

睡莲类植物 ITS nrDNA 序列的分子系统发育分析

唐先华¹, 张晓艳², 施苏华³, 钟 扬², 赖旭龙¹

(1. 中国地质大学地球科学学院, 湖北武汉 430074; 2. 复旦大学生物多样性科学研究所, 上海 200433;
3. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

摘要: 睡莲类植物是目前植物分子系统学与进化研究的一个重要类群. 核基因组的 ITS 区是核核糖体(nrDNA)转录单位的一部分. 测定和分析了 5 个属的 7 种睡莲类植物的核核糖体 ITS 序列, 并与 GenBank 中提取的相关序列进行了组合分析, 初步获得了睡莲类植物的 2 个 ITS 系统树, 结果也支持现有分子系统学研究中有关金鱼藻处于较原始位置的观点.

关键词: 睡莲类; ITS 序列; 分子系统树.

中图分类号: Q91 文献标识码: A

文章编号: 1000-2383(2003)01-0097-05

作者简介: 唐先华(1970-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为分子古生物学.

E-mail: xianhuat@sohu.com

当前应用 DNA 分子研究古生物及演化生物学问题的 2 个主要范畴之一是: 利用现代生物的 DNA 序列间接地讨论古生物学问题^[1]. 在研究某一个生物类群时, 根据现代生物 DNA 序列建立的系统树可被用于对比以化石资料为依据所建立的系统关系. 对所测定的古代 DNA 序列一般要输入计算机中同其他同源的古代及现代 DNA 序列进行对比以确定其来源, 并运用现生生物基因库资料分析古 DNA 序列, 用于讨论古生物学问题. 因此, 现代生物分子研究是分子古生物研究的必要基础, 每一例分子古生物研究都必须以某个分子生物学结果作为原始数据. 同时, 现代生物分子中蕴藏着大量历史信息, 分子系统学据此进行系统分类和谱系重建^[2].

被子植物的起源是科学界普遍关心的热点问题. Qiu 等^[3]用 5 个线粒体、质体、核苷酸基因进行系统发育分析, 支持 ANITA (*Amborella*、*Nymphaeales*、*Illiciales*-*Trimeniaceae*-*Austrobaileya*) 代表被子植物进化的最初阶段, *Amborella* 是所有其他被子植物的姊妹群(sister group). 并且来自早白垩纪花的结构化石也表明和 ANITA 有相似之处. Mathews 等^[4]用细胞色素基因(PHYA 和 PHYC) DNA 序列分析得出相同的结论. 另外, Barkman

等^[5]研究得出 *Amborella* 和 *Nymphaeales* 的组合是被子植物谱系的最早分支. 可见, 睡莲科及其相关莲科, 水盾草科和金鱼藻科等, 仍然是目前植物分子系统学与进化研究的一个重要类群.

睡莲类植物, 或称广义睡莲目(*Nymphaeales sensu lato*), 是原始双子叶植物中的一个重要类群, 包括 10 属约 110 余种, 广泛分布于世界温带、亚热带和热带地区. 我国有分布或栽培记录的 7 属是莲属(*Nelumbo* Adans.)、睡莲属(*Nymphaea* L.)、芡实属(*Euryale* Salisb.)、萍蓬草属(*Nuphar* Sm.)、莼菜属(*Brasenia* Schreb.)、王莲属(*Victoria* Lindl.)和金鱼藻属(*Ceratophyllum* L.). 其他 3 属是 *Ondinea* Den Hartog, *Cabomba* Aubl. 和 *Barclaya* Wall.^[6-8]. 虽然人们对该类植物已有较长栽培和研究历史, 但对其分类系统及属间关系一直争议颇多.

核基因组的 ITS 区位于 18 S 和 26 S rRNA 基因之间, 被 5.8 S rRNA 基因分为两段, 即 ITS-1 和 ITS-2^[9], 是核核糖体(nrDNA)转录单位的一部分, 在被子植物中, ITS 区具有长度保守性和核苷酸序列的高度变异性, 使得这些间隔区的 DNA 序列较为容易排序, 而高度变异性可以为重建较低分类阶元的系统发育提供分子证据^[10,11]. 本实验将选取 7 种睡莲类植物, 运用手工测序和自动测序法, 测定

表 1 实验材料的种名、缩写及来源

Table 1 Species, abbreviation and source

种名	缩写	来源	登录号/长度
<i>Nelumbo nucifera</i> cv.	NNU1	中科院武汉植物所	AF136289/626bp
<i>Nelumbo nucifera</i> cv.	NNU2	中科院武汉植物所	AF136290/637bp
<i>Nymphaea alba</i>	NAL	中科院武汉植物所	AF136285/644bp
<i>Nymphaea mexicana</i>	NME	中科院武汉植物所	AF136286/645bp
<i>Nuphar sinensis</i>	NSI	中科院武汉植物所	AF136288/654bp
<i>Euryale ferox</i>	EFE	中科院武汉植物所	AF136287/648bp
<i>Ceratophyllum demersum</i>	CDE	中科院武汉植物所	AF136291/612bp
<i>Nuphar polysepala</i>	NPO	GenBank	AF067576—AF067577
<i>Nuphar variegata</i>	NVA	GenBank	AF067578—AF067579
<i>Nuphar rubrodiscalis</i>	NRU	GenBank	AF067580—AF067581
<i>Nuphar advena</i>	NAD	GenBank	AF067582—AF067583
<i>Nuphar ozarkana</i>	NOZ	GenBank	AF067584—AF067585
<i>Nuphar ulvacea</i>	NUU	GenBank	AF067586—AF067587
<i>Nuphar orbiculata</i>	NOR	GenBank	AF067588—AF067589
<i>Nuphar sagittifolia</i>	NSA	GenBank	AF067590—AF067591
<i>Nuphar oguraensis</i>	NOG	GenBank	AF067592
<i>Nuphar lutea</i>	NUL	GenBank	AF067593—AF067594
<i>Nuphar japonica</i>	NJA	GenBank	AF067595—AF067596
<i>Nuphar microphylla</i>	NMI	GenBank	AF067597—AF067598
<i>Nuphar pumila</i>	NPU	GenBank	AF067599—AF067600
<i>Corylus chinensis</i> *	CCH	Wen J., Shi S., 未发表	已投送

注：* 表示外类群。

核糖体 DNA ITS-1 和 ITS-2 的核苷酸序列；应用 Clustal X^[12] 对睡莲类植物和外类群的 ITS 序列进行对位排列；应用分支分析软件包 PHYLIP 3.572 c^[13]，构建 ITS 分子系统树，探讨睡莲类植物的系统发育关系。

1 材料与方法^[14]

1.1 材料

所用材料包括 5 个属的 7 种分类群，见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 称取去叶脉新鲜叶 1 g，采用 CTAB 法^[15]提取总 DNA，直接用于 PCR 扩增。

1.2.2 ITS 区片段的扩增与纯化 PCR 反应过程及所用引物参照 Wen 等^[16]，PCR 扩增产物采用美国 Millipore 公司 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。

1.2.3 序列测定 采用末端终止法，以 α -³⁵S-dATP 作为放射性标记，分别利用 ITS4, N18L18, N5.8 s 及 C5.8 s 从 2 个方向直接进行序列测定。采用美国 Amersham 公司的 DNA 聚合酶测序试剂盒 (T7 DNA sequenase version 2.0 Kit)，具体操作基

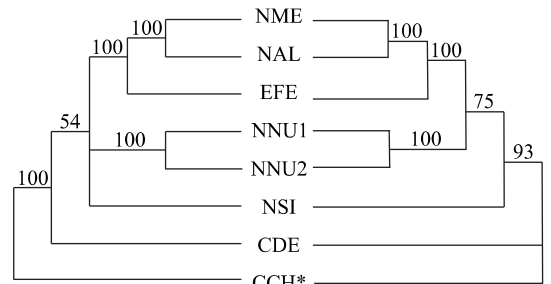


图 1 用简约法和邻接法构建的 ITS 系统树

Fig. 1 ITS phylogenetic trees using maximum parsimony and neighbor-joining methods

数字表示各分支自展数据支持率；* 表示外类群，分类群缩写见表 1，左为 MP，右为 NJ

本按该 Kit 操作规程进行，部分样品的序列同时又由自动测序仪测序获得 (PCR 扩增引物：ITS4: 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3', ITS5: 5'GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G3'; 测序引物：N18L18: 5'AAG TCG TAA CAA GGT TTC3', C5.8 s: 5'TGC GTT CAA AGA CTC GAT 3', N5.8 s: 5'ATC GAG TCT TTG AAC GCA3', ITS4: 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3').

1.2.4 ITS 区序列分析 所测序列应用 CLUSTAL X 程序对所研究的内类群和外类群进行排序。

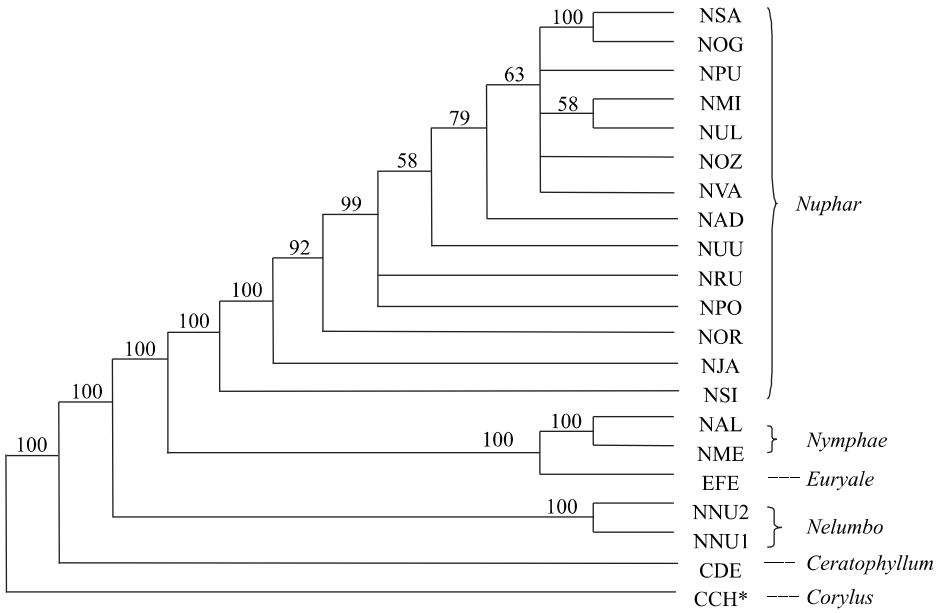


图 2 用简约法构建的 ITS 系统树(组合数据集)

Fig. 2 ITS phylogenetic trees using maximum parsimony (combined data set)
数字表示各分支自展数据支持率; * 表示外类群; 分类群缩写见表 1; 右边斜体为属名

应用 PHYLIP 3. 572 c 软件包中的 SEQBOOT 程序, 将排序后的序列用自展法^[17] (bootstrap) 进行检验, 自展数据集 1 000 次; 应用 DNAPARS 程序对该自展数据集构建最简约的系统树^[18] (maximum parsimonious phylogenetic tree, MP tree); 应用 CONSENSE 程序获得一个多数一致树 (majority-rule consensus tree). 应用 SEQBOOT 程序获得自展数据集; 应用 DNADIST 程序, 对自展数据集计算 Jukes-Cantor 距离系数矩阵^[19]; 应用 NEIGHBOR 程序(选择邻接法 neighbor-joining method^[20]) 构建系统树(NJ tree); 应用 CONSENSE 程序获得多数一致树. 所构建的系统树如图 1, 2 所示.

2 分子系统树的比较与分析

从图 1 的 ITS 系统树中可以发现, 睡莲属的 2 个种(NME 和 NAL)以及莲的 2 个品种(NNU1 和 NNU2)分别构成 2 个姊妹群(sister group). 2 个系统树中芡实(EFE)均与睡莲属构成姊妹群, 且获得 100% 自展数据支持率, 这与大多数基于形态性状和 *rbc* L 数据的结果是一致的; 而萍蓬草(NSI)的位置在 2 个系统树中有差别, 特别是用简约法构建的系统树中涉及萍蓬草的分支仅获得了 54% 的自展数据支持率, 说明该分支是不稳定的; 在图 1 中, 除金

鱼藻(CDE)外的内类群均构成单系类群(monophyletic group), 而金鱼藻则处于较原始的位置. 事实上, 在已经发表的 *rbc* L 系统树^[21, 22] 中, 金鱼藻被视为整个被子植物的原始类群, 但基于形态性状的分支分析结果却表明莲属比金鱼藻属更为原始^[8, 23].

由组合数据集构建的 ITS 系统树见图 2, 在拓扑结构上与自测数据集所构建的 ITS 系统树(图 1) 是大致相同的. 然而, 其中所有萍蓬草属植物构成的分支和其他分支间的关系, 只与图 1 中的 MP 类似, 与 NJ 的分支结构不同.

3 结论

本实验的分析结果表明, 金鱼藻处于较原始的位置, 与现有分子系统学研究中有关系金鱼藻位置的观点基本吻合. ITS 系统树还反映出所涉及的萍蓬草属(组合数据集)、睡莲属和莲属的种间关系, 即莲属植物在系统树上的位置较睡莲属和萍蓬草属植物要原始. 本实验只选取了睡莲科 5 属 7 个种的样本, 睡莲类其他科属还未涉及. 同时, 还只测序分析了核基因 ITS 区序列, 这难免因实验材料的局限性造成结果不全面. 进一步的研究拟选取更多的类群和基因, 对睡莲类植物的起源和系统关系进行分析.

参考文献:

- [1] 杨群. 古生物学领域的新辟园地——分子古生物研究[J]. 古生物学报, 1995, 34(3): 265—276.
YANG Q. A frontal area in palaeontology—molecular fossil studies [J]. Acta Palaeontologica Sinica, 1995, 34 (3): 265—276.
- [2] 杨洪, 程安进, 杨群. 地质体中主要生物分子的研究方法及应用[J]. 地质论评, 1998, 44(1): 44—51.
YANG H, CHENG A J, YANG Q. Research method and application of major biology molecular in geology [J]. Geology Review, 1998, 44(1): 44—51.
- [3] Qiu Y L, Lee J, Bernasconi Q F, et al. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes [J]. Nature, 1999, 402: 404—407.
- [4] Mathews S, Michael J D. The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes [J]. Science, 1999, 286: 947—950.
- [5] Barkman T J, Chenery G, Mcneal J R, et al. Independent and combined analyses of sequences from all three genomic compartments converge on the root of flowering plant phylogeny [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97: 13166—13171.
- [6] 侯宽昭, 吴德邻, 高蕴璋, 等. 中国种子植物科属词典(修订版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
HOU K Z, WU D L, GAO Y Z, et al. Dictionary of spermatophyte classify in China [M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [7] 中国科学院武汉植物研究所. 中国水生微管束植物图谱[M]. 武汉: 湖北人民出版社, 1980.
Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. A collection of hydrophilily canaliculus plant in China [M]. Wuhan: Hubei People Press, 1980.
- [8] 钟扬, 张晓艳, 黄德世. 睡莲目的数量分支分类学研究[J]. 生物数学学报, 1990, 5(2): 156—161.
ZHONG Y, ZHANG X Y, HUANG D S. Study of quantity cladistics on water-lilies [J]. Acta Biomathematics Sinica, 1990, 5(2): 156—161.
- [9] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, et al, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications [C]. San Diego: Academic Press, 1990. 315—322.
- [10] Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants; an example from the Compositae [J]. Molec Phylogen Evol, 1992, 1: 3—16.
- [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]. Ann Missouri Bot Gard, 1995, 82: 247—277.
- [12] Higgins D G, Bleasby A J, Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment [J]. Comput Appl Biosci, 1992, 8: 189—191.
- [13] Felsenstein J. PHYLIP (phylogeny inference package) version 3. 572 c [CP/DK]. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1996.
- [14] 唐先华. 睡莲类植物的 nrDNA ITS 序列分析及分子系统发育与进化研究[D]. 武汉: 中国科学院植物研究所, 1998.
TANG X H. Molecular phylogeny and evolution of water-lilies based on rDNA ITS sequences [D]. Wuhan: Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 1998.
- [15] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11—15.
- [16] Wen J, Zimmer E A. Phylogeny and biogeograph of Panax L (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. Mol Phylogenet Evol, 1996, 6: 166—177.
- [17] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies; an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39: 783—791.
- [18] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences; a maximum-likelihood approach [J]. J Mol Evol, 1981, 17: 368—376.
- [19] Jukes T H, Cantor C R. Evolution of protein molecules [A]. In: Munro H N, ed. Mammalian protein metabolism [C]. New York: Academic Press, 1969. 21—132.
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method; a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406—425.
- [21] Les D H, Garvin D K, Wimpee C F. Molecular evolutionary history of ancient aquatic angiosperms [J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88: 10119—10123.
- [22] Chase M W, Balthazar M V, Hoot S B, et al. Phylogenetics of seed plants; an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbc l [J]. Ann Missouri Bot Gard, 1993, 80: 528—580.
- [23] Ito M. Phylogenetic systematics of the Nymphaeales [J]. Bot Mag Tokyo, 1987, 100: 17—35.

A Preliminary Phylogenetic Analysis of ITS nrDNA Sequences in Water-lilies

TANG Xian-hua¹, ZHANG Xiao-yan², SHI Su-hua³, ZHONG Yang², LAI Xu-long¹

(1. *Faculty of Earth Sciences, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China*; 2. *Institute of Biodiversity Science, Fudan University, Shanghai 200433, China*; 3. *College of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China*)

Abstract: Water-lily plants are key group on study of the flowering plant phylogeny. The internal transcribed spacers (ITS) and the 5.8S coding region of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) of seven taxa were sequenced to study molecular phylogeny and evolution of Nymphaeales *sensu lato*. The ITS phylogenetic trees were constructed based on the sequences and a combined data set with sequences from GenBank. The results obtained from ITS sequences also supported that the genus *Ceratophyllum* could be considered the ancestral group in the order, as the results of most molecular systematic studies.

Key words: water-lilies (*Nymphaeales sensu lato*); ITS sequence; molecular phylogenetic tree.