

文章编号: 1000-5692(2007)01-0017-05

银杏核糖体 DNA 内转录间隔序列初步分析

桂仁意¹, 金爱武¹, 高培军¹, 曹福亮²

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300;

2. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 为研究银杏 *Ginkgo biloba* 种内核糖体 DNA 内转录间隔(ITS)区序列的多样性, 以具有代表性的 10 个银杏嫩叶样本为材料, 提取基因组 DNA 后用特异性引物进行 PCR 扩增, 并直接测定其 ITS 区序列。结果表明, 银杏 ITS 区(内含 5.8 S)总长度为 1 224~1 226 bp, 其中 ITS-1 长度为 821~823 bp, 5.8 S 长度为 162 bp, ITS-2 长度为 241 bp。在全序列范围内, 可变位点有 28 个 占总核苷酸的 2.3%, 但简约信息位点仅 6 个 变异量仅有 0.5%。银杏的不同样本之间 ITS 区序列表现出高度一致。图 2 参 13

关键词: 植物学; 银杏; 内转录间隔; 序列测定

中图分类号: Q946.2; S718.43 **文献标识码:** A

植物 18 S-26 S 核糖体 DNA (rDNA)的内转录间隔(internal transcribed spacer, ITS)区序列是植物系统学中研究低等级分类群系统发育关系的有效工具之一, 并已成为研究分子进化关系的重要标记^[1-3]。银杏 *Ginkgo biloba* 起源于 3 亿多年前, 鼎盛于中生代, 在历经冰川世纪之后, 仅存于中国, 并可能仅存于长江中下游的一狭窄区域, 并自 18 世纪后传播至全世界。因此, 有关银杏的遗传多样性引起了人们的广泛兴趣^[4,5]。有报道认为银杏 ITS 区序列差异达 25%^[9]。为此, 作者采集野生半野生及栽培品种共 10 株有较强代表性的银杏样本为材料, 测定其 ITS 区序列, 研究其变异情况。

1 试验材料

用于银杏 ITS 序列分析的样品分别来自江苏省邳州银杏种质资源圃和南京林业大学下蜀林场银杏种质基因库。江苏省邳州银杏种质资源圃收集有全国各银杏产区的银杏品种(无性系)100 余个。在邳州银杏种质资源圃内采集的样品是五大类栽培品种, 分别为大佛指、苏农佛手、大马铃薯、梅核和小圆子, 每一大类各取 1 个样品。南京林业大学下蜀林场银杏种质基因库是全球最大的银杏种质基因库, 收集有数量庞大的银杏种质资源, 其中有野生半野生群体样本。在此采集野生半野生银杏样本共 4 个, 其原采集地分别为浙江省西天目山、贵州省务川、湖北省随州和重庆市金佛山。另外, 在南京林业大学校园内采集了 1 株雄性银杏样本。总计采集样本数为 10 个。由于样品分别取自具典型代表性的野生半野生群体和栽培群体, 有雄株也有雌株, 因此, 所取样品基本能反映出银杏种内的变异情况。2003 年 4 月 21 日采集刚刚完全展开的嫩叶 10 g 左右, 于冰盒中暂时保存, 并于当天置入 -70 ℃ 超低温冰箱中保存。

收稿日期: 2006-03-27; 修回日期: 2006-10-08

基金项目: 国家林业局重点资助项目(1998-09)

作者简介: 桂仁意, 博士, 从事森林培育学研究。E-mail: gy@zjfc.edu.cn

2 研究方法

DNA 提取依据 Murray 等^[7] 的 CTAB 法, 稍作改进。体外扩增 (PCR) 反应体系为 50 μ L, 内含 Mg^{2+} ($2 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$), dNTP ($0.2 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$), 引物各为 55 μ mol, *Taq* 聚合酶 16.67 nkat, $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 二甲基亚砜, 基因组 DNA 为 50 ~ 100 ng。

扩增程序为: 70 $^{\circ}C$ 41 min; 然后 94 $^{\circ}C$ 1 min, 48 $^{\circ}C$ 20 s, 72 $^{\circ}C$ 90 s, 2 个循环; 94 $^{\circ}C$ 20 s, 48 $^{\circ}C$ 20 s, 72 $^{\circ}C$ 90 s, 36 个循环; 然后在 72 $^{\circ}C$ 保温 10 min, 最后 4 $^{\circ}C$ 保存^[8]。扩增引物为位于 *muSSU* 上的 ITS-1 和位于 26 S 上的 ITS-4, 分别是 ITS-1: 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGC-3'; ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3'。

扩增之后的 PCR 产物由上海申友公司进行纯化并进行直接测序。银杏 ITS 区序列较长, 2 次反应不能安全测通, 申友公司根据测序结果设计了 2 个引物, 每个样品共进行了 4 个测序反应。测序结果用 Clustal X 进行序列比对。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增结果

银杏 rDNA ITS 的 PCR 扩增结果表明 (图 1), PCR 产物长度约为 1 300 bp。从图 1 中还可看出, 该 PCR 产物为一条明亮清晰的带, 具有较好的质量。

3.2 银杏 ITS 区序列测定结果

序列测定结果表明, 银杏 ITS 区 (内含 5.8 S) 总长为 1 224 ~ 1 226 bp, 其中 ITS-1 长度为 821 ~ 823 bp, 5.8 S 长度为 162 bp, ITS-2 长度为 241 bp。取苏农佛手样品的 ITS 区序列为代表, 登录于 GeneBank 数据库 (登录号 DQ191445)。

用 MEGA (3.0) 内嵌的 Cluster W 进行序列比对发现, 所测 10 个样品在全序列范围内, 可变位点 (variable sites) 有 28 个, 占总核苷酸的 2.3%, 但简约信息位点 (parsim-informative sites) 仅 6 个, 变异量仅有 0.5%。在这 28 个可变位点中, 有 22 个分布于 ITS-1 区域, 5.8 S 和 ITS-2 区域各有 3 个。若银杏 ITS 区全长以 1 226 bp 计, 则 6 个信息位点分别位于 354, 509, 574, 636, 676 和 1 210 bp 处。其中前 4 个信息位点均为 G/C 转换, 位于 ITS-1 区域, 第 5 个和第 6 个信息位点分别为 G/A 和 G/T 颠换, 位于 ITS-2 区域。5.8 S 区域没有信息位点分布。

从变异量在样本中的分布来看, 在 28 个变异位点中, 栽培群体包含有 13 个, 野生半野生群体中包含有 19 个。在 6 个信息位点中, 有 3 个存在于栽培群体 (分别位于 354, 509 和 636 bp), 野生半野生群体中则有 5 个 (缺 509 bp 位点变异)。这一结果反映了银杏的野生半野生群体较栽培群体有更大的遗传差异。

由此可见, 银杏种内 ITS 序列变异极少, 主要位于 ITS-1 区域。若以简约信息位点计, 则种内变异量仅为 0.5%, 如此低的变异量使它不能成为分析银杏种内遗传变异的有效手段。但这 6 个信息位点进一步作为银杏 SNP 的候选位点加以开发利用。

实验所测 10 个样本有雌雄株, 也有野生半野生及栽培品种, 大体上能反应银杏总体变异情况。这说明银杏 rDNA 序列在长期的进化过程中, 通过不等交换和基因转换, 各重复单位间已发生了位点内或位点间的同步进化 (concerted evolution)^[9], 即不同 ITS 区拷贝间的序列趋于相近或完全一致。由于 ITS 序列的高度一致, 保证了 PCR 扩增产物直接测序结果的可靠性^[10]。

将银杏栽培品种苏农佛手的 ITS 全序列 (总长为 1 224 bp) 在 GenBank 上进行 Blaster 搜索, 在 Expect 参数为 10 时, 只找到一条银杏同源全长序列 (Y16892)。此序列材料为一雌株, 采自广东省林

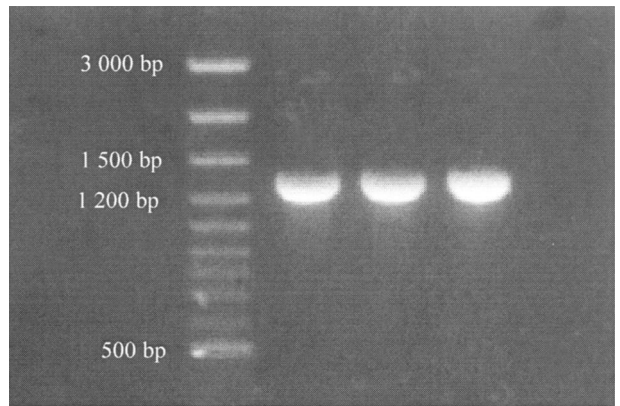


图 1 银杏 ITS 序列 PCR 扩增产物

Figure 1 PCR products of *Ginkgo biloba* ITS sequence

业科学研究院^[6]。2 条序列比对结果见图 2。

Ginkgol	ATGATCCCGT	CGTCCGTA	AA	GGAACGGGGC	GTGGCGAACT	GTGAGGATCG	TGGGATGGAC	60
Y16892TA..TA...	
Ginkgol	CCCCGTCCGT	CGTCGGCCGT	CGTTGCCCTC	CGCTCGCGAA	TAGCTACGCG	GCGGTGATTG	120	
Y16892		
Ginkgol	GCAGCGCGGT	CGTGCGGCGG	ATAAGGCTA	TCCTTCTGAC	CCGCCAGGA	TCGTGGGATG	180	
Y16892		
Ginkgol	GACCCCGCC	CGTCGTGTCC	GGCCGTCGTT	GCCCTCCGTT	CGCGAATAGC	TACGCGCGCT	240	
Y16892-		
Ginkgol	GGATGGGCAG	CGCGGTCTGC	CGGCGGTAA	GGCCCATCTC	TCGACCCGAG	CTCCGGATGC	300	
Y16892--T...	..-C.....	.-.....GA	GCT.C.....		
Ginkgol	CAAGTTCGCC	GGACCGTCGT	CCGTCGTGCC	CCGCCCCCTG	CGTTGGCTGC	GCAGAGGCTC	360	
Y16892CG..		
Ginkgol	GGCGGGGCG	GTGGCGGGCG	GTCGGGAAG	TGTGCCCAT	GCCCCGAGT	TCAAATCGAG	420	
Y16892C.....		
Ginkgol	TTGTTCCGGT	TCGCTTCGGC	CTG-CCGTC	TCTCCCGTAC	GGCGTCCGGC	ACGCGTTGAG	480	
Y16892A.....		
Ginkgol	CTTAAGCAAC	CGATGTGGC	-GGCGGGCAG	GGCGGACGGT	ACGGGCTTGC	ACGTGCTTCT	540	
Y16892C.....--		
Ginkgol	CGCATTTCCT	CTCGGCGCGT	CGGTGACGCG	GCGAGTCTCG	TTCGGTCTCC	GCTCGACGGT	600	
Y16892?	..CTC.G.A.		
Ginkgol	CGCCCCGTGG	CACGGGGAGA	AGGCTCTTCT	GTCGTAGCGG	TGTCGTTCGA	GGCCGTCGTG	660	
Y16892GA..-		
Ginkgol	CGCCGGCCCG	CCGCGGGGAA	ATGGTTACCC	CTTTTTTTC	CCCCTTCTCT	TCTTATCTCT	720	
Y16892C.	...T.CTCT.		
Ginkgol	TTTTTCTGA	TCCCCCAGT	GCCGGAGGCA	CCAAGATAAG	AAAGTCGTAC	GGACTCCCCG	780	
Y16892TGA.G.		
Ginkgol	CACACACTGC	GCGTGGCGTG	GGGACACGC	GGACCAAAG	ACCCTCACGA	CTCTCGGCAA	840	
Y16892		
Ginkgol	CGGATATCTC	GGCTCTCGCC	ACGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TAGTGTGAAT	900	
Y16892G.	C.-.?		
Ginkgol	TGCAGAATCC	CGTGAATCAT	CGAGTCTTTG	AACGCAAGTT	GCGCCCGAGG	CCTCGGCCGA	960	
Y16892A.....		
Ginkgol	GGGCACGTCT	GCATGGGCGT	CGCACAACC-	-TATCGCCC	CCCGCCCTCC	GG-GTGGCGG	1020	
Y16892	CA.-G.....	..C.....??A	CC.....T.....		
Ginkgol	GGCGCGGAGT	TGGCCGTCCG	TGCCCCAGC	GGCGCGGTCG	GCTGAAAACC	ACGCGGTCGT	1080	
Y16892A.....		
Ginkgol	CGTCTCTCTG	CGCCGGCGAA	CGGTGTCCGG	GCCGCGCGAT	GCGCGGTCGA	TCGGCGCCGG	1140	
Y16892TT.....		
Ginkgol	CGCGGAGCAT	CGGGCGAGCG	TCTCCGCGAA	CAACTTCGAA	CTCCGGCCTC	GGCCGCACCG	1200	
Y16892	.TG.....G-.....-		
Ginkgol	CGCACGCGGG	GCGGCCGTCC	GGACGCTGCG	1230				
Y16892		

图 2 所测银杏 rDNA ITS 序列与 GenBank 上银杏同源序列(Y16892)比较

Figure 2 Sequence alignment of *Ginkgo biloba* rDNA ITS with the homologous sequence (Y16892) in GenBank

比对结果形成总长 1 230 bp 的 2 条同源序列, 共有可变位点 45 个, 其中 32 个位于 ITS-1 区, 7 个位于 5.8 S 区, 6 个位于 ITS-2 区, 总计占全长的 3.7%, 远大于本实验所测 10 个样本间的差异(平均每 2 条序列间可变位点数为 3)。

陈月琴等^[9]将其所测银杏 ITS 区全序列与 GenBank 上另一条银杏 ITS 序列(样本采自意大利)相比较, 发现 2 条序列间差异较大, ITS 区(含 5.8 S)的核苷酸差异达到 25%, 在基因内的差异也高达 17%。核糖体基因在生物体内高度保守, 在被子植物科以下类群变异量都较少, 属内基本没有变异^[11]。虽然 2 个样本的栽培地相距较远, 但因银杏只子遗于中国, 后来才又重新栽培于全世界, 因此, 这 2 个样本 ITS 序列间表现出如此之大的遗传差异, 这一结果值得商榷。

4 结论与讨论

4.1 银杏 ITS 区测序方法

植物 ITS 区序列测定方法有 2 种,一种是测定 ITS 区单一 PCR 克隆,另一种是直接测序,即测定 PCR 全部产物的序列。哪种方法更好,尚处于争论之中^[11]。如果 rDNA 重复序列间的纯合程度很高,无论是克隆测序还是 PCR 产物直接测序都可反映出 ITS 区的序列。但普通 PCR 扩增中有一定的碱基错配,如果所测克隆刚好是误扩增的序列,就会影响结果的准确性,而 PCR 产物直接测序则可避免此问题,因为测序中所表现出的信号由处于主导地位的产物所决定。相反,如果 rDNA 的纯合程度较低,各重复单位间序列差异较大,特别是当细胞中有一个以上的基因位点时,采取何种方法测序应特别慎重。只测一个 PCR 克隆的序列显然不能反映重复序列间的变异,对大量 PCR 克隆进行常规测序当然是理想方法,如 Susanna 等^[12]只对每一 PCR 产物的 2 个克隆进行测序,即发现 Winteraceae 科的 6 种植物中有 4 种植物存在重复单位间的变异,但该方法需要大量人力和物力。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结果,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。从近来发表的论文来看,无论所测 ITS 区的同步进化程度如何,大都是对 PCR 产物直接进行测序,即使对杂交、多倍化现象广泛存在的复杂类群,这一方法也取得了良好结果^[11]。从本实验结果看,银杏 ITS 区序列高度一致,用 PCR 扩增产物直接测序其结果是可靠的。

4.2 银杏 ITS 区序列变异

以 10 个具有较强的遗传变异代表性的银杏植株为样本,对银杏 ITS 区序列测定结果表明,银杏 ITS 区(含 5.8 S)总长为 1 224~1 226 bp,其中 ITS-1 长度为 821~823 bp,5.8 S 长度为 162 bp,ITS-2 长度为 241 bp。在 ITS 区(含 5.8 S)全长范围内,有 28 个可变位点,其中有 22 个分布于 ITS-1 区域,5.8 S 和 ITS-2 区域各有 3 个。从多态位点在样本中的分布来看,28 个变异位点中栽培群体有 13 个,野生半野生群体有 19 个。6 个信息位点中栽培品种中有 3 个,野生半野生群体中有 5 个。这一结果反映了银杏的野生半野生群体较栽培群体有更大遗传差异,与郑阿宝^[13]的研究结果相一致。

由于可变位点及信息位点数较少,仅分别占总核苷酸的 2.3%和 0.5%,其中的可变位点还存在假阳性,因此,银杏 ITS 区所能提供的信息量极少,不足以用以银杏种内的遗传变异研究。但所测出的 6 个信息位点则可作为银杏 SNP 的候选位点加以开发利用。

银杏的 ITS 区序列高度一致,说明银杏 rDNA 序列在长期的进化过程中,通过不等交换和基因转换,各重复单位间已发生了位点内或位点间的同步进化。

参考文献:

- [1] 汪文俊,王广策,张宝玉,等.海带栽培品系和长海带 ITS 区的 PCR 扩增及序列分析[J].高技术通讯,2005,15(5):95-101.
- [2] 魏育明,颜泽洪,吴卫,等.几个中国大麦属物种核 rDNA ITS 区序列分析[J].四川农业大学学报,2005,23(1):1-7.
- [3] GAO M, LI D Z, ZHANG C Q, et al. Infrageneric and sectional relationship in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) inferred from ITS sequence data[J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(11): 1 351-1 356.
- [4] 曹福亮.中国银杏[M].南京:江苏科学技术出版社,2002.
- [5] 程晓建,王白坡,郑炳松,等.银杏雌雄株性别鉴别研究进展[J].浙江林学院学报,2002,19(2):217-221.
- [6] 陈月琴,庄丽,屈良鹄,等.“活化石”进行的银杏形态与分子进化(I)[J].中山大学学报:自然科学版,1999,38(1):17-20.
- [7] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4 321-4 325.
- [8] 张露,蔡友铭,诸葛强,等.新疆石竹属野生种核糖体 DNA 的 ITS 序列[J].遗传学报,2002,29(6):549-554.
- [9] ELDER J R, TURNER B J. Concerted evolution of repetitive DNA sequence in eukaryotes[J]. *Quart Rev Biol*, 1995, 70: 297

— 319.

- [10] AINOUCHE M L, BAYER R. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequence of nuclear ribosomal DNA [J]. *Genome*, 1997, 40: 730—743.
- [11] 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—417.
- [12] SUSANNA A, JACAS N G, SOLTIS D E, *et al.* Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences [J]. *Amer J Bot*, 1995, 82: 1 056—1 068.
- [13] 郑阿宝. 银杏遗传多样性及生态保护研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2000.

Internal transcribed spacer (ITS) sequences with *Ginkgo biloba* populations

GUI Ren-yi¹, JIN Ai-wu¹, GAO Pei-jun¹, CAO Fu-liang²

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The diversity of nuclear ribosomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) sequences of *Ginkgo biloba* was determined by analyzing 10 leaf samples representing different populations. Results showed that the total length of the ITS sequences, including 5.8 S, was 1 224—1 226 base pairs (bp) with ITS-1 being 821—823 bp long, 5.8 S having 162 bp, and ITS-2 consisting of 241 bp. Among the sequences, there were 28 variable sites, or 2.3% of the total, but only 6 parsim-informative sites, or 0.5% of the total. The ITS sequences among the different populations were very similar. [Ch, 2 fig. 13 ref.]

Key words: botany; *Ginkgo biloba*; internal transcribed spacer (ITS); sequencing

浙江林学院茶文化学院建设项目获立项

在浙江省委和省政府的关心支持下, 经过中国国际茶文化研究会、学校领导及相关职能部门的积极努力, 浙江林学院茶文化学院建设工程项目经过各方论证, 于 2006 年 11 月 24 日通过浙江省发展和改革委员会的立项批复。该建设项目占地约 9.00 hm² (包括茶品种园 5.33 hm²), 茶文化学院楼总建筑面积 1.2 hm² (其中: 教学行政及附属用房 7 000 m², 茶文化国际交流中心 5 000 m²), 总投资 5 711 万元。

2006 年 12 月 1 日, 应学校邀请, 浙江省委宣传部常务副部长童芍素教授来到浙江林学院, 了解指导茶文化学院的建设与发展。童芍素在浙江林学院党委书记陈敬佑, 茶文化学科带头人、作家王旭烽及相关人员陪同下一起考察了茶文化学院茶艺实验中心用地现场并提出宝贵意见。