种源间 ITS 序列的同源性百分率 The percentages in the figure are homologous percentage of ITS sequences among different provenances.

图3 基于 ITS 序列构建的乳白石蒜种内的系统发育树  
Fig. 3 The intra-specific phylogenetic dendrogram of *Lycoris albiflora* Koidz. based on ITS sequences

### 3 讨 论

在 11 个来源于不同产地的乳白石蒜种源中,遗传距离最小的 2 个种源 NB2 和 TM3 分别来自浙江宁波和浙江天目山,这 2 个种源的花色都接近乳白色,且花丝的下部都为白色,花柱上部都为红色或者粉红色;二者的 ITS1 片段中 G + C 含量均为 70.5%、ITS2 片段中 G + C 含量均为 72.6%,显示出这 2 个种源不但花形态极相似,而且 ITS 序列的相似性也非常高。种源 HF(采自江苏宜兴湖滏镇)与 TM3 和 NB2 的遗传距离较小(均为 0.067),其 ITS1 和 ITS2 片段的 G + C 含量分别为 69.2% 和 73.0%,与 TM3 和 NB2 的差异不明显。产自浙江兰溪的种源 LX 与

产自浙江天目山的种源 TM2 的遗传距离最大,为 0.323,其 ITS1 片段的 G + C 含量分别为 53.8% 和 63.7%,ITS2 片段的 G + C 含量分别为 66.1% 和 66.7%。经过比较后可以看出,ITS 片段中的 G + C 含量与种源间的遗传距离及遗传变异有一定的关系,遗传变异较小的种源,G + C 含量较高;遗传变异较大的种源,G + C 含量较低。本研究中,采自浙江兰溪的种源 LX 的 G + C 含量在 11 个样品中最低,而且其花形态特征也与其他种源有明显不同,因此,可以利用 ITS 片段中的 G + C 含量,结合花的形态特征辅助鉴定乳白石蒜种源。

rDNA - ITS 序列在不同物种间存在丰富的变异,是用于探讨植物种内、种间变异及近缘属间变异的重要分子标记之一<sup>[16-17]</sup>,而在鉴别种内变异方面,其应用价值因种而异<sup>[18-21]</sup>。将 Genbank 中的乳白石蒜 rDNA - ITS 序列 (AY942726)<sup>[14]</sup> 与本研究中 11 个乳白石蒜种源的 rDNA - ITS 碱基序列进行比较,得到乳白石蒜 5.8S rDNA 片段长度为 163 bp,这与被子植物 rDNA - ITS 序列中 5.8S rDNA 片段的长度是一致的,而且序列较保守。据 Baldwin 等统计,被子植物的 rDNA - ITS 序列中 ITS1 片段的长度为 187 ~ 298 bp、ITS2 片段的长度为 187 ~ 252 bp<sup>[11]</sup>,据此,可以确定乳白石蒜 rDNA - ITS 序列中 5.8S rDNA 片段长度为 163 bp、ITS1 片段长度为 222 ~ 245 bp、ITS2 片段长度为 240 ~ 252 bp。在 11 个乳白石蒜种源的 rDNA - ITS 序列中,浙江兰溪种源(LX)的 G + C 含量最低,变异程度最大,其花被腹面中部为橘红色、边缘乳白色,与其他种源的花被颜色有明显差异,说明 ITS 序列可以作为乳白石蒜种下类群鉴别和分类的手段。对 rDNA - ITS 序列进行分析可为乳白石蒜的遗传多样性分析和新品种选育提供分子水平上的证据。

#### 参考文献:

- [1] 刘 琰, 徐炳声. 石蒜属的核型研究[J]. 植物分类学报, 1989, 27(4): 257 - 264.
- [2] 孙叶根, 郑 艳, 张定成, 等. 安徽石蒜属 4 种植物核型研究[J]. 广西植物, 1998, 18(4): 363 - 367.
- [3] 邵建章, 杨积高, 张定成, 等. 二倍体石蒜在安徽发现[J]. 植物分类学报, 1994, 32(6): 549 - 552.
- [4] 张 露, 蔡友铭, 诸葛强, 等. 石蒜属种间亲缘关系 RAPD 分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 915 - 921.
- [5] 周守标, 秦卫华, 余本祺, 等. 安徽产石蒜两个居群的核型研究[J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 421 - 426.

- [6] 金雅琴, 黄雪芳, 李冬林. 江苏石蒜的种质资源及园林用途[J]. 南京农学报, 2003, 19(3): 17-21.
- [7] 张雷凡, 高燕会, 朱玉球, 等. 石蒜属植物种质资源 ISSR - PCR 反应体系的建立[J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(2): 156-161.
- [8] 袁菊红, 权俊萍, 胡绵好, 等. 石蒜 SRAP - PCR 扩增体系的建立与优化[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4): 1-6.
- [9] 李隆云, 钟国跃, 卫莹芳, 等. DNA 分子标记及其在中药中的应用[J]. 中国中医药科技, 2002, 9(5): 315-320.
- [10] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.
- [11] 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]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1995, 82(2): 247-277.
- [12] 林 珊, 郑伟文, 吴锦忠, 等. 不同来源莲 rDNA ITS 的 PCR 扩增、克隆及序列分析[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(08): 671-675.
- [13] 史全良, 诸葛强, 黄敏仁, 等. 用 ITS 序列研究杨属各组之间的系统发育关系[J]. 植物学报, 2001, 43(3): 323-325.
- [14] 吴 玲, 卢毅军, 史树德, 等. 中国石蒜属种间亲缘关系 ITS 序列分析[J]. 亚热带植物科学, 2007, 36(1): 31-35.
- [15] Rodríguez-Trelles F, Tarrío R, Ayala F J. Evidence for a high ancestral GC content in *Drosophila* [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17: 1710-1717.
- [16] 赵志礼, 徐路珊, 董 辉, 等. 核糖体 DNA ITS 区序列在植物分子系统学研究中的价值[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 50-54.
- [17] 张志翔, 林善枝, 薛 娴. 利用 ITS 序列探讨谷精草属 5 个种的系统发育[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(5): 1-6.
- [18] 孟 娜, 周守标, 蒋继宏. 五种大戟属植物 nrDNA 的 ITS 序列分析及其叶的比较解剖学研究[J]. 广西植物, 2006, 26(1): 18-21.
- [19] Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Hines A, et al. Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae) [J]. *American Journal of Botany*, 1997, 84(11): 1595-1613.
- [20] Ainouche M L, Bayer R J. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (Section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Genome*, 1997, 40(5): 730-743.
- [21] 张君毅, 郭巧生, 吴丽伟, 等. 我国不同地区半夏 rDNA 序列分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1768-1772.

## 欢迎订阅 2010 年《分子植物育种》

《分子植物育种》是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的科学杂志, 2003 年创刊, 创刊伊始即被美国化学文摘(CA)、中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库、中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中外文献数据库收录。2008 年度 CNKI 影响因子为 1.23, 中国自然科学核心期刊影响因子为 1.229。《分子植物育种》已建立了全英文的期刊网站, 定期发布学术动态、出版信息及期刊近期目录等, 实现作者、编者、读者同步分享。

《分子植物育种》主要围绕水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶和林草等方面, 设立了专题评述、研究论文、研究报告、专题介绍、学位论文简报、新基因新种质新品种、新思路新技术新方法和信息索引等栏目, 已经成为植物育种及相关研究领域研究成果发表和交流的重要学术平台, 代表了目前中国分子植物育种的现实情况, 是了解中国分子植物育种的一个重要窗口。

本刊为双月刊, 单月 28 日出版。国内每期定价 40.00 元, 全年价 240.00 元; 国外每期定价 20.00 美元, 全年价 120.00 美元。国内统一连续出版物号: CN 46-1068/S, 国际标准连续出版物号: ISSN 1672-416X。可到当地邮局订阅, 邮发代号: 84-23, 也可直接汇款至编辑部订阅, 免收邮费。地址: 海南省海口市海秀大道 128 号双岛公寓 13B 室(邮编: 570206); 电话: 0898-68966415; 传真: 0898-68958180; E-mail: mpb@hibio.org, mpb@molplantbreed.org; 网址: <http://www.molplantbreed.org>。

欢迎订阅《分子植物育种》!